

# NEUTRÓFILOS: ASPECTOS CLÁSSICOS, PLASTICIDADE E NOVAS FUNÇÕES IMUNORREGULATÓRIAS

## NEUTROPHILS: CLASSICAL ASPECTS, PLASTICITY AND NEW IMMUNOREGULATORY FUNCTIONS

Ítala Cristine Silva\*

### RESUMO

Os neutrófilos são o tipo leucocitário mais abundante em circulação, constituem a primeira linha de reconhecimento e defesa contra agentes infecciosos no tecido, tradicionalmente iniciam uma inflamação aguda e são responsáveis por uma resposta imune pró-inflamatória eficaz. Recentemente essas células vêm sendo descritas como complexas e com uma vasta capacidade de desempenhar funções especializadas, interagem com macrófagos, células dendríticas, e linfócitos TCD4+. É importante reconsiderar sua importância como célula efetora na imunidade adaptativa e as novas perspectivas sobre as funções imunorregulatórias nas reações imunológicas normais e patológicas. Nesta revisão, nosso foco é mostrar os aspectos clássicos e discutir o novo neutrófilo, expondo o que tem sido descrito na literatura recentemente.

### PALAVRAS-CHAVE

Neutrófilos. Imunorregulação. NETs. Imunidade adaptativa.

### ABSTRACT

Neutrophils are the most abundant leukocyte in blood and represent the first line recognition and defense against infectious agents in tissues, traditionally begin an acute inflammation and are responsible by an effective proinflammatory reaction. Recently these cells have been described with a large capacity to perform specialized functions like interaction with macrophages, dendritic cells and CD4 + T lymphocytes. It is important to reconsider its importance as effector cells in adaptive immunity and new perspectives on the immunoregulatory functions in normal and pathological immune responses. In this review, the focus is to show the classic aspects and discuss the “new neutrophils”, exposing what has been described in literature recently.

### KEYWORDS

Neutrophils. Immunoregulation. NETs. adaptive immunity

## 1 INTRODUÇÃO

Recentes descobertas colocam os neutrófilos não somente como o principal tipo celular responsável pelo processo de inflamação aguda, mas como uma célula com potencial modulador dessa resposta. Assim, o controle do infiltrado de neutrófilos e a ampliação da visão de versatilidade desse tipo celular como uma célula importante em todo o estabelecimento da resposta imune abrem um campo de possibilidades para o estudo de patogêneses que dependem do processo inflamatório para se estabelecerem no organismo.

Como esse processo inflamatório inicial, agudo, mediado por neutrófilos acontece? Qual o papel biológico destas células e sua interação imunológica com outros leucócitos? Quais as moléculas envolvidas? Os registros literários vêm responder essas perguntas acerca da inflamação e têm demonstrado a presença de um neutrófilo com funções muito bem estabelecidas e funcionando somente em determinados momentos desse processo.

Esta revisão mostra o que tem sido identificado para o neutrófilo, tanto em relação aos aspectos clássicos quanto às novas funções atribuídas a essas células. Nosso foco são os mecanismos que regulam o recrutamento dos neutrófilos, desde a sua formação na medula óssea até a chegada aos sítios inflamatórios e como essas células contribuem para a ativação de resposta imune adaptativa e para a resolução da inflamação.

Correspondence author: Ítala Cristine Silva. italacris@gmail.com.

\* Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Laboratório de Imunopatologia e Imunologia Clínica. italacris@gmail.com.

Received: 01/2015

Accepted: 05/2015

## 2 DA MEDULA ÓSSEA AO TECIDO

Dentre os leucócitos circulantes, os neutrófilos são o tipo leucocitário mais abundante e compõem a principal barreira do sistema imune inato contra microrganismos, porém, em contraste com os macrófagos (MØ), apresentam um curto período de vida, cerca de 8 a 12 horas na circulação sanguínea, antes de migrarem para o tecido (AMULIC et al., 2012; MAYADAS et al., 2013).

São terminalmente formados através da proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea durante a hematopoiese e, por meio da estimulação de citocinas, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), culminam em sua formação por um processo chamado de mielopoiese a uma taxa de  $10^{11}$  por dia, podendo chegar a  $10^{12}$  por dia durante uma infecção. (AMALUC et al., 2012; MAYADAS et al., 2013).

Receptores de quimiocina CXCR4 e CXCR2 são essenciais, respectivamente, para a manutenção e liberação dos neutrófilos na medula óssea, comandando o *homing*. Por esses receptores serem expressos em células endoteliais, estromais e osteoclastos, fazem com que os neutrófilos fiquem retidos na medula até completarem totalmente seu processo de maturação. Quando estão prontos, são estimulados via CXCR2 e G-CSFR para serem liberados na corrente sanguínea (AMALUC et al., 2012).

Após maturação, os neutrófilos são liberados da medula, e quando ocorre uma injúria física, mecânica ou infecção, sinais químicos inflamatórios são produzidos pelas células do hospedeiro e por produtos secretados pelo patógeno. Esses fatores estimuladores irão desencadear uma série de respostas do organismo, que vão desde a estimulação da expressão de moléculas de adesão da superfamília das selectinas (E,P- selectinas) e das integrinas (ICAMs) pelas células endoteliais próximas ao local de inflamação, até a sinalização para o aumento da produção leucocitária nas células progenitoras da medula óssea via interleucina -17 (IL-17) (MAYADAS et al., 2013; BORREGAARD, 2010; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; KENNEDY; DELEO, 2009).

A inflamação se estabelece através do reconhecimento, pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), de estruturas moleculares características de patógenos microbianos. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – tais como o LPS, sequências não metiladas de DNA (CpG), e RNA de dupla fita – reconhecem também as moléculas intracelulares derivadas do hospedeiro que

são liberadas frente a um dano ou morte celular e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) – como quimiocinas (IL-8), citocinas (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-6). E quando essas moléculas são reconhecidas, ativam as células em que são expressas para promoverem suas funções antimicrobianas e pró-inflamatórias (KENNEDY; DELEO, 2009).

