

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE FARMÁCIA

PRISCILA CREPPAS DE SOUZA E SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES SIGLECS (*SIALIC ACID-BINDING
IMMUNOGLOBULIN-TYPE LECTINS*) E A INTERAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO-
NEURAMINIDASE EM MONÓCITOS ATIVADOS APÓS O TRATAMENTO COM
OSELTAMIVIR E ZANAMIVIR**

FLORIANÓPOLIS

2022

PRISCILA CREPPAS DE SOUZA E SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES SIGLECS (*SIALIC ACID-BINDING
IMMUNOGLOBULIN-TYPE LECTINS*) E A INTERAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO
NEURAMINIDASE EM MONÓCITOS ATIVADOS APÓS O TRATAMENTO COM
OSELTAMIVIR E ZANAMIVIR**

Trabalho de Conclusão de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

FLORIANÓPOLIS

2022

Silva, Priscila Creppas de Souza e

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES SIGLECS (SIALIC ACID BINDING IMMUNOGLOBULIN-TYPE LECTINS) E A INTERAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO NEURAMINIDASE EM MONÓCITOS ATIVADOS APÓS O TRATAMENTO COM OSELTAMIVIR E ZANAMIVIR / Priscila Creppas de Souza e Silva ; orientador, Fernando Spiller, 2022.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Inibidores de neuraminidase. 3. Siglec.
4. Sepse. 5. Monócito. I. Spiller, Fernando . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

PRISCILA CREPPAS DE SOUZA E SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES SIGLECS (*SIALIC ACID-BINDING
IMMUNOGLOBULIN-TYPE LECTINS*) E A INTERAÇÃO ÁCIDO SIÁLICO
NEURAMINIDASE EM MONÓCITOS ATIVADOS APÓS O TRATAMENTO COM
OSELTAMIVIR E ZANAMIVIR**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Profa. Dra. Liliete Canes Souza
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Spiller Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Regina de Sordi
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Alfeu Zanotto Filho
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 28 de julho de 2022

Dedico este trabalho à minha mãe, meu exemplo de superação.

AGRADECIMENTOS

É de fato uma experiência transformadora adentrar no ambiente acadêmico. Saio transformada pelos processos envolvidos na minha formação profissional e pelas pessoas que conheci ao longo dessa caminhada. Agradeço ao meu orientador de graduação, Fernando Spiller, por toda sua bondade, paciência e conhecimento ímpar. Além de ensinamento técnico, aprendi, através dos seus atos, a ser uma pessoa melhor e mais humana. A todos os meus colegas de laboratório, na qual criei vínculos que nunca serão apagados da minha memória, apesar da distância que se faz presente nesse momento: Rodrigo Formiga, Lucas Feltz, Nicholas Mendes de Paula, Caio Natale, Flávia Cardoso Amaral e Cristina Lorenzini. Uma vez li que sabemos que estamos no lugar certo quando admiramos as pessoas ao nosso redor. Mesmo que alguns não saibam, gostaria de dizer que admiro todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia. Admiro todos pela força, pela superação e pela coragem de ir em busca do desconhecido, mesmo em momentos difíceis. O LIDI me presenteou com amigos muito queridos e pessoas que sempre estão dispostas a ajudar. Me inspiro em vocês para ser uma profissional melhor. Agradeço aos amigos mais próximos que estão sempre comigo e que fazem a vida ser mais leve: Regiane Soster, Marick Starick, Juliano Vieira, Valdorion Klein, Larissa Bonfiglio, André Ghislandi, Vinicius Antunes, Julia Serafim e Jake Page. Por fim, nada disso seria possível se não fosse o esforço da minha mãe, que sempre lutou para que eu tivesse uma vida melhor do que ela teve quando criança, a ela serei eternamente grata.

*“The story of humans is the story of ideas that
shine light into dark corners” (Dr Jill Tarter)*

RESUMO

Os Siglecs (*sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) são receptores, em sua grande maioria inibitórios, expressos em células do sistema imune que através da sua ligação com glicoconjugados sialilados alteram as respostas celulares. A neuraminidase é uma sialidase que cliva o ácido siálico de seus glicoconjugados, interrompendo as vias inibitórias intracelulares. A resposta exacerbada e desregulada de leucócitos na sepse está diretamente relacionada à consequências deletérias como lesão e disfunção tecidual. Nossa hipótese é de que os inibidores de neuraminidases virais, oseltamivir e zanamivir, inibem também a atividade da neuraminidase do hospedeiro, mantendo, assim, a interação Siglec-ácido siálico e as vias inibitórias em leucócitos. Para isso, primeiramente, caracterizamos a expressão basal de receptores Siglecs na superfície de monócitos humanos em amostras de sangue total. Observamos que os receptores Siglecs-3 e -9 possuem maior densidade entre os Siglecs expressos (-3, -5, -7 e -9) na membrana dessas células. A expressão de Siglecs em amostras de sangue total também foi avaliada em resposta à diferentes concentrações de LPS (0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL e 1 µg/mL). A densidade de Siglec-3, Siglec-5 e Siglec-7 aumentou de maneira diretamente proporcional ao aumento da concentração de LPS, enquanto a expressão de Siglec-9 apresentou um perfil invertido. Os resultados do ensaio de tempo-resposta (0,5, 1,5 e 3 h) demonstraram um aumento crescente na expressão dos receptores ao longo do tempo. A avaliação da glicosilação após estímulo com LPS demonstrou uma diminuição dos ácidos siálicos na conformação α 2-3, a qual foi inibida pelo tratamento com oseltamivir ou zanamivir, sugerindo que esses fármacos inibem as neuraminidases do hospedeiro. Portanto, nossos resultados demonstram a capacidade que esses fármacos possuem de alterarem o *status* de sialilação da célula e, por conseguinte, atuarem como possíveis ferramentas farmacológicas para o tratamento de doenças que possuem um componente inflamatório importante, como, por exemplo, a sepse.

