UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio”

Nathália Cristina Canicoba

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio”

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

Orientada: Nathália Cristina Canicoba

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleni Mara
Marzocchi Machado

Ribeirão Preto

RESUMO

CANICOBA, N. C. **Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio.** 2016. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O neutrófilo é o leucócito predominante na circulação sanguínea. Por ser um fagócito profissional e conter grânulos ricos em enzimas digestivas, ele representa a primeira linha de defesa contra infecções. A principal proteína dos seus grânulos é a mieloperoxidase (MPO), a qual contribui para a atividade microbicida do neutrófilo por mediar a geração de moléculas oxidantes que degradam inúmeras estruturas biológicas dos patógenos, mas que podem também agredir o próprio hospedeiro. A ação deletéria da MPO está relacionada com processos inflamatórios que causam danos ao endotélio e sustentam a inflamação. A liberação da MPO do neutrófilo diretamente sobre o endotélio depende da interação célula-célula mediada pela integrina CD11b/CD18 (receptor tipo 3 para o complemento, CR3) expressa nos neutrófilos e pela molécula de adesão intercelular (ICAM-1) no endotélio, sugerindo o envolvimento do CR3 em no dano tecidual na inflamação crônica. Um polimorfismo no gene ITGAM (*integrin, alpha M*), que codifica a integrina CD11b (αM) do CR3 influencia a interação do CR3 com seus ligantes e prejudica a adesão celular. Há poucos estudos funcionais sobre esta variante, sendo a maioria em células transfectadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as implicações da variante da cadeia CD11b do CR3 para as interações neutrófilo-endotélio. Os genótipos para identificação das variantes alélicas foram determinados por reação em cadeia da polimerase; as células endoteliais (CE) extraídas da veia do cordão umbilical foram expostas aos neutrófilos expressando as variantes 77R e 77H, os quais foram estimulados ou não com Zimosan, imunocomplexos com F(ab')₂ – ambos opsonizados com soro humano normal (SHN) e tratados com soro humano inativado (SHI) – e o formil-metil-leucil-fenilalanina (fMLP); a agressão às CE foi avaliada por medida da peroxidação lipídica pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; a transferência de MPO dos neutrófilos para as CE foi analisada por citometria de fluxo com anticorpo monoclonal específico; a avaliação da ativação endotelial foi avaliada pela liberação de ICAM-1 por ensaio imunoenzimático. Os resultados mostraram que i) os neutrófilos com a variante 77H, sem estímulos, causaram maior agressão ao endotélio, com maior peroxidação lipídica, quando comparada àquela de neutrófilos com a variante 77R; ii) a peroxidação lipídica foi maior quando os neutrófilos responderam aos estímulos opsonizados com SHN; iii) os neutrófilos com a variante 77R produziram maior peroxidação lipídica com o estímulo F(ab')₂/SHN comparados aos neutrófilos com 77H; iv) a transferência de MPO para as células endoteliais é dependente da disponibilidade do CR3 e do contato com o neutrófilo; v) os estímulos dependentes do CR3 promoveram um aumento da ativação endotelial medida pela concentração de ICAM-1 solúvel; a remoção do complemento (SHI) minimiza esta ativação; vi) o modelo permitiu observar a dependência do CR3 para todas as funções estudadas. Os resultados refletem a diversidade de mecanismos envolvidos nas interações estudadas e apontam para a necessidade do refinamento dos modelos experimentais para uma compreensão mais clara. A partir deste modelo podemos pensar em delineamentos envolvendo neutrófilos de pacientes com LES, bem como estudar potenciais drogas moduladoras das respostas envolvendo o CR3.

Palavras-chave: neutrófilos; CR3; mieloperoxidase; endotélio.