Macrófagos residentes no tecido, ao detectar a presença de microrganismos ou de uma lesão, recrutam neutrófilos circulantes para o local lesado por meio de um processo chamado recrutamento leucocitário, nas seguintes fases: captura/ativação, rolamento, adesão, e transmigração (KENNEDY; DELEO, 2009; KOBAYASHI; DELEO, 2009; BOGDAN, 2000).

Durante o recrutamento, o neutrófilo é ativado via receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs), PRRs como receptor de quimiocina FPR1 e todos os membros da família de receptores semelhantes a Toll (TLR), exceto TLR3, e também membros da família de receptores semelhantes a NOD (NLR) são capazes de reconhecer diversos PAMPs e/ou DAMPs (BORREGAARD, 2010; KENNEDY; DELEO, 2009; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; AARESTRUP, 2012).

As células endoteliais passam a expressar em grande quantidade moléculas de adesão, como a P-selectina e E-selectina, as quais se ligam a carboidratos da membrana plasmática dos leucócitos, que são carboidratos expressos pela glicoproteína de membrana, a glicoproteína da P-selectina 1 (PSGL-1), e a selectina L-selectina encontrada na membrana dos leucócitos, conferindo uma ligação de baixa afinidade entre os leucócitos e as células endoteliais. Essa ligação entre as moléculas de adesão faz com que os neutrófilos presentes em grandes quantidades na corrente sanguínea sejam trazidos para a margem do vaso e rolem sobre as células endoteliais no sentido de maior concentração dos estímulos quimiotáticos, diminuindo sua velocidade no fluxo sanguíneo (MAYADAS et al., 2013; BORREGAARD, 2010; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; KENNEDY; DELEO, 2009; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; MANTOVANI et al., 2011).

A ligação de baixa afinidade, resultante da ligação entre as moléculas de adesão dessas células, desencadeia no neutrófilo uma cascata de reações que geram mudanças na sua biologia e interrompem o rolamento para iniciar um estágio de firme adesão mediado pela ligação de moléculas da família das integrinas  $\beta_2$ , especialmente a proteína LFA-1 ( $\beta_2\alpha_L$  ou CD11a/CD18) e o Mac-1 ( $\beta_2\alpha_m$  ou CD11b/

CD18), presente na membrana do neutrófilo, que se liga com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54) presente na membrana das células endoteliais, sendo outro ligante do LFA-1, a ICAM-2 (CD102). Porém, de acordo com Halai et. al., as moléculas de adesão neutrofilicas têm sido pouco estudada, bem como outras moléculas de adesão celular existentes nas células endoteliais (ESAM, JAM-A, JAM-C PECAM-1) (MAYADAS et al., 2013; MANTOVANI et al., 2011; ABBAS et al., 2011).

A firme adesão entre as células garante uma alta afinidade entre os ligantes e uma capacidade aumentada de responder aos sinais intracelulares, controlando várias funções celulares, incluindo mobilidade, proliferação e apoptose (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

Firmemente ligado, o neutrófilo estende-se e rola por entre os poros endoteliais, dando início à migração para o tecido através de dois mecanismos distintos: a transmigração paracelular (entre as junções da células endoteliais) e a transcelular (através da célula endotelial). Ambas formas de transmigração necessitam passar por três barreiras: pelas células endoteliais que estão envolvidas, pela membrana basal e pelo pericito, sendo que diferenças no fenótipo e quantidade de pericito podem causar alteração na composição da membrana basal das células endoteliais em diferentes áreas ao longo do endotélio, resultando em áreas onde a migração pode ser facilitada ou suprimida (MAYADAS et al., 2013; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

A interação das integrinas do neutrófilo com as diferentes moléculas de adesão celular (ICAM-1, ICAM-2), molécula de *adesão* celular *vascular*-1 (VCAM) na célula endotelial, e as diferentes proteínas de junção, como a PECAM1, as moléculas de adesão juncional (JAMs) e as moléculas de adesão celular epiteliais (ECAM), molécula CD99, juntamente com outros componentes do citoesqueleto (vinculina e  $\alpha$ -actina), ajudam a promover a transmigração pelo endotélio por formar projeções endoteliais ricas nessas moléculas, conhecida como estruturas de atração ou *transmigratory cups* (KENNEDY; DELEO, 2009; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; LEY et al., 2007).

A migração paracelular depende dos domínios formados no endotélio, os *transmigratory cups*, nos quais o LFA-1 presente nos neutrófilos se liga às moléculas de adesão das células endoteliais. As moléculas de adesão ficam em uma região específica da célula que permite a formação de grandes domínios que cercam o neutrófilo durante a transmigração, e a ligação interendotelial é diminuída facilitando a migração do neutrófilo. Inúmeras outras

moléculas estão envolvidas nesse processo paracelular, entretanto o funcionamento desse envolvimento ainda não foi bem esclarecido (MAYADAS et al., 2013; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

Outra via de transmigração paracelular é o aumento dos níveis de  $Ca^{+}$  intracelular do endotélio. Esse aumento promove a abertura de canais entre a célula endotelial através da ativação da enzima quinase de cadeia leve de miosina, que, após fosforilação das cadeias leves de miosina, respondem com a alteração da concentração de  $Ca^{+}$  da célula endotelial, permitindo a transmigração (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

A via transcelular representa uma rota que é feita por uma minoria de células, em que extensões da membrana do neutrófilo penetram a célula endotelial por pequenas passagens associadas à membrana, localizadas nos locais de adesão entre essas células, chamadas de organela vesículo-vacuolares (VVOS), sugerindo que esse tipo de migração está associado a sítios onde provavelmente as junções endoteliais são estreitas e/ou impenetráveis (AMULIC et al., 2012; MAYADAS et al., 2013; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013; SZABADY; MCCORMICK, 2013).

### 3 CAPACIDADE DE MATAR

O neutrófilo apresenta em sua membrana receptores Fc (F $\gamma$ RIIa/ CD32, F $\gamma$ RIIb/ CD16 e F $\gamma$ RIV), capazes de identificar mediadores solúveis oriundos do sistema complemento, e imunoglobulinas IgG, que agem com a função de opsonização do microrganismo, assim, sinalizam a presença do mesmo para as células presentes que vão se ligar à porção Fc da IgG e apresentar uma cauda citoplasmática contendo ITAMs, que, ao ligar o Ac, ativam uma cascata de fosforilação de tirosina quinases responsáveis pela ativação de NADPH oxidase, polimerização da actina e secreção de grânulos (DIACOVO et al., 1996; STROKA et al., 2013).