Palavras-chave: oseltamivir; zanamivir; siglecs; ácido siálico; inibidores de neuraminidase; monócitos.

ABSTRACT

Siglecs (*sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) are receptors, mostly inhibitory, expressed in immune cells that, through their binding with sialylated glycoconjugates, alter cellular responses. Neuraminidase is a sialidase that cleaves sialic acid from its glycoconjugates, interrupting intracellular inhibitory pathways. The exacerbated and dysregulated leukocyte response to sepsis is directly related to deleterious consequences such as tissue injury and dysfunction. Our hypothesis is that the viral neuraminidase inhibitors, oseltamivir and zanamivir, also inhibit the host's neuraminidase activity, thus maintaining the Siglec-sialic acid interaction and inhibitory pathways in leukocytes. To test out hypothesis, we initially characterized the basal expression of Siglec receptors on the surface of human monocytes in a whole blood sample. We observed that Siglecs-3 and -9 receptors have a higher density among the expressed Siglecs (-3, -5, -7 and -9) in the membrane of these cells. The expression of Siglecs was also evaluated in response to different concentrations of LPS (0.01 µg/mL, 0.1 µg/mL and 1 µg/mL). The density of Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-7 increased proportionally to the increase in LPS concentration, while the expression of Siglec-9 showed an inverted profile. The results of the time-response assay (0.5, 1.5 and 3 h) demonstrated an increase in receptor expression over time. Assessment of glycosylation after LPS stimulation demonstrated a decrease in sialic acids in the α 2-3 conformation, which was inhibited by treatment with oseltamivir or zanamivir, suggesting that these drugs inhibit host neuraminidase, therefore, changing the glycosylation status of the cell with the potential to act as a pharmacological tool for the treatment of diseases characterized by a high inflammatory profile e.g. sepsis.

Keywords: oseltamivir; zanamivir; siglecs; sialic acid; neuraminidase inhibitors; monocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hematopoiese. O desenvolvimento das principais linhagens de células sanguíneas é retratado nesta árvore hematopoiética.....	15
Figura 2 – Os Monócitos são células derivadas da linhagem monocítica provenientes de um progenitor mieloide.	16
Figura 3 – Resposta do hospedeiro na Sepsé	18
Figura 4 – Sinalização de receptores Siglec e seu efeito imunomodulador no receptor do tipo <i>toll 4</i> (TLR4)	21
Figura 5 – Estratégia de Gates para marcação da população celular de interesse.....	26
Figura 6 – As células CD66b negativas expressam os receptores Siglec-9,-7,-5 e -3	27
Figura 7 – A expressão de Siglec-9, Siglec-7 e Siglec-3 aumenta após ativação de células CD66b- induzidas por LPS	28
Figura 8 – Estimulação <i>in vitro</i> de sangue total com diferentes concentrações de LPS aumenta a expressão de Siglec-3, -5, -7 e -9	29
Figura 9 – Estimulação <i>in vitro</i> de sangue com LPS em diferentes <i>timepoints</i> aumenta a densidade de Siglec-9 e Siglec-5	30
Figura 10 – Tratamento com os inibidores de neuraminidase oseltamivir e zanamivir inibe a redução dos ácidos siálicos na membrana de monócitos.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPS	Lipopolissacarídeo
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Perigo
Siglecs	Lectinas do tipo Imunoglobulina de Ligação ao Ácido Siálico
TLR	Receptores do tipo Toll
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
RNA	Ácido Ribonucleico
ITIM	Motivo Inibitório Intracelular
ITAM	Motivo Ativatório Intracelular
SHP-1	Tirosina Fosfatase 1
SHP-2	Tirosina Fosfatase 2
MAL-II	<i>Maackia amurensis</i> Lectin II
CpNEU	Neuraminidase exógena de <i>Clostridium perfringens</i>
HSC	Célula tronco hematopoiética
ILC	Célula linfoide inata
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
PE	Ficoetrinina
FITC	Fluoresceína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO: VISÃO GERAL DO ASSUNTO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA.....	13
2.2	MONÓCITO.....	15
2.3	SEPSE.....	17
2.4	EIXO ÁCIDO SIALICO-SIGLECS.....	18
2.5	INIBIDORES DE NEURAMINIDASE.....	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO: VISÃO GERAL DO ASSUNTO

Os Siglecs (*sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) são receptores pertencentes à família das lectinas, sendo amplamente expressos em diversas células do sistema imunológico, como monócitos, neutrófilos, células *natural killers* e células B (BORNHÖFFT et al., 2018). São conhecidos 16 tipos de Siglecs em humanos, os quais são subdivididos em dois subtipos com base na sua sequência e sua conservação evolutiva. Um primeiro grupo mantém sua estrutura conservada e inclui os Siglecs -1, -2, -4, -15, enquanto que um segundo grupo apresenta sua estrutura em constante evolução, sendo chamados de homólogos ao CD33 (CD33-related Siglecs), e inclui, dentre outros, os Siglecs -3 (também conhecido como CD33), -5, -7, -8, -9, -10, -14 (CROCKER et al., 2007). Em sua grande maioria, os Siglecs apresentam na sua estrutura citoplasmática motivos inibitórios chamados de ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), podendo modular funções celulares, como a ativação, proliferação e apoptose, através do recrutamento de fosfatases SHP-1 e 2 (*Src homology 2 domain containing protein tyrosine*) (FAVIER et al., 2016). Os Siglecs possuem a capacidade de se ligar a moléculas sialiladas, ou seja, moléculas de carboidratos que possuem um ácido siálico em sua porção terminal, encontradas na superfície celular de todos os vertebrados (VARKI et al., 2008). O ácido siálico é um monossacarídeo de nove carbonos com carga negativa que se liga ao carboidrato subjacente através de ligações glicosídicas α 2-3; α 2-6 e α 2-8 (ZHOU et al., 2018). A ligação Siglec-ácido siálico pode acontecer de duas formas: ácidos siálicos presentes na superfície da própria célula formando uma ligação do tipo *cis*, já ácidos siálicos presentes na superfície de outras células, tecidos e patógenos, formam uma ligação do tipo *trans*. Para que ocorra a ligação entre os receptores Siglecs com ligantes *trans*, é necessária a quebra da ligação *cis* ou uma ligação *trans* com maior afinidade. Essa quebra é realizada por enzimas neuraminidases que clivam o ácido siálico.