ABSTRACT

CANICOBA, N. C. ***In vitro* activation of neutrophils via CR3: implications of the CD11b chain variant (rs1143679) for interactions with the endothelium.** 2016. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neutrophil is the most abundant leukocyte in circulation. It is the first line of defense against infections, mainly due to their granules full of digestive enzymes. The main protein of its granules is myeloperoxidase (MPO), which contributes to the microbicidal activity of neutrophils by mediating the generation of reactive oxygen molecules. However, MPO may also harm the host itself: MPO is involved in inflammation and tissue damage. The release of MPO directly on the endothelium is dependent of neutrophil-endothelium interaction. This is mediated by the interaction of the integrin CD11b/CD18 (complement receptor type 3, CR3) expressed by neutrophils and the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in the endothelium. A polymorphism in the *ITGAM* gene (integrin alpha M), which codifies CD11b integrin (α M) of CR3 impairs both the interaction with its ligands and cell adhesion. There are few functional studies assessing this variant, the majority in transfected cells. In this way, the aim of this study was to evaluate the implications of CD11b chain variant of CR3 for neutrophil-endothelium interactions. Allelic variants were determined by polymerase chain reaction; endothelial cells (EC) extracted from the umbilical vein were exposed to neutrophils expressing variants 77R or 77H, which were stimulated or not with Zimosan, immunocomplexes with F(ab')₂ - both opsonized with normal human serum (NHS) or treated with inactivated human serum (SHI) - and formil-methyl-leucyl-phenylalanine (fMLP); aggression to the EC was evaluated by measuring lipid peroxidation by reactive substances to thiobarbituric acid method; Transfer of MPO from neutrophils to EC was analyzed by flow cytometry with specific monoclonal antibody; assessment of endothelial activation was evaluated by ICAM-1 release by immunoenzymatic method. The results show that i) neutrophils bearing 77H variant without stimuli caused increased lipid peroxidation compared to neutrophils bearing R77 variant in homozygosis; ii) lipid peroxidation was increased when neutrophils were stimulated with stimuli opsonized by SHN; iii) neutrophils stimulated with F(ab')₂ / SHN bearing 77R variant had increased lipid peroxidation compared to neutrophils bearing 77H; iv) the MPO transfer to endothelial cells is dependent on the availability of CR3 and contact with neutrophils; v) CR3-dependent stimuli promoted an increase in endothelial activation measured by soluble ICAM-1; complement removal (HIS) minimizes this activation; vi) the model allowed us to observe the dependence of CR3 for all the studied functions. The results reflect the diversity of mechanisms involved in the studied interactions and point to the need for refinement of experimental models for a more clarifying understanding from this model we can think of designs involving patients with SLE neutrophils, as well as studying potential modulatory drug responses involving CR3.

Keywords: neutrophil; CR3; myeloperoxidase; endothelium

Introdução

1.1 Receptor para complemento tipo 3 (CR3)

O receptor para complemento tipo 3 (CR3) é um heterodímero da família das β integrinas, também conhecido como CD11b/CD18, Mac-1 ou α M β 2-integrina, que tem um importante papel nos processos de adesão celular e fagocitose (Rosetti, Mayadas, 2016).

O CR3 é predominantemente expresso em células mieloides como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A interação do CR3 com seus ligantes está envolvida em importantes funções efetoras do sistema imune, como o sinergismo do CR3 com os receptores para imunoglobulinas G (Fc γ R) nos neutrófilos para mediar a fagocitose de imunocomplexos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a desgranulação por estas células. Destaca-se também, a ligação do CR3 do neutrófilo com o a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) nas células endoteliais para mediar as interações neutrófilos-endotélio responsáveis pela migração celular (Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007).

Este receptor é composto por uma cadeia α (CD11b) associada a uma cadeia β (CD18) por ligações não covalentes. A primeira é codificada pelo gene *ITGAM* (*integrin, alpha M*; cromossomo 16p11.2) e é a responsável por conferir a ligação do CR3 a inúmeras moléculas - proteínas da matriz extracelular, fibrinogênio, ICAM-1 e o fragmento inativado do componente C3 do complemento (C3bi) (Rosetti, Mayadas, 2016). Enquanto que a subunidade CD18 é codificada pelo gene *ITGB2* (*integrin subunit beta 2*; cromossomo 21q22.3). Cada uma das subunidades apresenta três tipos de domínio: um extracelular, um transmembrana e um intracelular (Faridi *et al.*, 2010).

No domínio extracelular da subunidade α , há uma região denominada de domínio I, que é responsável por mediar a ligação do CR3 com seus ligantes. Normalmente, o domínio extracelular está compactado e fechado, impedindo a interação do CR3 com seus ligantes, inferindo uma baixa afinidade ao CR3. Porém, quando há ativação celular, o domínio extracelular muda sua conformação permitindo a exposição do sítio de ligação do CR3 e inferindo uma maior afinidade dessa molécula com seus ligantes (Evans *et al.*, 2009; Gahmberg *et al.*, 2009).

A subunidade α , cadeia CD11b, apresenta um polimorfismo determinado por uma mutação no gene *ITGAM*, com a troca de um único nucleotídeo (*snp, single*

nucleotide polymorphism), guanina por adenina (G230A; *reference snp* - rs1143679). Esta mutação pontual substitui uma arginina (R) por histidina (H) na posição 77 no domínio extracelular da molécula CD11b (R77H) (Figura 1), o que leva à alteração das estruturas terciárias e quaternárias do domínio de ligação, resultando na existência de duas variantes polimórficas – 77R e 77H. Esta substituição influencia a habilidade do CR3 em mediar a adesão celular aos ligantes ICAM-1 e -2 e também a ligação ao C3bi (Nath *et al.*, 2008; Macpherson *et al.*, 2011).