Há também receptores de complemento (CR) e receptores da família das integrinas  $\beta$ 2 (Mac-1), que ligam-se a partículas opsonizadas por fragmentos C3b inativados (iC3b), resultando na ativação do sistema complemento e na intensificação da fagocitose desses microrganismos pelo neutrófilo (DIACOVO et al., 1996; STROKA et al., 2013).

Esses receptores são encontrados dentro das vesículas secretórias, que, após fusão com a membrana plasmática, expõem todo o seu conteúdo para o meio exterior, ajudando na migração para o tecido e na consequente fagocitose

(AMULIC et al., 2012; STROKA et al., 2013; CARMAN et al., 2007).

Após o reconhecimento do microrganismo, o neutrófilo inicia a fagocitose por extensão de pseudópodes, mecanismo mediado via receptores FcγR e CR que envolve alvos IgG opsonizados, em que, após a ligação com o receptor, parecem se “afundar” no meio intracelular em fagossomos, que se unem aos grânulos citoplasmáticos, iniciando a maturação do fagossomo, o que dará origem ao fagolisossomo, que assume uma capacidade microbicida, levando à degradação do seu conteúdo, seja por meio do arsenal granular dos neutrófilos ou pela formação de ROS (MAYADAS et al., 2013; BORREGAARD, 2010; DIACOVO et al., 1996; STROKA et al., 2013; LEE et al., 2013).

Os grânulos citoplasmáticos são classificados de acordo com sua afinidade com o corante azul A, seu tamanho, sua morfologia e pela presença da MPO e são muito importantes no processo de migração celular por conter uma quantidade elevada de receptores na vesícula secretória e proteínas importantes, necessárias para facilitar a passagem pela membrana basal das células endoteliais (BORREGAARD, 2010; STROKA et al., 2013). São distribuídos em três grandes grupos: primários, também conhecidos como azurófilos ou MPO-positivos (contém mieloperoxidase, defensinas, lisozima, neutrófilo elastase, BPI, protease 3 e catepsina 3); secundários, MPO-negativos ou específicos (lactoferrina e lisozima); e terciários, MPO-negativos ou gelatinase (têm poucas proteínas antimicrobicidas, porém serve como estoque de metaloproteínas, tais como gelatinase) (BORREGAARD, 2010; DIACOVO et al., 1996; CARMAN et al., 2007).

Já a produção de ROS acontece na membrana plasmática do fagolisossomo por um processo chamado *burst oxidativo*, que é dependente da participação de todos os grânulos, principalmente dos específicos, pois eles apresentam o citocromo b<sub>558</sub> em sua membrana, que, ao fundir-se com o fagossomo, torna um componente essencial na formação da NADPH oxidase, possibilitando o transporte de elétrons entre o NADPH no citoplasma para o O<sub>2</sub> presente no lúmen do fagossomo, colaborando para a principal atividade desse complexo, a geração de superóxido de oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) através da redução molecular do oxigênio (O<sub>2</sub>) (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011).

O O<sub>2</sub><sup>-</sup> é rapidamente catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ou pode ainda reagir com o óxido nítrico (NO) e formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Também reage com a MPO vinda

dos grânulos azurófilos, que atua na catálise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso (HOCl) ou na oxidação de ânions (I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) localizados nos fluídos biológicos. Assim, o O<sub>2</sub><sup>-</sup> é uma molécula muito importante por desempenhar papel inicial na cascata de reações que se seguem para a produção e liberação de ROS. Tais moléculas, dotadas de um forte poder oxidativo com capacidade bactericida ou bacteriostática, são liberadas no meio intracelular ou no meio extracelular através da fagocitose frustrada, e todo o conteúdo dos grânulos primário, secundário e os produtos oxidantes formados durante o *burst oxidativo* são lançados para o tecido causando danos extensivos às células hospedeiras (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011; BORREGAARD; COWLAND, 1997; HAMPTON et al., 1998).

#### 4 RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

Uma vez que o processo inflamatório atinge o seu objetivo, a remoção do agente patogênico, a presença de imunomodulação inflamatória se faz necessária para resolver a inflamação e devolver a homeostase ao tecido. Porém, quando esta é insuficiente, pode levar à destruição tecidual secundária, contribuindo com a cronicidade de diversas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (BOGDAN et al., 2000).

O primeiro passo para a resolução da inflamação é o cumprimento de um programa de morte celular, apoptose, cuja principal meta é eliminar os neutrófilos que já cumpriram sua agenda antimicrobiana, além de gerar um efeito secundário através da produção de sinais da célula apoptótica. No processo, o fluxo de neutrófilos para o local inflamado é interrompido, e aumentado o recrutamento de macrófagos, alterando o fenótipo dessas células de um estado pró-inflamatório (M1) para um fenótipo anti-inflamatório (M2) (BOGDAN et al., 2000; WINTERBOURN; KETTLE, 2013; HURST, 2012).

A apoptose dos neutrófilos, assim como das demais células, é um processo não inflamatório caracterizado pela perda de grânulos citoplasmáticos, surgimento de projeções exofíticas na superfície da membrana, e condensação da heterocromatina nuclear. A indução desse processo pode ocorrer via múltiplos mecanismos regulados por sinais vindos do interior celular, também conhecidos por apoptose espontânea ou constitutiva, ou do exterior da célula, ambos levando à ativação de caspases-3, 8 e 9 (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

O neutrófilo recebe estímulos pró-sobrevivência (G-CSF e GM-CSF) e pró-apoptose, porém, dependendo das suas condições, acaba seguindo uma das vias, podendo aumentar ou diminuir o seu tempo de vida (KENNEDY; DELEO, 2009).

