

**Braulio Lima
Diego Oliveira
Fábio Vilgil
Paulo Bittencourt
Pedro Elias
Samuel Loureiro**

**Análise da influência da temperatura na expressão gênica do receptor CD11b
em neutrófilos**

**Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
10 de dezembro de 2007**



Bráulio Henrique Freire Lima
Diego Oliveira
Fábio Antônio Borges Vilgil
Paulo Augusto Bittencourt
Pedro Elias Marques Pereira Silva
Samuel Loureiro Gontijo

**Análise da influência da temperatura na expressão gênica do receptor CD11b
em neutrófilos**

Trabalho referente à disciplina
De Biologia Molecular do 5º período
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
Orientador professor José Miguel Ortega
Realizado pelos alunos Braulio, Diego, Fábio, Paulo, Pedro, Samuel

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais
10 de dezembro de 2007

SUMÁRIO

1. Introdução -----	PÁG. 4
2. Objetivos -----	PÁG. 5
2.1. Gerais -----	PÁG. 5
2.2. Específicos -----	PÁG. 5
3. Materiais e Métodos -----	PÁG. 6
3.1. Obtenção de Neutrófilos -----	PÁG. 6
3.2 Cultivo dos Neutrófilos -----	PÁG. 6
3.3. Teste com Sephadex -----	PÁG. 7
3.4 Extração do RNA total -----	PÁG. 7
3.5 RT-PCR Geração do cDNA -----	PÁG. 8
3.6. PCR em Tempo Real -----	PÁG. 8
3.7. Nuclear Run-On-----	PÁG. 9
3.8. FACS -----	PÁG. 9
4. Orçamento -----	PÁG. 10
5. Planejamento -----	PÁG.12
6. Perspectivas futuras -----	PÁG.13
7. Referências Bibliográficas -----	PÁG.13

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a Febre tem sido uma resposta do organismo muito bem reconhecida pelos seres humanos e claramente relacionada à ocorrência de infecções. Os clássicos sintomas são: o mal-estar, a perda do apetite e hipertermia, dentre outros. Apesar do aumento da temperatura corpórea ser o aspecto mais bem reconhecido, ele provavelmente é o menos entendido da resposta febril. Até a poucos anos, nada se sabia sobre sua utilidade biológica, mesmo levando em conta sua conservação durante a Evolução em animais endotérmicos e ectotérmicos (APPENHEIMER *et al.* 2005).

Um fato interessante é a maior taxa de sobrevivência destes mesmos animais (por exemplo: ratos e lagartos) a infecções por variados patógenos. (OSTBERG & REPASKY, 2006 ; ROBERTS & STEIGBIGEL, 1977). Além destes estudos, foram realizados outros mais específicos em relação à influência da Febre sobre as células em si. Revelaram-se observações interessantes, como o aumento expressivo da produção de radicais livres e Óxido Nítrico por neutrófilos cultivados em temperaturas febris (ROSENSPIRE *et al.* 2002). Observaram-se também variações na sinalização destas mesmas células em altas temperaturas, envolvendo desde Quinase Reguladora de Sinal Extracelular (ERK) e (Fosfatidil Inositol 3 Quinase) PI3K ao Fator Nuclear Kappa B (NFkB) (SALANOVA *et al.* 2005).

Considerando então a influência da hipertermia em parâmetros importantes da resposta imunológica tais como a ativação e migração de células dendríticas e neutrófilos, proliferação de linfócitos, aumento de atividade citotóxica e a própria produção e atividade de citocinas (OSTBERG & REPASKY, 2006; DOWNING *et al.* 1987) revela-se um grande alvo de estudo, objetivando o desenvolvimento de novos fármacos e alternativas para o tratamento de infecções, doenças auto-imunes e até tumores.

Devido ao leque amplo do estudo da febre, focamos este projeto no estudo de neutrófilos por estes serem células pivotais na resposta inflamatória aguda e essenciais no desenvolvimento de muitas doenças auto-imunes. Nesta área observamos dados importantes como a influência de temperaturas febris na apoptose de neutrófilos (KETTRITZ *et al.* 2006) e a termoregulação de moléculas de adesão, como a CD11b.