Figura 1. Representação do receptor para complemento tipo 3 (CR3). A Figura mostra as subunidades, cadeias α (CD11b) e β_2 (CD18), e os domínios do heterodímero. A localização da arginina (R) / histidina (H) está indicada como polimorfismo R77H. O sítio de ligação para os ligantes está indicado no Domínio I. Adaptado de Rosetti & Mayadas, 2016.

O polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* tem sido associado com o lúpus eritematoso sistêmico (LES), sendo a presença do alelo 77H para a cadeia CD11b associado ao risco relativo com a doença (Nath *et al.*, 2008; Anaya *et al.*, 2012; Toller-Kawahisa *et al.*, 2014). O LES é o protótipo de doenças por imunocomplexo (IC). É uma doença inflamatória crônica sistêmica, de caráter autoimune, que associa múltiplos fatores genéticos, hormonais e ambientais na sua etiologia complexa. Há deposição de IC em tecidos ou órgãos, levando a um processo inflamatório crônico e lesão tecidual, muito frequentemente manifestando vasculite e nefrite. A fisiopatologia

do LES envolve o sistema complemento (SC) e seus receptores (CR), neutrófilos, FcγR e moléculas de adesão. Os produtos da ativação do SC atraem os neutrófilos para o foco inflamatório e sua interação com os IC depositados resulta na liberação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e das enzimas dos grânulos dos neutrófilos sobre os tecidos, as quais causam danos às estruturas celulares, por estresse oxidativo, levando à exposição de autoantígenos e sustentando a autoimunidade (Alarcón-Segovia *et al.*, 1999; Guillevin, Dörner, 2007; Valko *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Rosetti, Mayadas, 2016).

Devido a associação do polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* com a suscetibilidade ao LES, muitos estudos têm sido direcionados ao entendimento da influência da variante polimórfica 77H nas funções imunes mediadas por CR3 (refs). Contudo, diante da complexidade de fatores envolvidos no LES, ainda não há uma compreensão precisa que pudesse esclarecer a associação da variante 77H com o LES. Considerando-se a importância das interações neutrófilo-SC-endotélio no processo inflamatório e lesão tecidual por IC no LES, há de se considerar modelos para estudar essa relação frente à presença da variante 77H.

1.2 Neutrófilo

As primeiras observações sobre as características morfológicas e tintoriais do neutrófilo, descrevendo seu núcleo segmentado e grânulos no citoplasma, foram feitas por Paul Ehrlich no final do século XIX. Logo em seguida, Elie Metchnikoff descreveu a capacidade do neutrófilo de fagocitar “objetos estranhos”, a fim de defender o organismo contra patógenos (Cavaillon, 2011; Amulic *et al.*, 2012).

A partir destas descobertas o conhecimento sobre a fisiologia dos neutrófilos tem evoluído progressiva e continuamente até os dias de hoje. O interesse na biologia do neutrófilo se deve à importância desta célula para a resposta imune. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio de inflamação ou infecção para contenção de partículas estranhas, graças à sua capacidade de realizar fagocitose e de destruição das mesmas. Além disso, os neutrófilos participam de uma rede de interações, através de mediadores solúveis e moléculas de membrana, que permite comunicação com outros tipos celulares para o estabelecimento da resposta imune adequada para a homeostase (Kumar e Sharma, 2010).

Quanto à origem, os neutrófilos são produzidos na medula óssea a partir de precursores mieloides que se diferenciam de mieloblasto até o neutrófilo maduro (neutrófilo segmentado). O processo de produção e maturação dos neutrófilos é chamado de granulopoiese e representa dois terços da produção de células sanguíneas (hematopoiese) pela medula óssea (Borregaard, 2011). Os neutrófilos maduros migram da medula óssea para a corrente sanguínea e em humanos eles constituem cerca de 50 – 70% dos leucócitos circulantes (Kolaczowska e Kube, 2013; Krueger *et al.*, 2015).