Dentre os pró-apoptóticos podemos citar sinais intrínsecos como a via predominante de apoptose: realizada quando os níveis de expressão da proteína Mcl-1 estão baixos, facilitando a degradação do proteossoma e resultando num curto período de vida do neutrófilo, ou via proteínas pró-apoptóticas do citocromo C presente nas mitocôndrias, responsáveis por ativar caspases, e ativação de proteínas da família Bcl-2 que, ao se associarem com proteínas X (BAX), têm a capacidade de interagir com a mitocôndria e, ao serem clivados, seus fragmentos interagem com outros membros desta família Bcl-2, induzindo a apoptose. ROS geradas pela NADPH oxidase também são capazes de induzir apoptose, através da ligação de TNF, FAS aos seus respectivos receptores. Iniciam a formação do complexo de sinalização de indução de morte (DISC), o que leva à ativação da NADPH oxidase e início da morte celular via caspase 8 (WINTERBOURN; KETTLE, 2013; HURST, 2012).

Os sinais extrínsecos são mediados por FAS/FASL presentes na superfície celular dos neutrófilos, onde sua interação inicia a apoptose via caspase dependente, além de inibir outros mediadores com funções pró-sobrevivência, ou mediados por TNF $\alpha$  que ligam-se aos seus receptores na membrana dos neutrófilos (TNFR), e por processos semelhantes ao FAS/FASL ativam caspases. Esses mecanismos diferem pelo fato de serem dependentes de outros fatores para que aconteça essa ativação, como o agrupamento de moléculas que levam à ativação de fatores de transcrição; e por TRAIL que ativam a apoptose via caspase dependente. (BOGDAN et al., 2000; WINTERBOURN; KETTLE, 2013; HURST, 2012).

Ao entrarem em apoptose, os neutrófilos liberam mediadores, tais como a proteína anexina (AnxA1) e lactoferrina, que cessam o recrutamento de mais células para o local inflamado, além de mediadores que liberam sinais conhecidos por “encontre-me” e “coma-me”, atraindo fagócitos para a remoção dos corpos apoptóticos. Acontece uma mudança no tipo celular presente mais abundante, que passa a ser M2, responsável pela “limpeza” do sítio infectado através da fagocitose via receptores *scavenger* e recuperação da homeostase tecidual (BOGDAN et al., 2000; EL KEBIR; FILEP, 2013; FULLERTON et al., 2013).

Mediadores lipídicos solúveis com função anti-inflamatória são sintetizados pelos neutrófilos residentes no tecido e por vários outros tipos celulares, como lipoxinas, resolvinas e protectinas, e atuam inibindo todas as funções do neutrófilo, limpam o local inflamado por induzir a maior expressão de receptores de quimicinas (CCR5) na superfície de neutrófilos apoptóticos que sequestram os quimiotraentes CCL3 e CCL5 presentes (BOGDAN et al., 2000).

A interrupção da cascata de sinalização de quimioatração de neutrófilos circulantes acontece com o objetivo de recrutar mais monócitos e M $\phi$  para o tecido, que irão sintetizar mais mediadores, aumentando assim os seus níveis de citocinas anti-inflamatórias: TGF- $\beta$  e IL-10. Devolvem a homeostase ao tecido pela promoção de proliferação celular, síntese de proteínas e remodelamento da matriz extracelular (BORREGAARD, 2010; BOGDAN et al., 2000).

## 5 SOFISTICAÇÃO E PLASTICIDADE: NEUTRÓFILOS COMO COMPONENTES DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO?

Até então, os neutrófilos vinham sendo estudados como componentes exclusivos da resposta imune inata, tendo pouca ou nenhuma participação na ativação e modulação da resposta imune adaptativa, o que pode ser devido à dificuldade no cultivo celular *in vitro* dessas células pelo curto período de vida que elas apresentam. Adicionalmente, o aparecimento de novos estudos colocam o neutrófilo agindo ativamente em fases da resposta imune em que se pensava serem desempenhados somente por outras células. As citocinas imunorreguladoras liberadas pelos neutrófilos são capazes de comandar a rede de sinalização e interagir com as outras células do sistema imune modulando sua resposta, tais como os macrófagos, células dendríticas, natural killer e linfócitos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; RAVICHANDRAN, 2011).

## 6 NEUTRÓFILO COMO CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENOS (APC)

Células como os M $\phi$ , DC e linfócitos B já são descritas na literatura como APCs, entretanto, estudos recentes *in vitro* de cultura de neutrófilos com moléculas estimuladoras, o GM-CSF e o IFN $\gamma$ , demonstram a capacidade de os neutrófilos diferenciarem em um tipo único de neutrófilo híbrido, aparecendo com dupla funcionalidade: como fagócito e como APC por expressarem MHC II e moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) necessárias para ativação

de linfócitos T, assim como as células especializadas na apresentação de antígenos expressam, mas não deixam de exercer suas funções clássicas de fagócitos (WRIGHT et al., 2010; MATSUSHIMA et al., 2013).

Até então, neutrófilos e linfócitos T vêm sendo tratados como membros de compartimentos diferentes dentro da ativação da resposta imune, mas existe comunicação entre essas células (MÜLLER et al., 2009).

Matsushima et al. investigaram a expressão de MHC II por neutrófilos, e em seu trabalho demonstrou que neutrófilos de camundongos purificados da medula óssea cultivados com GM-CFS resultam em uma célula híbrida que expressa marcadores pertencentes aos neutrófilos (Ly6G, CXCR2, e 7/4) e às células dendríticas (CD11c, MHCII, CD80, e CD86), adquirindo um fenótipo duplo. Esses neutrófilos agem como DC por apresentar MHC II e moléculas coestimuladoras, além de exibir morfologia semelhante a essas células, como a formação de podossomos, produção de IL-12 e outras citocinas produzidas pelos DC, mas os híbridos mantêm as suas funções naturais como fagócito (MATSUSHIMA et al., 2013).

Em estudos nos quais neutrófilos humanos são purificados e cultivado *in vitro* juntamente com diferentes citocinas, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, têm se encontrado na membrana dessas células marcadores expressos na superfície de APCs (FANGER et al., 1997; OEHLER et al., 1998; GENG et al., 2013).