A evolução dos patógenos para escapar da vigilância do sistema imunológico se adaptou para incorporar ácidos siálicos em sua estrutura, resultando em ausência de resposta do hospedeiro e levando a um aumento da sobrevivência do patógeno (CROCKER et al., 2011). Estudos anteriores demonstraram que a interação entre Siglec-9 expressa em neutrófilos com resíduos do ácido siálico NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc encontrados na cápsula polissacarídica de bactérias *Streptococcus* do grupo B, pode modular negativamente a resposta imunológica do hospedeiro, resultando em uma função microbicida diminuída, bem como menor produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)

(CARLIN et al., 2009). Assim, a interação de ácidos siálicos-Siglecs pode atuar como um regulador negativo das respostas inflamatórias.

Doenças que causam resposta inflamatória sistêmica, como a sepse, que possui alto risco de morte e é definida como disfunção orgânica ocasionada por uma resposta imunológica descontrolada superativada do hospedeiro contra um patógeno, é considerada uma das condições mais frequentes no mundo e requer cuidado em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Em função disso, é uma grande preocupação de saúde pública devido ao alto valor gasto no tratamento (VAN DER POLL et al., 2017). Nesse sentido, a pesquisa por drogas já utilizadas na clínica encurta o caminho na tentativa de encontrar um tratamento promissor. Essa estratégia se justifica tanto pelos altos custos envolvidos no desenvolvimento de um novo fármaco bem como pela demora necessária para sua validação (PUSHPAKOM et al., 2018). Medicamentos como o oseltamivir e o zanamivir podem ser bons candidatos ao chamado reposicionamento de fármacos, no qual um medicamento aprovado para uma determinada patologia é adaptado para atender outras demandas. Neste caso, por serem inibidores de neuraminidase, podem atuar como agentes anti-inflamatórios. Esses inibidores previnem a clivagem de resíduos de ácido siálico na membrana celular, atenuando a ativação da célula. Há dados na literatura demonstrando o potencial efeito do zanamivir e fosfato de oseltamivir na inibição da atividade de neuraminidase induzida por LPS em macrófagos (AMITH et al., 2009). Dados do nosso laboratório corroboram com esses achados, no qual observamos, após estímulo de sangue total de doadores saudáveis com LPS, um aumento na atividade da enzima neuraminidase, levando a uma redução nos ligantes de ácido siálico (α -2,3Neu5Ac) na membrana de granulócitos. Esse efeito foi bloqueado pelo oseltamivir e zanamivir. Além disso, os efeitos ativadores do LPS na melhora da fagocitose e killing da bactéria *E. coli*, diminuição na expressão de CD62L, aumento de CD66b e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por granulócitos foram reduzidos na presença de oseltamivir e zanamivir. *In vivo*, pré ou pós tratamento com a forma farmacêutica comercial do oseltamivir modularam a resposta neutrofílica, controlando a infecção e aumentando a sobrevivência do hospedeiro, em diferentes modelos de sepse (AMARAL et al., FORMIGA et al., 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

O sistema imunológico é resultado da integração e da dinâmica de interação existente entre diversas populações celulares, compostos químicos e processos que funcionam como protetores de pele, as vias respiratórias, o trato gastrointestinal e outras áreas de antígenos estranhos, como toxinas, bactérias, vírus, fungos e até mesmo células cancerígenas. Além das barreiras estruturais e químicas que nos protegem de infecções, o sistema imunológico pode ser visto e dividido de forma simplista em duas linhas de defesa, que comumente chamamos de imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra um patógeno invasor. É um mecanismo de defesa não específico utilizado pelo hospedeiro imediatamente após a exposição a um agente agressor estranho. A imunidade inata a patógenos depende de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que permitem que certas células imunes detectem e respondam rapidamente a uma ampla gama de patógenos que compartilham estruturas comuns, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TURVEY et al., 2010). Exemplos desses padrões incluem componentes da parede celular bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS) e ácido ribonucleico (RNA) de fita dupla produzido durante uma infecção viral. Uma função importante da imunidade inata é o rápido recrutamento de células imunes para os locais de infecção e inflamação através da produção de citocinas e quimiocinas, que são proteínas envolvidas na comunicação e recrutamento célula-célula. A produção de citocinas mobiliza muitos mecanismos de defesa em todo o corpo, ao mesmo tempo em que ativa as respostas celulares locais à infecção ou lesão (MURPHY et al., 2016).