A proteína CD11b pertence a família das integrinas. Elas estão presentes em monócitos, granulócitos, células NK e alguns linfócitos T e B. Juntamente com o

CD18 e CD11b forma um dímero (Mac-1) que promove adesão dos neutrófilos assim como funciona como receptor para o fator de complemento 3 denominado C3b. Esse dímero é conhecido como CR3 devido a sua função no reconhecimento do sistema do complemento (WIKO-SARSAT V. *et al.* 2000). C3b é uma componente importante da via alternativa do sistema do complemento e auxilia no processo de opsonização de bactérias. Uma vez ativado o receptor CR3 estimula diversas funções do neutrófilo como a resposta oxidativa ou fagocitose. A proteína CD11b possui papel importante, também, na adesão dos neutrófilos ao endotélio dos vasos. A adesão é uma etapa essencial do processo migração da célula, o que possibilita que ela realize sua função de proteção do organismo. Sabe-se que a expressão da CD11b na membrana dos neutrófilos é termo-dependente. Sua expressão na membrana é diminuída pelo aumento de temperatura, mas aumentada pela diminuição da mesma, uma vez que o neutrófilo tenha sido ativado por TNF- α (DIETER FROHLICH, *et al.* 2004).

Considerando estas informações, percebe-se um grande potencial farmacológico no estudo da CD11b, que constitui um possível tratamento alternativo para muitas doenças inflamatórias sem tantos efeitos colaterais e prejuízos para os pacientes. Apesar das referências sobre a CD11b na literatura, nenhum dos estudos abrangeu o controle gênico dessa molécula, portanto, esse é o foco deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Verificar em qual etapa da expressão do receptor de membrana CD11b em neutrófilos há a regulação pela temperatura.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Obter padronização da cultura de macrófagos
- Analisar a influência da temperatura na taxa de transcrição do gene para CD11b (Técnica Nuclear Run On)
- Determinar a quantidade de mRNA para CD11b em neutrófilos em diferentes temperaturas (Real Time PCR)
- Determinar a variação da quantidade de CD11b na membrana de neutrófilos em diferentes temperaturas (FACS – Citometria de Fluxo)

- Tentar correlacionar os dados obtidos com a função fisiológica da febre

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

Este estudo usará neutrófilos humanos provenientes de voluntários, no qual um especialista irá coletar (com heparina) aproximadamente 20mL de sangue de 70 pessoas, que devem estar saudáveis e que não estiveram doentes por um período de no mínimo um mês. Logo após a coleta do sangue, os neutrófilos serão coletados seguindo o protocolo:

- I. Centrifugar todo o sangue em alíquotas de aproximadamente 10mL em tubos Falcon de 15mL a 400 g, 10 minutos a 4 °C.
- II. Ressuspender células com 15mL de HBSS-EDTA*
- III. Colocar as celular num gradiente de Percol de 78%, 69% e 52%, respectivamente, diluídos em HBSS (Percol 100% = 9 partes de Percol + 1 HBSS 10x) e centrifugar a 1500 g, 30 minutos a temperatura ambiente.
- IV. Coletar, em tubos cobertos com uma camada de BSA 1%, os neutrófilos da interface 69%/78% e os da camada superior da camada de 78%, após a retirada cuidadosa das camadas superiores.
- V. Lavar células com 5mL HBSS-EDTA + BSA1%, para eliminar eritrócitos remanescentes por lise hipotônica.
- VI. O resultado deve ser aproximadamente 1×10^7 neutrófilos por tubo, num total de 2×10^7 neutrófilos por indivíduo. Cada ensaio utilizará aproximadamente 5×10^6 células.

*HBSS-EDTA – Hanks Balanced Saline Solution (sem cálcio, magnésio, phenol red e bicarbonato de sódio); pH 7,2; 15 mM EDTA e 1% albumina sérica bovina (BSA).

3.2. CULTIVO DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos de cada indivíduo serão separados aleatoriamente em 7 grupos (cada um com 10 indivíduos) e cultivados em garrafas de cultivo celular de 50mL com a adição de 10mL de Iscove's modified Dulbecco's medium, 80% (1×10^6 células/mL); soro fetal bovino, 20%; TNF α 10ng/mL e em uma atmosfera de 8 a 9%

CO₂. Cada grupo ficará em uma temperatura diferente, que será de 36°C a 39°C com uma variação de 0,5°C entre um grupo e outro.