### 6.1 NEUTRÓFILO X MACRÓFAGOS

Os neutrófilos atraem os monócitos circulantes por gerar sinais quimiotáticos para esse tipo celular através de ligantes de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL19, CCL20); influenciam na expressão de moléculas de adesão, aumentando a sua permeabilidade; além de influenciar na diferenciação dos macrófagos entre fenótipos de células pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo da fase em que se encontra o processo inflamatório (BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A fagocitose de neutrófilos apoptóticos leva ao aumento da produção de IL-10 sintetizada pelos macrófagos, típica citocina secretada por M2, levando a um maior recrutamento de monócitos circulantes e aumento do poder antimicrobiano desse leucócito por meio de proteínas liberadas dos grânulos do neutrófilo (MAYADAS et al., 2013; BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

### 6.2 NEUTRÓFILO X CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC)

Em estudos *in vitro* com cultura de neutrófilos de camundongos, tem-se evidenciado que através da liberação de moléculas quimiotraentes para DC, tais como o ligante de quimiocina CCL3 e CCL5, os neutrófilos promovem a migração dessas células para o local da infecção. A ativação de DC por interação pode ser por contato dependente e liberação de IL-12 ou independente de contato, e a maturação das DC dá-se via produção de TNF- $\alpha$  secretado pelos neutrófilos, que culmina na mais efetiva apresentação de antígenos aos linfócitos T nos linfonodos pelas DC, que, após o processo de maturação, irão secretar TNF- $\alpha$  e IL-12, conduzindo a uma resposta imune do tipo Th<sub>1</sub> (MAYADAS et al., 2013; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; SOEHNLEIN, 2009; CHARMOY et al., 2010; NATHAN, 2006).

O neutrófilo pode induzir a maturação de DC pela liberação de grânulos, seja na desgranulação ou durante a NETose, ou também por ingestão de elevada quantidade de neutrófilos apoptóticos contendo microrganismos, que servem para estimular a apresentação de antígenos. A inibição da ativação pode ocorrer por fagocitose de neutrófilos apoptóticos pelas DC, o que afeta a expressão de moléculas coestimuladoras nessas células, comprometendo a apresentação de antígenos (NATHAN, 2006).

O contato célula a célula permite a interação de moléculas de adesão presentes nos neutrófilos (CD18 e Mac-1) e nas DC derivadas de monócitos (DC-SIGN e ICAM-1), resultando na maturação das DC com potencial de indução e proliferação de fenótipo Th1 da resposta imune, podendo essa interação ocorrer tanto no tecido como no linfonodo. Além disso, os neutrófilos podem colaborar com a apresentação de antígenos no linfonodo ao migrarem para esse órgão e podem competir por antígenos com as DC (BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; NATHAN, 2006).

### 6.3 NEUTRÓFILO X LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>

As células componentes da imunidade inata desempenham papel importante durante a infecção, porém, tornam-se insuficientes dependendo da patogenicidade do microrganismo. Assim, células da imunidade adaptativa passam a conduzir a resposta imunológica ao patógeno por serem muito mais específicas e diversas ao responderem a

uma variedade grande de diferentes antígenos (AARESTRUP, 2012).

A interação entre linfócitos T e PMNs está diretamente relacionada com a apresentação de antígenos e a ativação dessas células; os neutrófilos, por sua vez, têm a habilidade de atrasar o processo de apoptose e migrar para os linfonodos, que, na presença de LT, passam a expressar MHC-II, moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) e apresentam peptídeos antigênicos à célula T, ativando-a e induzindo a proliferação de clones via mediadores imunorreguladores que direcionam a uma resposta celular que pode ser Th<sub>1</sub> ou Th<sub>17</sub> (MÜLLER et al., 2009; FANGER et al., 1997; BENNOUNA et al., 2003).

O mecanismo de indução da resposta Th<sub>17</sub> pelos neutrófilos ainda não é bem descrito, mas sabe-se que neutrófilos apoptóticos e/ou fagocitados por APC levam à produção de citocinas imunorreguladoras pró-inflamatórias que conduzem a esse tipo de resposta. As principais são IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , mas outras citocinas também podem estar envolvidas nessa via, como TNF- $\alpha$ , CXCL8, G-CSF e GM-CSF. Citocinas como IL-17, CXCL8, G-CSF, e GM-CSF levam ao recrutamento e ativação de neutrófilos, estabelecendo uma relação recíproca no recrutamento dessas células para o local infectado, pois a diminuição de IL-23 liberadas durante a fagocitose de neutrófilos por M $\phi$  ou DC levam ao aumento da produção de IL-17, que, por sua vez, estimulam o aumento de G-CSF conduzindo a uma maior mielopoiese. Assim, estabelece-se uma via de comunicação de mão dupla, em que neutrófilos ativam e expressam ligantes quimiotáticos (CCL20 e CCL2) para LTh<sub>17</sub> e LTh<sub>17</sub> mantém os níveis de neutrófilos no tecido por produção de IL-17 (AMALUC et al., 2012; BENNOUNA et al., 2003; SCHUSTER et al., 2013; ABI ABDALLAH et al., 2011).

Pelletier et al. fizeram experimentos com cultura de neutrófilos humanos altamente purificados, testando a quimiotaxia de subtipos de LTh (Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> e Th<sub>17</sub>) e neutrófilos simulando a diapedese. O sobrenadante da cultura de neutrófilos foi incubado com diferentes ligantes de quimiocina, tais como CCL20, CCL2, CXCL8 e CXCL10, responsáveis pela quimiotaxia dos linfócitos avaliados no ensaio, e, após incubação com os clones de LTh e neutrófilos, fez-se a contagem de linfócitos que migraram. A partir dos resultados obtidos com o experimento, notou-se que os neutrófilos não são capazes de atrair Th<sub>2</sub>, pois não produzem seus respectivos ligantes quimioatraentes CCL17 e CCL22, mas são eficazes em recrutar Th<sub>1</sub> e Th<sub>17</sub>

pela expressão de CCL2, CXCL10 e CCL8 (PELLETIER et al., 2010; RENDON; CHOUDHRY, 2013).