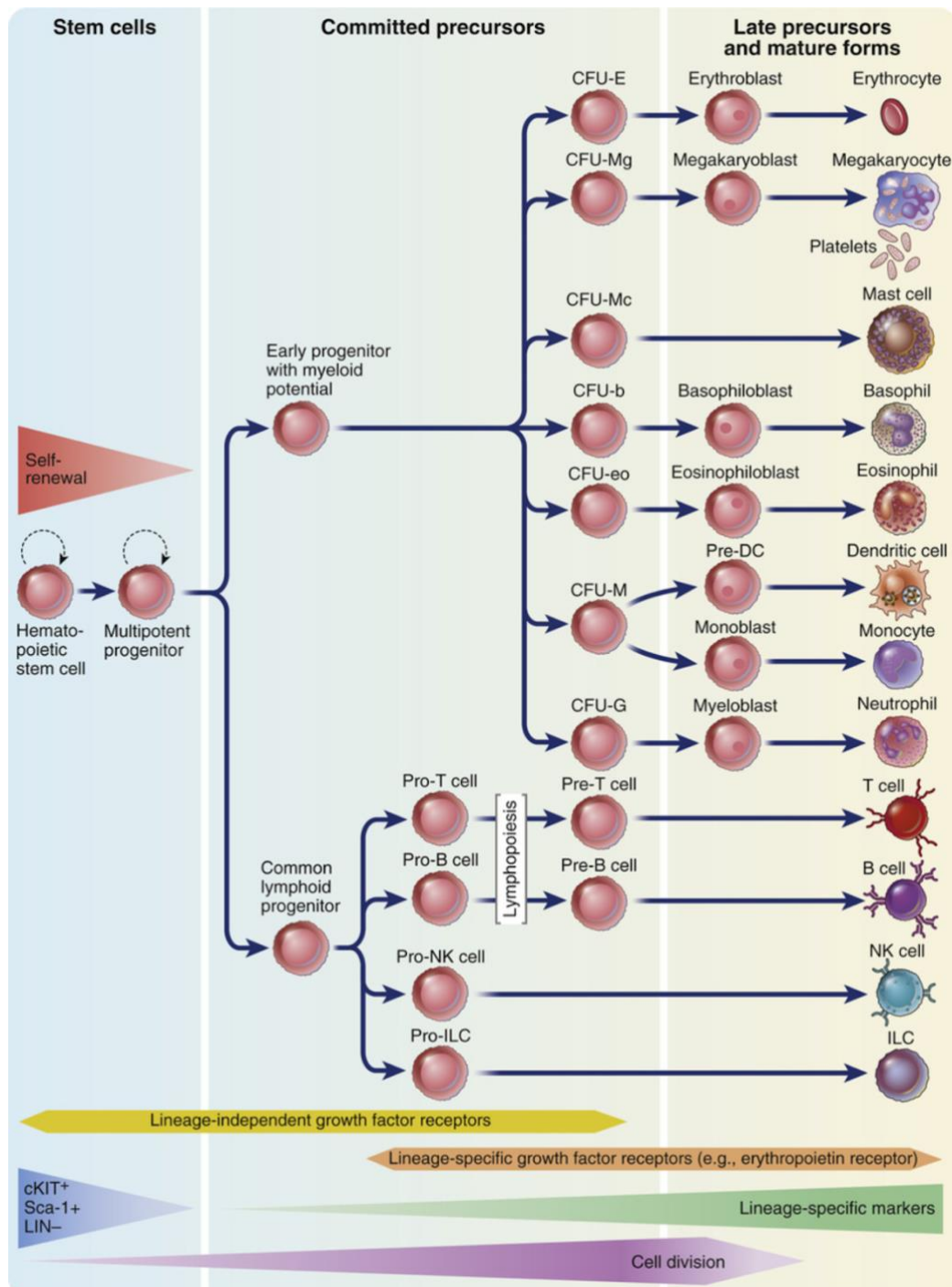
Enquanto a imunidade inata é geralmente capaz de eliminar os patógenos de forma eficiente, a eliminação inicial da infecção pode falhar devido ao alto número ou virulência de patógenos invasores. Nessas situações, os mecanismos imunológicos adaptativos são ativados, o que permite o reconhecimento e a eliminação específicos do patógeno. Esse feito é possível por conta do repertório de receptores extremamente diversificado existente nos linfócitos.

A imunidade adaptativa é antígeno-dependente e antígeno-específica e, portanto, envolve um intervalo de tempo (1 a 2 semanas) a partir da exposição ao antígeno até que a resposta máxima ocorra de maneira satisfatória. A característica principal da imunidade adaptativa é a capacidade de memória que permite ao hospedeiro montar uma resposta imune mais rápida e eficiente após a exposição subsequente ao antígeno (NETEA et al., 2019).

A ativação da resposta imune adaptativa e a indução da memória imunológica são dependentes do sistema imune inato, em particular das células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas. Os efeitos da ativação de linfócitos são então exercidos pela amplificação das respostas imunes inatas, como fagocitose e morte de patógenos por certas células imunes inatas.

Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa possuem, em parte, origem hematopoiética. As células tronco hematopoiéticas (HSCs) dão origem a dois tipos de células progenitoras multipotentes: um progenitor linfoide, que gera células linfoides e algumas células mieloides e um progenitor mieloide, que produz células mieloides, eritrócitos e plaquetas. O progenitor linfoide comum dá origem a precursores comprometidos com as linhagens de células T, células B e células linfoides inatas (ILCs) (YAZDANI et al., 2015). Os progenitores mieloides dão origem a precursores comprometidos com as linhagens eritroide, megacariocítica, granulocítica e monocítica, que dão origem, respectivamente, a hemácias maduras, plaquetas, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e monócitos. A maioria das células dendríticas surge de um ramo da linhagem monocítica (ABBAS et al., 2014).

Figura 1 - Hematopoiese. O desenvolvimento das principais linhagens de células sanguíneas é retratado nesta árvore hematopoiética