3.3. TESTE DE VIABILIDADE POR EXCLUSÃO COM EOSINA Y

Para garantir a viabilidade das células no momento do experimento será feito um teste da cultura com Eosina Y, o qual é um corante capaz de corar células inviáveis, mas não células viáveis. Se os neutrófilos estiverem em boas condições, eles serão capazes de exocitar esse corante, não adquirindo a coloração vermelha da eosina, revelando então sua viabilidade para a realização do experimento.

3.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Após 3 horas de repouso na estufa, separou-se 5ml de cada cultura para a extração de RNA para o ensaio de PCR em Tempo Real, que foi feito com RNeasy Mini Kit fornecido pela empresa QIAGEN da seguinte maneira:

- I. Coletar as células e homogeneizar em 600 µL de tampão RLT*:
 - Tampão altamente desnaturante contendo isotiocianato de guanidina (GITC)
- II. Centrifugar o lisado durante 3 minutos a 14000rpm.
- III. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e descartar o pellet.
- IV. Adicionar 350 - 600µL de etanol 70% ao lisado e homogeneizar.
- V. Pode ocorrer formação de um precipitado após a adição do etanol, o que não afeta o procedimento.
- VI. Aplicar 700µL da amostra em uma mini-coluna RNeasy (membrana de gel de sílica) colocada sobre um tubo de coleta.
- VII. Centrifugar a 14.000 r.p.m. por 15 segundos. Descartar o filtrado.
- VIII. Adicionar 700µL de tampão RW1 na mini-coluna e centrifugar por 15 segundos para lavar. Descartar o filtrado e o tubo de coleta.
- IX. Transferir a mini-coluna para um tubo de coleta novo. Adicionar 500µL de tampão RPE* e centrifugar a 14.00 r.p.m. por 15 segundos para lavar a coluna. Descartar o filtrado.
- X. Adicionar outros 500µL de tampão RPE e centrifugar por dois minutos a 14.00 r.p.m. para secar a membrana de gel de sílica.
- XI. O etanol residual pode interferir nas reações seguintes.

- XII. Transferir a coluna para um novo tubo de coleta de 1,5mL e adicionar 30-50 μ L de água livre de RNase diretamente sobre a membrana de gel de sílica. Centrifugar por 1 minuto a 14.000 r.p.m. Coletar o filtrado.
- XIII. Determinar a concentração do RNA da amostra com o NanoDrop;
- XIV. Armazenar a -80°C.

*O agente desnaturante β -mercaptoetanol deve ser adicionado ao tampão RLT antes do uso (10 μ L/1ml de tampão). O tampão RPE é fornecido na forma concentrada e deve ser diluído em etanol (96-100 %).

3.5. RT-PCR, GERAÇÃO DO cDNA

- Realização de *reverse transcriptase-PCR* a partir do RNA total extraído de acordo com o protocolo que vem no kit fornecido pela Invitrogen
- Usaremos um primer oligo dT₍₂₀₎.

3.6. PCR EM TEMPO REAL (G. K. Lima, 2007)

- A síntese do cDNA será procedida através do RT-PCR do RNA total extraído dos Neutrófilos da cultura controle e das culturas experimentais (variação de temperatura);
- Será usado *Primers* para os genes do CD11b e da β -actina, que está constitutivamente expresso em neutrófilos (normalizador).
- Será utilizado o kit Power SYBR Green PCR Master mix;
- Para 1 amostra, adicionar os seguintes reagentes:
- 10 μ L de Master Mix;
- 1 μ L de primer direto (5 μ M);
- 1 μ L de primer reverso (5 μ M);
- 2 μ L Amostra (template);
- 6 μ L de água.
- Programa do termociclador para:
 - I. 95°C – 10 segundos
 - II. Fazer 40 ciclos de:
 - 95°C - 15 segundos
 - 60°C -1 minuto