Essa via bidirecional de interação entre neutrófilos e células T não conduz somente à ativação e diferenciação dos linfócitos, ela também pode levar à supressão dessas células dependente de contato, como demonstrou Thewissen e colaboradores. Em seus experimentos, através de cocultura celular de neutrófilos com linfócitos e também com o cultivo de linfócitos e o sobrenadante do cultivo de neutrófilos, pôde ver que quando LT CD4<sup>+</sup> cultivados com neutrófilos acontece um maior declínio na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> do que quando cultivados somente com o sobrenadante, o que os levou a uma hipótese de supressão dessas células por um mecanismo que necessita do contato entre elas (PELLETIER et al., 2010).

A supressão da proliferação de LT CD4<sup>+</sup> é via L-arginina dependente de arginase, sendo a L-arginina um aminoácido que pode ser metabolizado por duas enzimas, a arginase e a óxido nítrico sintetase (NOS). Os neutrófilos contêm altas quantidades de arginase I em seus grânulos azulofílicos, assim, quando ele sofre desgranulação, libera essa enzima que hidrolisa a L-arginina extracelular, sofrendo depleção, levando à supressão de células T. A liberação de ROS intermediárias, como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), também pode suprimir LT (RAVICHANDRAN, 2011; MÜLLER et al., 2009; PELLETIER et al., 2010; RENDON; CHOUDHRY, 2013; KUMAR; SHARMA, 2010; THEWISSEN et al., 2011).

## 7 NETOSE, UMA NOVA FORMA DE MORTE CELULAR?

Brinkmann et al., através de estudos com bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*), mostraram que neutrófilos geram fibras extracelulares, compostas por constituintes dos grânulos e material nuclear, chamadas de “neutrophil extracellular traps” (NETs), que são responsáveis por matar bactérias extracelularmente. Os grânulos intracitoplasmáticos liberados pertencem ao tipo de grânulos primários, secundários e terciários, isso inclui a presença de MPO, BPI, elastase, lactoferrina e gelatinase, mas não foram encontrados proteínas citoplasmáticas como actina, tubulina e várias outras, sendo o DNA (histonas e cromatina) o maior componente estrutural de NETs (BRINKMANN et al., 2004). A capacidade antimicrobiana foi demonstrada por imunomarcagem do complexo H2A- H2B-DNA e da

elastase, onde as bactérias foram encontradas presas nessa rede extracelular de DNA e proteínas granulares (PILLAY et al., 2013).

A formação de NET caracteriza a descoberta de uma nova estratégia de morte celular e de remoção de patógenos (bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e parasitas). A sua formação é estimulada diretamente pela presença do microrganismo ou indiretamente pela presença de LPS e plaquetas ativadas via TLR-4. Assim, dentro de poucos minutos, aproximadamente 10 minutos depois da ativação, a NET está pronta para ser liberada, fazendo esse tipo de morte celular conhecido como NETose ser mais rápido que a apoptose (PILLAY et al., 2013; MUNDER et al., 2014).

Ainda não é claro os mecanismos moleculares pelos quais se dá a formação de NET, mas sabe-se que os neutrófilos seguem os estímulos vindos do microrganismo e “decidem” seguir essa via como última opção. Primeiro fagocitam, depois fazem a desgranulação e, por fim, entram em apoptose ou NETose (PILLAY et al., 2013; MUNDER et al., 2014).

A NETose inicia-se no interior dos neutrófilos, onde a membrana nuclear se destaca e separa os lóbulos do núcleo; a cromatina descondensa e ocorre a perda da integridade da membrana nuclear que se desagrega dentro das vesículas, onde a desintegração dos grânulos está ocorrendo concomitantemente; o material do nucleossoma e das vesículas misturam-se com o citoplasma, formando uma massa homogênea; logo depois ocorre o rompimento da membrana celular, e essa massa formada é ejetada no meio extracelular formando NETs, uma rede de filamentos fibrosos lisos com diâmetros de aproximadamente 17 nm (Brinkmann et al., 2004) compostos de um amontoado de nucleossomas e domínios contendo proteínas granulares e ocupam um espaço de 10 a 15 vezes maiores que o volume das células que as originam (AMALUC et al., 2012; PILLAY et al., 2013; BRINKMANN et al., 2004).

A atividade microbicida das NETs está associada com a capacidade de inativar proteínas microbianas, conhecidas como “fatores de virulência”, cuja função é alterar algumas de suas funções da célula hospedeira. NETs clivam fatores de virulência e neutralizam alguns dos efeitos prejudiciais ao hospedeiro, entretanto, o microrganismo não é morto, ele continua vivo, mas encontra-se atenuado (PILLAY et al., 2013; BRINKMANN et al., 2004; PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009).

A liberação de NETs trazem vantagens para as células hospedeiras por conter os patógenos, minimizar o dano ao tecido em relação ao mecanismo de liberação de proteínas antimicrobianas na desgranulação e por ajudar na modulação da resposta imune. Porém, danos associados a esse tipo de morte celular podem trazer muitos prejuízos aos indivíduos que sofrem de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, lúpus e vasculite, pois NETs são uma fonte permanente de autoantígenos, o que propicia a formação de imunocomplexos e, em contrapartida, ativa DC plasmocitoide, que secretam altas quantidades de IFN1, conduzindo a uma resposta pró-inflamatória exacerbada e maléfica para os portadores desse tipo de patologia (MUNDER et al., 2014; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2012).

## 8 O NEUTRÓFILO NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA

A ausência de resolução da inflamação, por motivos diversos, levam à persistência de neutrófilos no tecido, sejam ativados ou mortos, e se persistirem por períodos longos, evoluem para condições patológicas crônicas. Isso ocorre porque no tecido inflamado os produtos bacterianos, juntamente com as citocinas, tais como G-CSF, GM-CSF, TNF, e IFN, formam um microambiente propício a estimular a sobrevivência dos neutrófilos, vindo a contribuir para a cronicidade da inflamação (MAYADAS et al., 2013; MENEGAZZI et al., 2012).

Um possível uso anti-inflamatório terapêutico dos neutrófilos vem sendo até agora melhor compreendido nas doenças pulmonares crônicas obstrutivas (DCOP) e na artrite reumatoide (AR), sendo o objetivo da terapia suprimir a inflamação através da depleção de neutrófilos, visto que em pacientes com AR a elevada quantidade de neutrófilos presentes no líquido sinovial das junções vem colaborar para formação de imunocomplexos, responsáveis por amplificar a resposta imune. Adicionalmente, a presença de NET depositadas nessas áreas destroem o tecido em resposta à inflamação, e são fontes de autoantígenos, levando à cronicidade da doença (KENNEDY; DELEO, 2009; SOEHNLEIN, 2009; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2012).