Quanto à morfologia, os neutrófilos maduros apresentam um diâmetro médio de 7 a 10 μm . O núcleo é segmentado com 3 a 5 lóbulos, característica esta que lhe confere a classificação como leucócitos polimorfonuclear (PMN). E devido o conteúdo expressivo de grânulos no seu citoplasma, os neutrófilos são também classificados como granulócitos. Quatro tipos de grânulos são encontrados no citoplasma dos neutrófilos. Três deles são formados durante a maturação da célula e contêm em seu interior proteínas pró-inflamatórias. Esses grânulos são os azurófilos ou primários, os específicos ou secundários e os de gelatinase ou terciários. O quarto tipo de grânulo são as vesículas secretoras, as quais podem transportar rapidamente seu conteúdo para a superfície celular, onde suas proteínas vesiculares se incorporam à superfície da membrana (Kolaczowska e Kube, 2013). As vesículas secretoras são os últimos grânulos a serem formados, porém os primeiros a serem liberados, visto que a ordem de constituição e de desgranulação dos grânulos é oposta, como pode ser visto na Figura 2 (Ma *et al.*, 2013).

Figura 2. Os grânulos dos neutrófilos: tipos, componentes, ordem de produção durante a origem e desenvolvimento do neutrófilo, comparação de tamanho e ordem de desgranulação. BPI, proteína bactericida indutora de permeabilidade; NGAL, lipocalina do neutrófilo associada à gelatinase; gp, glicoproteína; phox, oxidase do fagócito; MMP, metaloproteínas da matriz; NRAMP1: proteína 1 do macrófago associada à resistência natural; CR1: receptor para complemento tipo 1. Adaptado a partir de Borregaard e Cowland (1997) e Ma *et al.* (2013).

A função primária dos neutrófilos é o reconhecimento para destruição e erradicação de partículas estranhas (Nauseef, 2007). Para tanto, o neutrófilo é provido de sistemas oxidantes, que inclui o complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, bem como de um arsenal de enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, presente nos seus grânulos citoplasmáticos. O complexo NADPH oxidase é composto por ao menos sete proteínas que residem no citosol e em compartimentos de membrana nos neutrófilos em repouso. Uma vez ativado, os componentes presentes no citosol se translocam para a membrana do fagossomo e se associam com o flavocitocromo b_{558} , formando a NADPH oxidase (Klebanoff, 2005).

A NADPH oxidase é responsável pelo mecanismo conhecido como *burst* oxidativo, que converte o oxigênio em ânion superóxido dando início à geração das espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, somadas às enzimas dos grânulos, medeiam a destruição das partículas fagocitadas (Graham, 2007; Nathan, 2006; Hager *et al.*, 2010).

O ânion superóxido formado pela ação da NADPH oxidase é instável e por isso pode sofrer dismutação espontânea, formando o peróxido de hidrogênio, o qual servirá de substrato para a mieloperoxidase (MPO) dos grânulos dos neutrófilos. A MPO, por sua vez, contribuirá com uma sequência de reações, cujos produtos somados aos conteúdos dos grânulos, formam o arsenal tóxico do neutrófilo para a destruição das partículas fagocitadas. Este arsenal é limitado ao interior do neutrófilo. Fisiologicamente, a quantidade de compostos tóxicos que extravasam para o meio extracelular é rapidamente neutralizado por anti-proteinases existentes no fluido intersticial. No entanto, existem circunstâncias nas quais este conteúdo dos neutrófilos extravasa em quantidades excessivas, principalmente nos processos inflamatórios crônicos, resultando em lesão tecidual e perda da função dos órgãos afetados (Moraes *et al.*, 2006; Borregaard *et al.*, 1997; 2007; Häger *et al.*, 2010; Nathan, 2010; Amulic *et al.*, 2012). Assim, os mecanismos efetores dos neutrófilos – tão importantes para as defesas do hospedeiro - também estão envolvidos na fisiopatologia de processos inflamatórios crônicos.

1.3 Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma proteína da família das hemeperoxidases, codificada pelo gene homônimo no cromossomo 17 em humanos, e é a enzima mais abundante dos neutrófilos. Ela se localiza nos grânulos azurófilos, sendo liberada durante a desgranulação como um importante sistema oxidante microbicida (Ma *et al.*, 2013; Klebanoff *et al.*, 2013).

Contudo, a MPO dos neutrófilos tem sido associada com a agressão ao endotélio nos processos inflamatórios (Villanueva *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 (Klinke *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2005). A deposição da MPO no endotélio requer o contato íntimo neutrófilo-endotélio e é dependente da integrina CR3, sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual em condições inflamatórias crônicas como a vasculite lúpica (do LES) e a aterosclerose (Jerke *et al.*, 2013).

Assim como todos os medidores existentes nos grânulos, a MPO só é liberada quando receptores na membrana do neutrófilo ou na membrana do fagossomo

sinalizam para o citoplasma, ativando a translocação do grânulo azurófilo para a membrana celular. A fusão da membrana do grânulo com a membrana do fagossomo formam o fagolisossomo, e, em seguida, a liberação do conteúdo dos grânulos ocorre, em geral, no fagolisossomo, podendo em algumas circunstâncias extravasar para o meio extracelular (Lau *et al.*, 2005).