- III. 60°C – 10 minutos
- IV. 4°C – tempo infinito

3.7. NUCLEAR RUN ON (Ling Meng; C. Aoyama *et al.* 2003)

- A técnica de Nuclear Run-On permite uma visão da taxa transcricional in-vivo no momento do isolamento do núcleo. A técnica consiste em incubar núcleos isolados com níveis saturados de três nucleotídeos e uma quantidade reduzida de um quarto nucleotídeo marcado radiativamente. Núcleos são incubados por um período de tempo para que ocorra a transcrição e depois se isola o RNA marcado e hibridiza esse RNA com o DNA de interesse que está preso a uma membrana.
- Os núcleos isolados serão incubados em 5 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 de mM Acetato de Mg, 150 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0,2 unid./ μ l Rnase, 0.5 mM de ATP, 0.5 mM de GTP, 0.5 mM de CTP, 100 μ Ci [α -³²P] UTP a 33 °C por 30 minutos;
- RNA marcado extraído com TRIZOL, de acordo com protocolo da Invitrogen;
- O cDNA dos genes CD11b e β -actina (normalizador) serão colocados sobre uma membrana Hybond-N⁺, após ter sido desnaturado;
- O RNA marcado será hibridizado com o cDNA do gene alvo que foi colocado sobre a membrana e será visualizado por auto-radiografia.

3.8. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Materiais e equipamentos:

- PBS 1X w/o Ca²⁺ or Mg²⁺
- FACS solução permeabilizante
- Buffer: PBS com 1% soro bovino inativado por aquecimento.
- Paraformaldeído 1%.
- Anticorpos para a proteína CD11b (expressa em neutrófilos)
- Vortex mixer
- Centrífuga
- FACscan/FACscalibur

Procedimento de coloração superficial do sangue:

1. Acrescentam-se anticorpos e tetrâmeros em volumes/concentrações apropriados para os tubos de FACS.

Nota: 10µl de anticorpo para cada 100µl de sangue.

Nota: Todos os tetrâmeros são usados na concentração de 1:300

2. Alíquota 100µl de sangue para cada tubo, homogeneização em vortex (velocidade: 8) e incubação em temperatura ambiente por 10 min. A incubação deve ser feita no escuro.
3. Acrescente 2ml FACSlyse em cada tubo, passe no vortex (velocidade 5.5) incube em temperatura ambiente por 10 min.
4. Centrifugue em 1600 r.p.m. por 5 minutos a 20 °C.
5. Usando pipeta a vácuo recolha o sobrenadante e ressuspenda as células do sobrenadante (200µl) homogeneizando no vortex em alta potência por pelo menos 5 segundos (velocidade: 8).
6. Acrescente 3ml do tampão com corante para cada tubo, homogeneize gentilmente (velocidade 4.5) e centrifugue a 1600rpm por 5 minutos a 20 °C.
7. Repita mais uma vez os passos 5-6.
8. Aplicar no leitor de FACS (FACscan/FACscalibur).

4. ORÇAMENTO

Material	Qtd.	Preço (R\$) Unid.	Descrição	Total
Geral				
Máquina de café expresso	1	2799,00	Viena Digital Saeco	2799,00
Luvras descartáveis	73	9,90	100 UNID	722,70
Álcool 70%	20	9,25	5 L	185,00
Micropipetas				
P ₁₀	2	390,00	HTL. PCR Template, Uso comum	780,00
P ₁₀₀	1	360,00	HTL. Uso Comum	360,00
P ₁₀₀₀	1	390,00	HTL. Uso Comum	390,00
Ponteiras				
P ₁₀	30	232,00	Axigen. 10 Rack com 96 UNID com filtro	6960,00
P ₁₀₀	30	232,00	Axigen. 10 Rack com 96 UNID com filtro	6960,00
P ₁₀₀₀	30	232,00	Axigen. 10 Rack com 96 UNID com filtro	6960,00
Microtubos 1,5 mL	2	25,48	AXIGEN. 500 tubos	50,96
Microtubos 0,2 mL	1	98,80	AXIGEN. 1000 tubos	98,80
Fita para autoclave	1	40,50	3M. 19mmx30m. Pct com 5 UNID	40,50