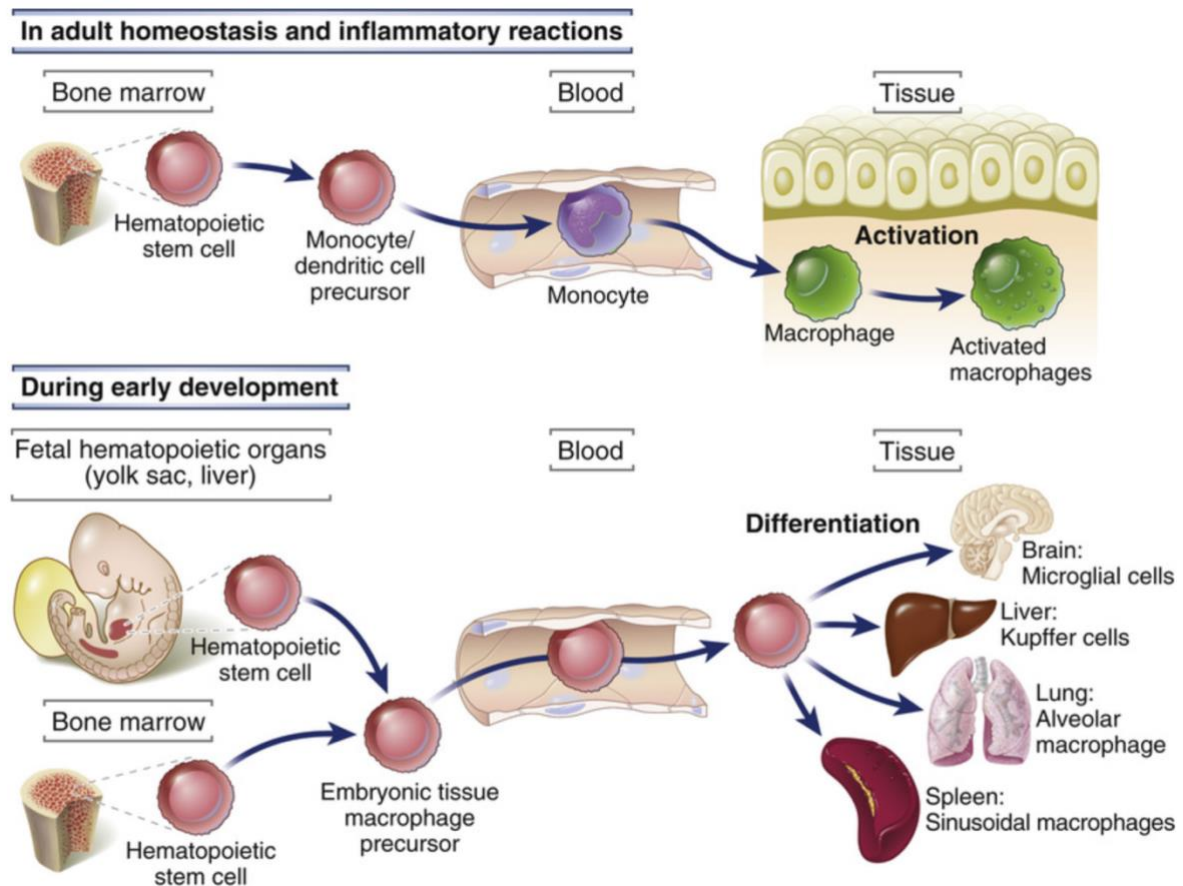
Fonte: Figura retirada de ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology, 9e. 2014.

2.2 MONÓCITO

Os precursores mielóides na medula óssea dão origem a monócitos circulantes. Em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, os precursores mielóides no saco vitelínico

e no fígado fetal dão origem aa células que migram para diferentes tecidos, gerando assim os macrófagos residentes, como, por exemplo, as células de Kupffer, os macrófagos alveolares e células da micróglia no cérebro (GINHOUX et al., 2010).

Figura 2 – Os Monócitos são células derivadas da linhagem monocítica provenientes de um progenitor mieloide.



Fonte: Figura retirada de ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology, 9e. 2014.

Essas células se tornam macrófagos quando migram para os tecidos e, além disso, formam o sistema mononuclear fagocitário juntamente com os macrófagos residentes, que são derivados principalmente de precursores hematopoiéticos durante a vida fetal.

Os monócitos são células com 10 a 15 µm de diâmetro, núcleo em forma de feijão e citoplasma finamente granular contendo lisossomos, vacúolos fagocitários e filamentos do citoesqueleto. Após sua maturação na medula óssea, eles são liberados na circulação, onde ficam até serem recrutados para locais de infecção ou lesão tecidual (GEISSMANN et al., 2010). Os monócitos apresentam um certo grau de plasticidade que permite que essas células

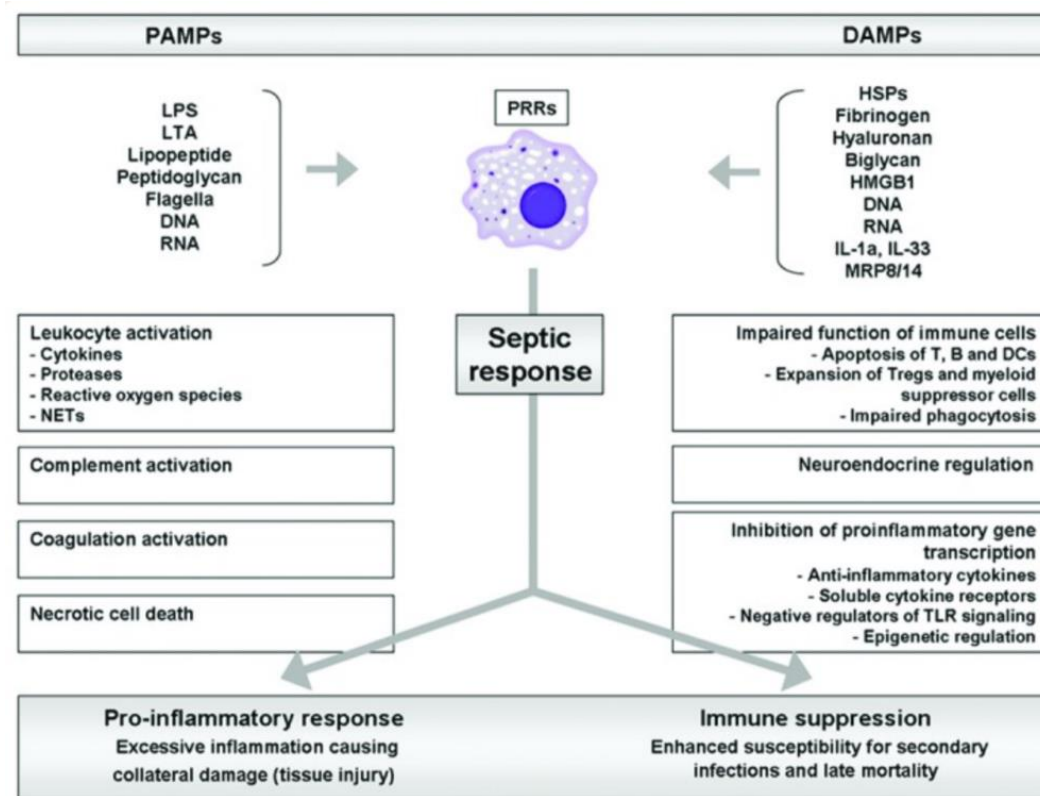
se diferenciem em macrófagos ou células dendríticas, ou seja, os monócitos podem assumir comportamentos altamente distintos de acordo com o microambiente nos quais estão inseridos (BAIN et al., 2013). Alternativamente, os monócitos também podem migrar para os tecidos na ausência de inflamação e permanecer em um estado indiferenciado onde desempenham papéis homeostáticos (WYNN et al., 2013). Os mediadores que atraem monócitos circulantes para os tecidos incluem quimiocinas, componentes do complemento e produtos da degradação da matriz tecidual (MANTOVANI et al., 2004).