A MPO atua de dois modos: convertendo o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, chamado de ciclo de peroxidação; ou convertendo íons haletos em ácidos hipohalosos, chamado ciclo de halogenação (Figura 3) (Panasenko *et al.*, 2012). O que determina qual ciclo essa enzima irá realizar é a competição entre os substratos de peroxidação e de haletos (Patterson *et al.*, 2014).

Figura 3. Ciclos de peroxidação e halogenação da mieloperoxidase. MPO, mieloperoxidase. Hal, halogênio; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; H_2O , água; HOHa , ácido hipohaloso. Adaptado a partir de Panasenko *et al.* (2012).

O ciclo de halogenação se inicia quando a forma nativa da enzima (MPO-Fe^{3+}) é rapidamente oxidada pelo H_2O_2 , tornando-se $\text{MPO}^{\bullet+}\text{-Fe}^{4+}=\text{O}$ (composto I) (Figura 3,

reação 1). Essa nova forma da MPO apresenta alta reatividade e catalisa a oxidação de íons halletos, formando ácidos hipohalosos (Figura 3, reação 2), como ácido hipocloroso (HOCl), e reduzindo o composto I para a forma nativa da MPO. Já o ciclo de peroxidação ocorre quando há presença de doadores de elétron, como nitrato, nesse caso, o composto I será transformado em MPO-Fe⁴⁺-OH (composto II) (Figura 3, reação 3), o qual sofrerá uma oxidação e voltará a sua forma nativa (Figura 3, reação 4) (Panasenko *et al.*, 2012).

A MPO liberada no sítio inflamatório também pode exercer um papel autócrino no neutrófilo ao se associar ao CR3. Essa associação altera vias de sinalizações intercelulares, levando ao aumento da produção de ERO e aumentando a expressão de CR3 na superfície do neutrófilo (Lau e Baldus, 2006).

1.4 Neutrófilos, endotélio e inflamação

A inflamação é um processo fisiológico normal, de defesa, em resposta a uma agressão ao organismo. Esse processo envolve o recrutamento de leucócitos e mediadores para o tecido agredido seja por patógenos, lesão ou irritação (Ashley *et al.*, 2012).

O endotélio vizinho ao tecido inflamado libera citocinas, como interleucina 1 β (IL-1 β), IL-17 (IL-17) e o fator de necrose tumoral α (TNF α), causando dilatação vascular, aumento da permeabilidade dos capilares, diminuição do fluxo sanguíneo próximo ao sítio inflamatório e recrutamento de leucócitos (Freire e Van Dyke, 2013).

Além das citocinas liberadas pelo endotélio, os macrófagos residentes no local da inflamação fagocitam os patógenos e também liberam citocinas para recrutar outras células (Borregaard, 2010). Os neutrófilos são uma das primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório. Para exercerem suas funções efetoras, os neutrófilos deixam a circulação sanguínea, por diapedese por meio do endotélio vascular que está próximo do sítio inflamatório, pois nessa região a parede do vaso está fina e o diâmetro é suficientemente pequeno para que o neutrófilo possa fazer contato com a parede do vaso. Assim, eles migram em direção ao foco de infecção ou de lesão tecidual, por quimiotaxia (Rose *et al.*, 2007; Borregaard, 2010).

Este processo ocorre graças à capacidade dos neutrófilos de reconhecerem e serem ativados por quimiocinas, produtos bacterianos e peptídeos quimiotáticos

gerados pela ativação do sistema complemento, que são liberados na proximidade do foco inflamatório (Ley *et al.*, 2007; Trouw, Daha, 2011; Borregaard, 2010). Durante a migração, ambos neutrófilos e endotélio participam ativamente de uma série de eventos que guiam os neutrófilos para regiões do endotélio permissivas à migração (Zarbock e Ley, 2008).

A etapa inicial da adesão ao endotélio envolve a captura (*tethering*) dos neutrófilos mediada pelas interações com glicoproteínas expressas nos leucócitos (L-selectinas), no endotélio lesionado (E-selectinas e P-selectinas) e nas plaquetas (P-selectinas), capazes de interagir com ligantes glicosilados. Em seguida, os neutrófilos rolam (*rolling*) sobre o endotélio, numa etapa mediada também por L-selectinas e P-selectinas e seus ligantes glicosilados. Então, os neutrófilos são arrastados (*arrest*) sobre o endotélio, por interações com as $\beta 1$ e $\beta 2$ integrinas e seus respectivos ligantes, e há um aumento da adesão e espalhamento dos neutrófilos no endotélio (Rose *et al.*, 2007; Borregaard, 2010).