Água DEPC	1	70,32	Invitrogen. 1L	70,32	
Mix PCR	1	480,17	AccuPrime™. SuperMix II - Taq, Mg ²⁺ , dNTPs - 200 Reações	480,17	
Mix RT-PCR	2	910,44	Invitrogen. Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit. 100 Reações	1820,88	
Tampão de amostra	1	22,85	Invitrogen. 20mL	22,85	
Padrão de peso molecular Ladder 100	2	220,50	Bioagency. 500µl	441,00	
				subtotal	29142,18
Cultura de células					
Bala de CO ₂	10	120,00	25Kg. Duração: 10 dias (atm 9%)	1200,00	
Garrafas	1	680,00	Biosystems. 200 UNID 25cm ²	680,00	
Pipetas Sorológicas em PS	10	48,00	Aton. 50 UNID	480,00	
Pipetador	2	1575,00	Pipet Aid modelo XP	3150,00	
Filtro para Pipet Aid	2	120,00	Drummond. Pacote com 5 UNID	240,00	
Human hcx™ TNF-alpha	1	395,55	Apollo Cytokine Research. 20µg	395,55	
Eosina Y	1	38,79	Biomeda Corporation	38,79	
HBSS	1	46,05	Invitrogen. Sem Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , vermelho de fenol e bicarbonato de sódio 0,5L 10x	46,05	
EDTA	2	85,63	Invitrogen. Ultra puro. 4x100mL	171,26	
Albumina Sérica Bovina (BSA)	1	294,36	Invitrogen. 150mg	294,36	
Percoll	1	1260,32	Sigma. 500mL	1260,32	
Iscove's modified Dulbecco's medium	1	116,50	Invitrogen. 1x10L (pó)	116,50	
Soro Fetal Bovino	2	1097,36	Invitrogen. 1000 mL	2194,72	
				sub-total	10267,55
Nuclear Run On					
Inibidor de Ribonuclease	3	142,80	RNase OUT. 5000 UNID	428,40	
ATP	2	190,00	GE Healthcare. 25µmol	380,00	
CTP	2	190,00	GE Healthcare. 25µmol	380,00	
GTP	2	190,00	GE Healthcare. 25µmol	380,00	
[α- ³² P]UTP	1	650,00	GE Healthcare. 250 Reações	650,00	
TRIzol® Plus RNA Purification System	2	678,30	Invitrogen. 50 Preparações	1356,60	
Hybond-N ⁺	2	657,00	Amersham Hyperfilm MP 13x18cm 50 UNID	1314,00	
Filme de auto-radiografia	2	768,00	GE Healthcare. 18x24 50 UNID	1536,00	
Primer CD11b	2	43,20	Primers IDT (USA) desbloqueados, dessalinizados e liofilizados. 20pb 25nmol	86,40	
Primer β-actina	2	43,20	Primers IDT (USA) desbloqueados, dessalinizados e liofilizados. 20pb 25nmol	86,40	
TRIzol® Plus RNA Purification System	2	678,30	Invitrogen. Extração de RNA total 50 Preparações	1356,60	
				sub-total	7954,40

Real Time PCR

Primer CD11b	2	43,20	Primers IDT (USA) desbloqueados, dessalinizados e liofilizados. 20pb 25nmol	86,40
Primer β -actina	2	43,20	Primers IDT (USA) desbloqueados, dessalinizados e liofilizados. 20pb 25nmol	86,40
RNeasy® Mini Kit	2	4900,00	QIAGEN	9800,00
Power Sybr Green PCR Master Mix	3	905,34	Applied Biosystems. 200 reações	2716,02
Placas para Real Time PCR	1	415,54	ABI Prism. 20 UNID, 96 wells	415,54
Cobertura adesiva	1	512,34	ABI Prism. 100 UNID	512,34
sub-total				13616,70
Imuno-Ensaio				
Anticorpo fluorescente	2	401,40	TRI COLOR. 0,5mL 100min.	802,80
Paraformaldeído	2	28,00	0,5 kg	56,00
sub-total				858,80

Total Geral 61839,63

Materiais já disponíveis

Todos os materiais para eletroforese em gel de acrilamida
Centrífugas
Vortex
Termociclador para PCR
Máquina e Software para PCR em Tempo Real
NanoDrop
Aparato para autoradiografia
Aparelho de FACS
Máquina de gelo
Estufas