2.3 SEPSE

A sepse é caracterizada por exibir um padrão bifásico, no qual uma resposta inicial exacerbada é seguida por uma imunossupressão (HOTCHKISS et al., 2013). Na sepse, a liberação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) de células hospedeiras lesadas ativam os PRRs, como, por exemplo, receptores do tipo *Toll*, que também reconhecem PAMPs, dando origem a um ciclo de hiperinflamação sustentada (TAKEUCHI et al., 2010). No entanto, uma defesa antimicrobiana ineficaz do hospedeiro frequentemente acompanha essa condição, ou seja, tanto as respostas inflamatórias quanto as respostas anti-inflamatórias são desencadeadas durante a sepse, e a disfunção celular resultante pode derivar da predominância de uma resposta sobre a outra. As citocinas pró-inflamatórias produzidas após o reconhecimento dos patógenos invasores podem ajudar a proteger o hospedeiro, mas também podem promover lesão tecidual. A ativação local do sistema de coagulação na sepse ajuda a confinar os patógenos ao sítio primário de infecção, enquanto a ativação sistêmica pode resultar em coagulação intravascular disseminada, trombose e sangramento (COHEN et al., 2015). A aderência aumentada de leucócitos e plaquetas à superfície endotelial e a subsequente diapedese resultam em inflamação vascular e ruptura da barreira endotelial, causando vazamento de proteínas intravasculares para o espaço extravascular, gerando edema tecidual e diminuição da perfusão. Quando graves, essas anormalidades podem levar à disfunção orgânica e à morte. No Brasil, aproximadamente um terço dos leitos de terapia intensiva são ocupados por pacientes sépticos, apresentando uma taxa de mortalidade de 55,7% (MACHADO et al., 2017). A nível mundial, a taxa de mortalidade de pacientes sépticos é de aproximadamente 26% (FLEISCHMANN et al., 2016). Apesar da discrepância existente entre a taxa de mortalidade brasileira e a mundial, o consenso é de que a sepse possui uma alta taxa de mortalidade, portanto, é necessário que repensemos as abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da sepse, de modo que elas sejam mais individualizadas, de acordo com a fase da doença que o

paciente se encontra: na fase hiperinflamatória inicial do distúrbio ou na fase imunossupressora mais prolongada. Para isso, estudar as vias de ativação e de inibição das células envolvidas na patogênese da sepse e encontrar formas de controlar a ativação celular podem servir como ferramentas extremamente úteis no manejo da doença e na criação de novas terapias. Monócitos e macrófagos, dentre as células do sistema imune inato, são fundamentais na imunomodulação decorrente da sepse. Eles desempenham funções centrais na resposta do hospedeiro à infecção, como fagocitose e erradicação de patógenos, apresentação de antígenos, ativação/inibição de linfócitos e produção de citocinas e quimiocinas (WIERSINGA et al., 2014).

Figura 3 – Resposta do hospedeiro na Sepse



Fonte: (WIERSINGA et al., 2014).

2.4 EIXO ÁCIDO SIALICO-SIGLECS

Carboidratos, chamados de glicanos, decoram todas as células do corpo humano. Os glicanos estão envolvidos em aspectos fundamentais, como as interações célula-célula mediadas por receptores que fundamentam processos normais e patológicos. A densa camada de glicanos na superfície da célula, chamada de glicocálice, pode se estender em mais de 30 nm da membrana plasmática em algumas células. As variadas funções dos glicanos são combinadas

por suas diversas estruturas. Os glicanos podem ser conjugados com proteínas para formar glicoproteínas e proteoglicanos e, ainda, podem ser conjugados com lipídios para formar glicolipídios. Também são secretados sem conjugação com outras macromoléculas na forma de glicosaminoglicanos. Em humanos, os glicanos são construídos principalmente a partir de dez monossacarídeos: glicose (Glc), galactose (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucose (Fuc), xilose (Xyl), ácido siálico (Neu5Ac), ácido glucurônico (GlcA), manose (Man) e ácido idurônico (IdoA). A montagem desses monossacarídeos em glicanos é realizada por enzimas associadas ao retículo endoplasmático e ao complexo de golgi. Os monossacarídeos estão ligados entre si através de uma ligação glicosídica entre o carbono anomérico de um açúcar e um grupo hidroxila do outro. A glicosilação tem funções amplas: formar estruturas com propriedades físicas únicas, regular a função e a estabilidade da proteína ou a dimerização do receptor na quais se encontram e, além disso, certos glicanos podem ser ligantes de lectinas, que são receptores específicos de carboidratos, como os Siglecs (ESKO et al., 2009).