Quando as integrinas dos neutrófilos – VLA-4 (*very late antigen 4*; $\alpha 4\beta 1$) e CR3 – interagem com seus respectivos ligantes no endotélio – a molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1) e o ICAM-1 – ativam as células endoteliais, facilitando a migração dos neutrófilos (Borregaard, 2010). Portanto, a modulação do VLA-4 e do CR3 afeta a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. A Figura 4 ilustra as etapas de migração dos neutrófilos.

Figura 4. Etapas do mecanismo de migração dos neutrófilos pelo endotélio mediadas por interações entre moléculas no neutrófilo e respectivos ligantes nas células endoteliais. 1– captura (*tethering*) e o rolamento (*rolling*) dos neutrófilos sobre o endotélio vascular; 2– adesão firme do neutrófilo ao endotélio e arraste sobre o endotélio (*arrest*); 3– diapedese, migração paracelular e transcelular (não mostrada); 4– fagocitose e morte de microorganismos e/ou partículas; 5– neutrófilos ativados geram quimioatraentes, espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberam grânulos; 6– a resolução da inflamação é mediada pela apoptose eficiente dos neutrófilos residuais; 7– apoptose tardia resulta em inflamação persistente e dano tecidual mediado pelas ERO, enzimas dos grânulos e citocinas. PSGL, glicoproteína ligante de P-selectina; ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão à célula vascular; LFA, antígeno associado à função de leucócito; PECAM, Molécula de adesão da célula endotelial à plaqueta; IL, interleucina; LTB4, leucotrieno B4; TNF, fator de necrose tumoral. Adaptado de Wright *et al.* (2014).

Como descrito, a fisiologia da inflamação envolve as interações entre neutrófilos e endotélio com importante participação do CR3 (CD11b/CD18). As células endoteliais são continuamente expostas à ação dos produtos biologicamente ativos do complemento, os quais são rapidamente disponíveis na circulação quando ativados pelas partículas estranhas e IC no sítio inflamatório. Os principais efeitos destes produtos são favorecer sua interação com leucócitos circulantes e promover a migração destas células para o foco inflamatório. Vários produtos da ativação do complemento interagem com as células endoteliais e estimulam a expressão de moléculas de adesão, bem como promovem a secreção de fatores pró-inflamatórios. Em particular, quando há deposição de IC no endotélio, como na vasculite lúpica, as moléculas de C3bi, depositadas nos IC, e de ICAM-1, nas membranas das células endoteliais, ligam-se ao CR3 nos neutrófilos, promovendo a interação rápida entre neutrófilos e endotélio (Marks *et al.*, 1989; Lozada *et al.*, 1995; Mayadas, 2009). A fagocitose “frustrada” destes IC depositados leva à produção excessiva de ERO e desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, responsáveis pelo balanço *redox* do organismo, gerando o estresse oxidativo. Este, por sua vez, é um mediador de dano às estruturas celulares, incluindo lipídeos e proteínas na membrana e DNA. Além do dano ao endotélio, as ERO podem levar também ao aparecimento de novos epítopos em autoantígenos modificados pela oxidação, capazes de romper a tolerância ao próprio e contribuir para a autoimunidade (Kurien *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007). Ainda no LES, um aumento da expressão de ICAM-1 foi associado à ativação do endotélio concomitante ao aumento da expressão de seu receptor (CR3) nos leucócitos e exacerbação da doença (Spronk *et al.*, 1994).

Alguns estudos mostraram que neutrófilos com deficiência de CR3 são incapazes de migrarem através do endotélio, enquanto que o aumento da expressão de ICAM-1 favorece a adesão e migração dos neutrófilos pelas junções intercelulares no endotélio (Phillipson *et al.*, 2006). Esses neutrófilos desgranulam, a concentração de MPO liberada é alta para essas junções, fazendo com que o endotélio internalize essa enzima, levando à disfunção endotelial (Astern *et al.*, 2007). Assim, o estudo das interações entre neutrófilos, endotélio e CR3 é importante para o entendimento da fisiopatologia dos processos inflamatórios crônicos.