5. PLANEJAMENTO

Início: JAN/2008 Término: DEZ/2010

Atividades experimentais Tempo previsto de execução

Compra do material	Jan - Mar / 2008
Padronização da cultura de neutrófilos	Abr / Jun / 2008
Padronização RT-PCR (Nuclear Run On)	Jul / 2008 - Dez / 2008
Padronização RT-PCR (Real Time PCR)	
Padronização Real Time PCR	Jan - Mar / 2009
Padronização do FACS	Abr - Jun / 2009
Execução e análise do Nuclear Run On	Jul - Set / 2009
Execução e análise Real Time PCR	Out - Dez / 2009
Execução e análise FACS	Jan - Mar / 2010
Repetir experimento	Abr - Jul / 2010
Escrever resultados	Ago - Dez / 2010

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Se a regulação da expressão do CD11b ocorrer na transcrição, tentaremos identificar o fator de transcrição envolvido através da técnica de BandShift. Porém, se a regulação ocorrer pós-transcricionalmente tentaremos, também através de BandShift, identificar o fator de degradação do mRNA.

Se conseguirmos identificar este fator e durante este período nada for descoberto, pretendemos também identificar sua via de ativação.

7. BIBLIOGRAFIA

- Appenheimer MM, Chen Q, Girard RA, Wang WC, Evans SS. Impact of fever-range thermal stress on lymphocyte-endothelial adhesion and lymphocyte trafficking. *Immunol Invest.* 2005;34(3):295-323.
- Chieko Aoyama, Kozo Ishidate, et al. *Induction of choline kinase alpha by carbon tetrachloride (CCl4) occurs via increased binding of c-jun to an AP-1 element.* *Bioch et Biophys. Acta.* 1771, 1148-1155, 2007.
- Dieter Frohlich, Sgrid Wittmann, Gregor Rothe, Daniel I. Sessler, Peter Vogel, Kai Taeder. Mild hyperthermia down-regulates receptor dependent neutrophil function. *Anesth Analg;* 2004;99:284-92
- Downing JF, Taylor MW. The effect of in vivo hyperthermia on selected lymphokines in man. *Lymphokine Res.* 1987 Spring;6(2):103-9.
- Graciela Kunrath Lima. CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE IFN γ E QUIMIOCINAS EM INFECÇÃO MURINA POR VÍRUS HERPES SIMPLEX 1. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Dissertação de Mestrado, Setembro 2007.
- Kettritz R, Choi M, Salanova B, Wellner M, Rolle S, Luft FC. Fever-like temperatures affect neutrophil NF-kappaB signaling, apoptosis, and ANCA-antigen expression. *J Am Soc Nephrol.* 2006 May;17(5):1345-53. Epub 2006 Apr 5.
- Ling MENG e PEGGY G. LEMAUX. *A Simple and Rapid method for Nuclear Run-On Transcription Assays in Plants.* *Plant Molec. Biol. Reporter.* 21:65-71, March 2003.
- Ostberg JR, Reapsky EA. Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Mar;55(3):292-8. Epub 2005 Apr 28. Review.
- Roberts NJ Jr, Steigbigel RT. Hyperthermia and human leukocyte functions:

- effects on response of lymphocytes to mitogen and antigen and bactericidal capacity of monocytes and neutrophils. *Infect Immun.* 1977 Dec;18(3):673-9.
- Rosenspire AJ, Kindzelskii AL, Petty HR. Cutting edge: fever-associated temperatures enhance neutrophil responses to lipopolysaccharide: a potential mechanism involving cell metabolism. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5396-400.
 - Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. The effect of fever-like temperatures on neutrophil signaling. *FASEB J.* 2005 May;19(7):816-8. Epub 2005 Mar 8.
 - Wiko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, et al. Neutrophils: molecules, function and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000;80:617-53
 - <http://www.appliedbiosystems.com.br>
 - <http://www.bd.com>
 - <http://www.biocompare.com>
 - <http://www.ciencor.com.br>
 - <http://www.gehealthcare.com>
 - <http://www.invitrogen.com>
 - <http://www.markets.ft.com>
 - <http://www.mercadolivre.com.br>
 - <http://www.sigmaaldrich.com>