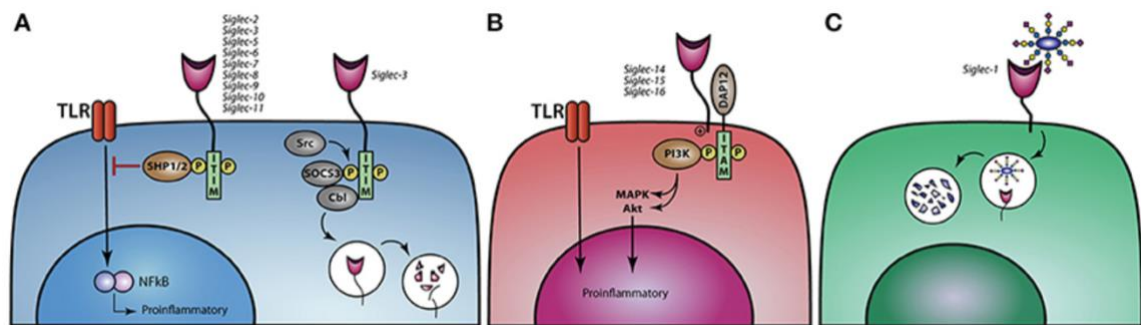
Os monócitos expressam receptores do tipo Siglec que reconhecem e se ligam a ácidos siálicos. Os ácidos siálicos são amplamente expressos à medida que são expostos na extremidade mais externa das estruturas glicosiladas (VARKI et al., 2007). Uma célula imune que expressa Siglec pode se ligar a ácidos siálicos presentes em outra célula ou glicoproteína secretada, na qual chamamos de interação *trans*. Os receptores Siglec também podem se ligar aos ácidos siálicos expostos na mesma célula, chamada de interação *cis*, gerando muitas possibilidades de interação no eixo ácido siálico – Siglec.

A maioria dos Siglecs possui um motivo inibitório intracelular (ITIM) que induz uma forte sinalização inibitória quando esses receptores se ligam a ácidos siálicos. Curiosamente, alguns patógenos e células tumorais se recobrem de estruturas sialiladas como um mecanismo de fuga do sistema imunológico, podendo assim escapar dos processos de imunovigilância (PILLAI et al., 2012), esses patógenos incluem espécies de *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *C. jejuni*, algumas cepas de *Escherichia coli* e *estreptococos do grupo B* (GBS) (CHANG et al., 2014). Glicosidases específicas, chamadas de neuraminidases ou sialidases, podem hidrolisar o ácido siálico presente em estruturas sialiladas. A neuraminidase endógena, presente principalmente em vesículas intracelulares, pode ser secretada, alterando assim o perfil das estruturas sialiladas presentes na membrana celular (LUBBERS et al., 2018).

Os receptores Siglec podem ser divididos em dois grupos com base em sua homologia genética entre as espécies de mamíferos. O primeiro grupo está presente em todos os mamíferos e consiste em Siglec-1 (sialoadesina), Siglec-2 (CD22), Siglec-4 (MAG) e Siglec-15. O

segundo grupo consiste nos Siglecs relacionados ao CD33 que evoluíram rapidamente e, portanto, seu repertório difere entre as espécies (ANGATA et al., 2004). Os Siglecs relacionados ao CD33 em humanos compreendem o Siglec-3 (CD33), -5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-14 e -16. Estudos prévios demonstraram que monócitos, macrófagos e células dendríticas possuem, em grande parte, o mesmo perfil de expressão de receptores Siglec, com alta expressão de siglec-3,-7,-9 e baixa expressão de Siglec-10 (LOCK et al., 2004). Os receptores Siglec também estão presentes em outras células imunes, como células B, basófilos, neutrófilos e células NK, apresentando diferentes padrões de expressão para cada subconjunto de células (MACAULEY et al., 2014). O efeito imunomodulador induzido pela interação ácido siálico-Siglec é regulado através de vias de sinalização inibitórias ou ativatórias (figura 4). Os Siglecs-2, -3 e -5 até -12, são chamados de Siglecs inibitórios, carregando motivos ITIM e/ou ITIM-like em seus domínios citoplasmáticos, que podem ser fosforilados pela família src, criando assim um sítio de ligação para as tirosina-fosfatases SHP-1 e SHP-2 (AVRIL et al., 2004). Já os Siglec-14 até -16 não possuem um motivo ITIM ou ITIM-like, eles se associam a proteína adaptadora DAP10/12 e são, portanto, chamados de Siglecs ativatórios. A DAP10/12 se associa aos Siglecs com função ativatória através de um resíduo de lisina carregado positivamente nos domínios transmembranares, que contém um motivo de ativação (ITAM) que promove a produção de citocinas pró-inflamatórias (CAO et al., 2008). O Siglec-1 e o Siglec-4 não possuem motivos de ativação ou inibição. No caso do Siglec-1, foi sugerido que ele é o principal responsável pelas interações célula-célula e pela fagocitose de patógenos sialilados (CHANG et al., 2014), enquanto o Siglec-4 é predominantemente envolvido em processos de mielinização e na estabilização célula-célula, já que esse receptor é encontrado em oligodendrócitos e células de Schwann (QUARLES, Richard H., 2007). Os Siglecs com ação ativatória provavelmente se desenvolveram sob pressão evolutiva, em resposta aos patógenos que se adaptaram usando os Siglecs inibitórios para contornar o sistema imunológico.

Figura 4 – Sinalização de receptores Siglec e seu efeito imunomodulador no receptor do tipo *toll 4* (TLR4)



Fonte: (LUBBERS et al., 2018).

Os receptores Siglec-2 até-11 modulam a sinalização de TLR4 após a ligação Siglec-ácidos siálicos e, assim, atenuam as respostas pró-inflamatórias. A ligação do ácido siálico ao Siglec-3 leva à fosforilação do motivo ITIM, liberando um sítio de ligação para SOCS3 e Cbl, causando degradação proteossomal de Siglec-3 e SOCS3. (B) A ativação de Siglecs-14,-15 e-16 envolve a proteína adaptadora DAP10/12, resultando na ativação das vias MAPK e AKT, estimulando assim uma resposta pró-inflamatória. (C) O Siglec-1 é internalizado após sua ligação com ácidos siálicos, podendo apresentar antígenos para células dendríticas ou células B.