Conclusão

- a)** Os neutrófilos que expressam a variante 77H da cadeia CD11b do CR3 promoveram maior agressão às células endoteliais, medida pela peroxidação lipídica, na ausência de estímulos, quando comparados aos neutrófilos que expressam a variante 77R.
- b)** A peroxidação lipídica foi maior em resposta aos estímulos Zi/SHN e F(ab')₂/SHN, quando comparada aquela com os mesmos estímulos tratados com soro deficiente de proteínas do sistema complemento (Zi/SHI e F(ab')₂/SHI), sendo portanto influenciada pela interação C3bi com o CR3.
- c)** Os neutrófilos que expressam a variante 77R promoveram maior peroxidação lipídica das células endoteliais quando comparados aos neutrófilos expressando a variante 77H.
- d)** A transferência de MPO para as células endoteliais é dependente da disponibilidade do CR3, uma vez que ela foi significativamente menor na presença dos estímulos Zi/SHN e F(ab')₂/SHN, dependentes do CR3, mas não sofreu alteração com o fMLP.
- e)** A transferência de MPO para as células endoteliais depende do contato neutrófilo e célula endotelial.
- f)** Os estímulos dependentes do CR3 promoveram um aumento da ativação endotelial medida pela concentração de ICAM-1 solúvel; a remoção do complemento (SHI) minimiza esta ativação. Não houve diferenças entre os grupos de neutrófilos.
- g)** Os neutrófilos que expressam a variante 77H da cadeia CD11b, quando estimulados via CR3, exibem uma tendência à menor peroxidação lipídica e à maior transferência de MPO para as células endoteliais.
- h)** O modelo do estudo permitiu a confirmação de que todas as funções estudadas são dependentes de CR3.

Referências Bibliográficas

ALARCÓN-SEGOVIA, D. Treatment needed to achieve remission of SLE. **Lupus**. 1999; 8(7):566. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10483038>>.

AMULIC, B.*et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**. 2012; 30:459-89. Disponible 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. **Autoimmunity Reviews**. 2012; 11:276–80. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840425>>.

ASHLEY, N.T.*et al.* Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 2012; 43: 385-406. Disponible em: <<http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>>.

ASTERN, J.M. *et al.* Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. **American Journal of Pathology**. 2007;171(1):349-60. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591979>>.

BORREGAARD, N.; COWLAND J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**. 1997; 89:3503–3521. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160655>>.

BORREGAARD, N. *et al.* Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**. 2007; 28(8):340-5. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627888>>.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity Review**. 2010; 24;33(5):657-70. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463>>.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 1978; 52:302-10. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>>.

CAVAILLON, J.M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. **Journal of Leukocyte Biology**. 2011;90(3):413-24. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628329>>.

CHEUNG, K.*et al.* The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology Baltimore**. 1983; 130:2324-2339. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6687603>>.

CLAGUE, H.D.*et al.* Human neutrophil antigen-4a gene frequencies in an Australian population, determined by a new polymerase chain reaction method using sequence-specific primers. **Transfusion Medicine**. 2003; 13:149-52. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791082>>.

DING, H.J.; GORDON, C. M.*et al.* New biologic therapy for systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Pharmacology**. 2013; 13(3):405-12. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664092>>.

DYOBUKT, J.M. *et al.* A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**. 2005; 39:1468–77. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274882>>.

EL KEBIR, D. *et al.* Inflammation: Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**. 2008; 15;103(4):352-9. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617697>>.

FARIDI, M.H. *et al.* High-throughput screening based identification of small molecule antagonists of integrin CD11b/CD18 ligand binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2010; 26;394(1):194-9. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188705>>.

FORSBERG, M. *et al.* Tumour necrosis factor- α potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. **Immunology**. 2001; 103(4): 465-72. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11529937>>.

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**. 2013; 8(2):57082. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451151>>.

FREIRE, M.O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000. 2013; 63(1):149-64. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931059>>.

GAHMBERG, C.G. *et al.* Regulation of integrin activity and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009; 1790(6):431-44. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289150>>.

GRAHAM, D.B. *et al.* Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC γ 2 signaling axis in mice. **Journal of Clinical Investigation**. 2007; 117(11):3445-52. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932569>>.

GUILLEVIN L.; DÖRNER, T. Vasculitis: mechanisms involved and clinical manifestations. **Arthritis Research & Therapy**. 2007; 9 Suppl 2:S9. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767747>>.

HÄGER, M. *et al.* Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**. 2010; 268(1):25-34. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497300>>.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Endothelial cell destruction by polymorphonuclear leukocytes incubated with sera from patients with SLE. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. 1992; 21(5):209-14. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1439628>>.

HELEN, L. *et al.* The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology** 2014; 10, 593–601. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914698>>.

JERK, U. *et al.* β 2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**. 2013; 288(18):12910-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532856>>.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**. 2005; 77(5):598-625. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689384>>.

KLEBANOFF, S.J *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**. 2013; 93(2):185-98. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066164>>.

KLINKE, A. *et al.* Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**. 2011; 117(4):1350-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980678>>.

KOLACZKOESKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 2013; 13, 159-175. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>>.