A asma é uma doença respiratória que exhibe uma fase de inflamação aguda e crônica das vias aéreas resultando na sua obstrução pela produção exacerbada de muco, é caracterizada por uma resposta Th<sub>2</sub> e pela presença

predominante de eosinófilos. A presença de neutrófilos em quantidades substanciais no muco de pacientes asmáticos crônicos nas fases mais severas e terminais ainda não são bem explicadas (SHELEF et al., 2013; CAIELLI et al., 2012; BESNARD et al., 2012).

O papel dos neutrófilos na obstrução das vias aéreas ainda não foi esclarecido. Nabe et al. sugeriram, baseado em seus experimentos, que são os neutrófilos e não os eosinófilos responsáveis pela indução da resposta asmática tardia (LAR). Usando um modelo animal de asma em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina (OVA), pôde-se evidenciar a recorrência da presença de altas taxas de neutrófilos em camundongos sensibilizados após o quarto desafio realizado, sendo que do primeiro ao terceiro desafio a inflamação é caracterizada por infiltrado de eosinófilos e de células TCD4<sup>+</sup>, e somente durante o quarto desafio a infiltração de neutrófilos nas vias aéreas apareceu contribuindo para a indução da LAR, e a diminuição no número de eosinófilos não inibiu que a LAR fosse induzida, suportando ainda a mais a possibilidade de os neutrófilos serem os principais responsáveis por essa indução (FOLEY; HAMID, 2007; NABE et al., 2011).

Ainda não está esclarecido o papel modulatório do neutrófilo na patogênese da asma, mas sabe-se que ele é recrutado via IL-8 secretada pelas células epiteliais do pulmão, e que essas células liberam citocinas como o TNF- $\alpha$  e o TGF- $\beta$ , e ROS responsáveis por causar injúria às vias aéreas e induzir a hipersecreção. Os neutrófilos podem estar associados à indução da resposta Th<sub>2</sub> por produzirem IL-9, uma citocina regulatória de Th<sub>2</sub> que também tem atividade sobre outros PMNs, como os eosinófilos típicos nesse tipo de doença (CAIELLI et al., 2012; BESNARD et al., 2012).

## 9 CONCLUSÃO

A partir do ano 2000, inúmeros achados sobre a biologia dos neutrófilos nos levam a repensar suas funções e rever o potencial dessas células (WOODRUFF; FAHY, 2002).

Ao formarem a primeira linha de defesa imunológica tecidual, os neutrófilos eram identificados somente como um componente passivo da resposta imune inata responsável por conduzir a inflamação aguda nos tecidos. Porém, a sua presença, seus mediadores regulatórios, a síntese de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, a presença de MHC-II para apresentação de antígenos, a ativação e indução de diferenciação de LT CD4<sup>+</sup>, o retardo do processo de apoptose, e a liberação de NET durante

a NETose, conduzem a uma nova visão sobre as funções dessas células e a plasticidade que elas têm em orquestrar a resposta imune por mecanismos antes atribuídos às outras células da imunidade inata (WRIGHT et al., 2010; GENG et al., 2013).

A maioria dos experimentos com neutrófilos ocorre sob condições experimentais (*in vitro*), sendo este um método que por si só não é capaz de esclarecer os mecanismos envolvidos na versatilidade dos neutrófilos, isso porque os neutrófilos são células cujo tempo de vida é muito curto, dificultando o cultivo celular e a realização de testes com uma abordagem molecular e genética mais apropriada (MAYADAS et al., 2013).

A versatilidade dos neutrófilos ainda não é comprovada *in vivo*, e diversos estudos usando modelos de depleção de neutrófilos com camundongos nos levam a alguns questionamentos relevantes sobre a compatibilidade com os neutrófilos humanos. Primeiro: a diferença existentes entre os neutrófilos murinos e os humanos; segundo: a especificidade do anticorpo (RB6-8C5) usado para depleção de neutrófilos (NATAN, 2006; NABE et al., 2011).

Neutrófilos murinos diferem dos humanos por representarem cerca de 50%-70% dos leucócitos presentes na circulação, apresenta uma hipersegmentação do núcleo em relação aos humanos, enquanto nos humanos essa taxa é muito inferior, cerca de 10%-20%, além de o neutrófilo murino secretar citocinas, como a IL10, a qual não é sintetizada por neutrófilos humanos quando em contato com células DC. (KUMAR; SHARMA, 2010; WOODRUFF; FAHY, 2002).

Usando anticorpos mAb RB6-8C5 contra Gr-1 (Lyn6G) faz-se a depleção de neutrófilos, mas também de outros leucócitos, isso porque os marcadores celulares Gr-1 são expressos na membrana celular em quantidades diferentes, sendo os neutrófilos Gr-1<sup>High</sup> e os outros leucócitos Gr-1<sup>Low</sup>. Logo, a depleção de outros leucócitos pode levar a um comportamento no camundongo que não se repete no humano, ainda é preciso desenvolver estudos com uso de camundongos *knockout* (Gfi1<sup>-/-</sup>) para trazer uma melhor abordagem e assim descrever os processos moleculares que estão por trás dessa versatilidade dos neutrófilos (MAYADAS et al., 2013; KUMAR; SHARMA, 2010; WOODRUFF; FAHY, 2002; MÓCSAI, 2013).

Todos os estudos *in vitro* ou *in vivo* trazem novas perspectivas sobre as funções imunorregulatórias e sobre a plasticidade dos neutrófilos nas reações imunológicas normais e patológicas; tais estudos possibilitaram nova compreensão

sobre o papel dos neutrófilos na imunidade inata, bem como sua função como célula efetora na imunidade adaptativa, criando uma via bidirecional, ao mesmo tempo separadas por sua diversidade e especificidade, e interligadas por mediadores regulatórios e por interação célula-célula.