KRUGER, P. *et al.* Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLOS Pathogens**. 2015; 12;11(3):e1004651. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764063>>.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. 2010; 10(11):1325-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640>>.

KURIEN, B.T. *et al.* Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. 2006; 41:549–556. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16863987>>.

LAU, D. *et al.* Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2005; 102(2):431-6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625114>>.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. 2006; 111(1):16-26. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476484>>.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**. 2007; 7(9):678-89. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717539>>.

LI, X. *et al.* Fc γ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. **Genes & Immunity**. 2009; 10:380–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421223>>.

LOZADA, C.*et al.* Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1995; 92:8378–82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545301>>.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**. 1984; 132:2015-20. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699405>>.

MA, Y. *et al.* Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. **Fibrogenesis Tissue Repair**. 2013; 3;6(1):11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731794>>.

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. **Journal of Biological Chemistry**. 2011; 286: 17303–17310. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454473>>.

MARKS, R.M. *et al.* Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. **Nature**. 1989; 339:314–317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725646>>.

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

MARZOCCHI-MACHADO, C.M. *et al.* 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. **Journal of Autoimmunity**. 2005; 25(4):289-97. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289666>>.

MAYADAS, T.N. *et al.* Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. **Circulation**. 2009; 119(20):2012-24. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917895>>.

METZLER, D.C. *et al.* A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. **Cell Reports**. 2014; 7;8(3):883-96. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066128>>.

MILLER, A.S. *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**. 1988; 16:1215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>>.

MORAES, T.J. *et al.* Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current Opinion in Hematology**. 2006; 13(1):21-7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319683>>.

NATH, S.K. *et al.* A nonsynonymous functional variant in integrin- α (M) (encoded by *ITGAM*) is associated with systemic lupus erythematosus. **Nature Genetics**. 2008; 40:152–4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204448>>.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Review Immunology**. 2006; 6(3):173-82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498448>>.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**. 2010; 140(6):871-82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877>>.

NAUSEEF, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunology Review**. 2007; 219:88-102. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850484>>.

PANASENKO, O.M. *et al.* Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems. **Biochemistry (Moscow)**. 2013; 78(13):1466-89. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490735>>.

PATTERSON, E.K. *et al.* Carbon monoxide-releasing molecule 3 inhibits myeloperoxidase (MPO) and protects against MPO-induced vascular endothelial cell activation/dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine**. 2014; 70:167-73. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583458>>

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **Journal of Experimental Medicine**. 2006; 203(12):2569-75. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116736>>.

PULLI, B. *et al.* Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLOS One**. 2013; 8(7):e67976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861842>>.

ROSE, D.M. *et al.* Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. **Immunology Review**. 2007 Aug; 218:126-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624949>>.

ROSETTI, F.; MAYADAS, T.N. The many faces of Mac-1 in autoimmune disease. **Immunology Review**. 2016, Jan 269(1):175-93. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26683153>>.

SPRONK, P.E. *et al.* Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long-term prospective study. **Clinical & Experimental Immunology**. 1994; 97(3):439-44. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521807>>.

STOCCO, B. *et al.* Drospirenone and levonorgestrel in combination with either 30 or 20 mcg ethinylestradiol reduce soluble adhesion molecules in Brazilian women; cross-sectional study. **Contraception**. 2012; 86(5):506-10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554799>>

THEILGAARD-MÖNCH, K. *et al.* The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. **Journal of Immunology**. 2004; 15;172(12):7684-93. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187151>>.

TOLLER-KAWAHISA, J.E. The variant of CD11b, rs1143679, in CR3 is associated with lupus nephritis and impaired FcγR/CR cooperation in mediating the oxidative burst of neutrophils. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 104p, 2012.

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. **Human Immunology**. 2014, 75:119-23. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269694>>.

TROUW, L.A.; DAHA M.R. Role of complement in innate immunity and host defense. **Immunology Letters**. 2011; 138(1):35-7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333684>>.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 2007; 39:44–84. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>.

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. *et al.* FcγRIIa and FcγRIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. **Autoimmunity**, 2014; 47(7):451-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896836>>.

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 97p, 2012.

VILLANUEVA, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. **Journal of Immunology**. 2011; 187(1):538-52. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613614>>.

ZHANG, H. *et al.* Inhibition of myeloperoxidase decreases vascular oxidative stress and increases vasodilatation in sickle cell disease mice. **Journal of Lipid Research**. 2013; 54(11):3009-15. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956444>>.

ZHOU, Y. *et al.* Multiple lupus-associated *ITGAM* variants alter Mac-1 functions on neutrophils. **Arthritis Rheumatology**. 2013, 65(11): 2907-16. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918739> >.