## 10 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. **Histologia essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 209-227.
- ABI ABDALLAH, D. S. et al. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. **International Immunology**, v. 23, n. 5, p. 317-326, maio 2011.
- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 125-130.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review Of Immunology**, v. 30, p. 459-489, jan. 2012.
- BENNOUNA, S. et al. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **J. Immunol.**, v. 171, p. 6.052-6.058, 2003.
- BESNARD, A.-G. et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 3-10, fev. 2012.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64-76, mar. 2000.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 24 nov. 2010.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood Journal**, v. 89, n. 10, p. 3.503-3.521, 15 maio 1997.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science, New York**, v. 303, n. 5.663, p. 1.532-1.535, 5 mar. 2004.
- BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? **The Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 773-783, 3 set. 2012.
- CAIELLI, S.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 671-677, dez. 2012.
- CARMAN, C. V. et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 784-797, jun. 2007.
- CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000755, fev. 2010.
- DIACOVO, T. G. et al. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. **Blood**, v. 88, n. 1, p. 146-157, 1 jul. 1996.
- EL KEBIR, D.; FILEP, J. G. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through  $\beta 2$  integrins. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 60, jan. 2013.
- FANGER, N. A. et al. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. **Blood Journal**, v. 89, p. 4.128-4.135, 1997.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1.317-1.327, nov. 2003.
- FOLEY, S. C.; HAMID, Q. Images in allergy and immunology: neutrophils in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 5, p. 1.282-1.286, maio 2007.
- FULLERTON, J. N.; O'BRIEN, A. J.; GILROY, D. W. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. **The Journal of Pathology**, v. 231, n. 1, p. 8-20, set. 2013.
- GENG, S. et al. Reciprocal regulation of development of neutrophil-dendritic cell hybrids in mice by IL-4 and interferon-gamma. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e82929, jan. 2013.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3.007-3.017, 1 nov. 1998.
- HURST, J. K. What really happens in the neutrophil phagosome? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 53, n. 3, p. 508-520, 1 ago. 2012.
- KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, jan. 2009.
- KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.**, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, mar. 2013.

- KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1.325-1.334, 2010.
- LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1.299-1.306, nov. 2003.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, set. 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, ago. 2011.
- MATSUSHIMA, H. et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. **Blood**, v. 121, n. 10, p. 1.677-1.689, 7 mar. 2013.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181-218, 16 set. 2013.
- MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 7, p. 1.283-1.299, 1 jul. 2013.
- MÜLLER, I. et al. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 522-530, nov. 2009.
- MUNDER, M. et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. **Blood**, p. 1.627-1.634, 2014.
- NABE, T.; HOSOKAWA, F.; CHAPLIN, D. D. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. **Life Sciences**, v. 88, p. 1.127-1.135, 2011.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, mar. 2006.
- NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 271-284, ago. 2011.
- OEHLER, L.; MAJDIC, O.; PICKL, W. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 7, p. 1.019-1.028, 1998.
- ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO molecular medicine**, v. 5, n. 5, p. 661-674, maio 2013.
- PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 513-521, 2009.
- PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335-343, 14 jan. 2010.
- PILLAY, J. et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 70, n. 20, p. 3.813-3.827, out. 2013.
- RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 445-455, 28 out. 2011.
- RENDON, J. L.; CHOUDHRY, M. A. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. **PMC**, p. 1-17, 2013.
- SCHUSTER, S.; HURRELL, B.; TACCHINI-COTTIER, F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 671-675, out. 2013.
- SHELEF, M. A.; TAUZIN, S.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration: moving from zebrafish models to human autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 256, n. 1, p. 269-281, nov. 2013.
- SOEHNLEIN, O. An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 511-512, nov. 2009.
- STROKA, K. M.; HAYENGA, H. N.; ARANDA-ESPINOZA, H. Human neutrophil cytoskeletal dynamics and contractility actively contribute to trans-endothelial migration. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e61377, jan. 2013.
- SZABADY, R. L.; MCCORMICK, B. A. Control of neutrophil inflammation at mucosal surfaces by secreted epithelial products. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 220, jan. 2013.
- THEWISSEN, M. et al. Neutrophils and T cells: bidirectional effects and functional interferences. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 15-16, p. 2.094-2.101, set. 2011.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-660, 20 fev. 2013.
- WOODRUFF, P. G.; FAHY, J. V. A role for neutrophils in asthma? **The American Journal of Medicine**, v. 112, n. 6, p. 498-500, 2002.
- WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, Oxford, England, v. 49, n. 9, p. 1.618-1.631, set. 2010.

SARVER, D. M. Principles of cosmetic dentistry in orthodontics: Part 1. Shapes and proportionality of anterior teeth. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedic**, St. Louis, v. 126, n. 6, p. 749-753, 2004.

SOARES, G. P.; SILVA, F. A. P. LIMA, D. A. N. L.; PAULILLO, L. A. M. S.; LOVADINO, J. R. Prevalência da proporção áurea em indivíduos adultos-jovens. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 21, p. 346-350, 2006.

STERRETT, J. D.; OLIVER, T.; ROBINSON, E.; FORTSON, W.; KNAAK, B.; RUSSELL, C. M. Width/length ration of normal clinical crowns of the maxillary anterior dentition in man. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 26, p. 153-157, 1999.

MARUBAYASHI, A. M. W.; SHINIKE, A. Y.; TERADA, H. H.; KURIHARA, E.; TERADA, R. S. S. Avaliação da proporção áurea em pacientes submetidos ou não a tratamento ortodôntico. **Revista Dental Press de Estética**, Maringá, v. 7 n. 1, p. 72-80, 2010.

VICENTI, B. L. P. N.; SCHMITT, J. O. **Verificação da Proporção Áurea em estudantes de odontologia da Unvali que utilizaram e não utilizaram dispositivo ortodôntico**. Itajaí-SC, 2006.

VINHOLI, F. C.; BONI, M. W. **Parâmetros para Otimizar a Estética do Sorriso**.(Dissertação) Campo Grande, 2011.

WARD, D. H. A study of Dentistis' Preferred Maxillary Anterior Tooth Width Proportion: Comparing the Recurring Esthetic Dental Proportion to Other Mathematical and Naturally Occuring Proportion. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, Hamilton, v. 19, n. 6, p. 324-339, 2007.