A concentração local de ácidos siálicos na superfície dos leucócitos é alta, excedendo 100 mM (COLLINS et al., 2004), portanto, os sítios de ligação de Siglec são tipicamente “mascarados” por interações *cis* com outros ligantes sialilados expressos na mesma célula. Esses sítios de ligação podem ser desmascarados utilizando neuraminidases (RAZI et al., 1999). Muitos patógenos expressam neuraminidases que clivam o ácido siálico, como os vírus causadores da influenza (GONG et al., 2007), o fungo *Aspergillus fumigatus* (TELFORD et al., 2011) e a bactéria *Streptococcus pneumoniae* (CHANG et al., 2012). Defeitos na via de interações ácido siálico-Siglec, mediadas por bactérias, fungos ou vírus produtores de neuraminidase, podem, portanto, levar a respostas imunes exacerbadas.

Muitos patógenos e células cancerígenas exploram os receptores Siglecs e as estruturas sialiladas de diferentes maneiras, seja para causar uma ativação exacerbada do sistema imunológico, ou para escapar dos mecanismos de imunovigilância. Na sepse, a fase de hiper-reação do sistema imune e a fase de imunossupressão são estados imunológicos totalmente diferentes, portanto, se faz necessário investigar as diferentes funções dos receptores Siglecs nas diferentes fases da sepse. Não obstante, já sabemos que os receptores Siglecs desempenham um papel importante na prevenção do estado de exacerbção do sistema imune, portanto,

terapias alvo que preservem a interação ácido siálico-Siglec podem contribuir para o arsenal terapêutico do tratamento da sepse, ainda muito restrito.

2.5 INIBIDORES DE NEURAMINIDASE

Há ainda poucas terapias que têm como alvo o eixo ácido siálico-Siglec. Nesse sentido, os medicamentos mais conhecidos são os inibidores de neuraminidase viral, zanamivir (Relenza; GlaxoSmithKline), aprovado pela FDA em 1999 e oseltamivir (Tamiflu; Gilead/Roche), aprovado pela FDA também entre 1999 e 2000.

A superfície do vírus influenza A é decorada com três proteínas: uma proteína do canal iônico M2, a lectina hemaglutinina e a enzima neuraminidase. Normalmente, o vírus da gripe adere à célula hospedeira alvo usando sua glicoproteína hemaglutinina de superfície para reconhecer glicoconjugados. O vírus é então endocitado e assim a maquinaria da célula hospedeira é acionada para produzir os componentes virais necessários. A síntese subsequente de proteínas virais e a montagem de partículas na célula hospedeira preparam a progênie do virion para o processo de brotamento para sair da célula hospedeira. A enzima neuraminidase cliva os resíduos α -Neu5Ac terminais tanto das glicoproteínas da progênie do virion recém-sintetizadas quanto da superfície da célula hospedeira. A ação da neuraminidase permite que a progênie do virion agregado da superfície da célula hospedeira consiga deixar a célula infectada e assim buscar novas células hospedeiras para infectar. Tanto a hemaglutinina quanto a neuraminidase foram propostas como potenciais alvos para a descoberta de drogas anti-influenza. O zanamivir e o Oseltamivir bloqueiam eficientemente a ação da neuraminidase viral e inibem significativamente o mecanismo de liberação (VON ITZSTEIN, Mark, 2007).

Além do efeito direto na neuraminidase viral, a atividade dos inibidores de neuraminidase pode bloquear o efeito da neuraminidase endógena, modulando a atividade das células imunes por meio do equilíbrio entre a ação inibitória dos receptores Siglecs e a ação inflamatória mediada por receptores do tipo *toll*, em especial o TLR4. Vários receptores Siglec, como Siglec-E (murino) e Siglec-5 e -9 humano, interagem com receptores do tipo *toll* e inibem sua ativação. Na presença de patógenos, a neuraminidase-1 endógena cliva a ligação entre os TLRs e os Siglecs, ativando a via de sinalização que desencadeia a resposta imune durante a infecção, que pode ser exacerbada. Portanto, em casos de sepse, a ativação anormal do sistema imune pode ser reduzida pela inibição de Neu-1 induzida pelos inibidores de neuraminidase (PAULSON et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- O objetivo geral do nosso trabalho foi avaliar a densidade dos receptores Siglecs e ácido siálico α 2-3 expressos na membrana de monócitos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o tempo e a dose resposta de ativação das células com LPS.
- Avaliar a densidade do ácido siálico α 2-3 na superfície de monócitos utilizando neuraminidase exógena (CpNEU) e LPS como estímulos.
- Avaliar o efeito do Oseltamivir e Zanamivir na sialilação de monócitos estimulados com LPS ou neuraminidase exógena.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sangue de doadores saudáveis (entre 18 e 60 anos) foram coletadas em tubo a vácuo livre de endotoxinas contendo heparina (Labor Import, Brasil), homogeneizadas e transportadas adequadamente para a capela de fluxo laminar, onde alíquotas de sangue de 100 μ L foram coletadas *em eppendorfs* de 0,6 mL para análise no contador hematológico ABX Micro 60 (Horiba ABX SAS, França). Todos os participantes deram consentimento informado por escrito para coleta de sangue após receberem informações sobre os procedimentos. O protocolo de pesquisa segue a Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE: 82815718.2.0000.0121).

Avaliamos os resultados de hemograma e leucograma obtidos para determinar se as amostras estavam de acordo com os experimentos. Não foram utilizadas amostras com valores alterados. A cepa LPS *E. coli* 0127: b8 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi utilizada para estimular leucócitos em sangue total. Alíquotas de LPS foram previamente sonicadas em banho ultrassônico (Cole-Parmer, Nilles, Illinois, EUA) por 20 minutos.

Para o ensaio de tempo-resposta, amostras foram incubadas a 37 °C em ambiente com 5% de CO₂ por 30 minutos, 1, 3 ou 6 horas. Após o estímulo, leucócitos totais foram obtidos por lise dos eritrócitos utilizando tampão de lise durante 7 minutos, seguido por centrifugação (270 x g; 22 °C; 7 min). Os leucócitos totais foram então lavados e ressuspensos em tampão FACS (2 mM EDTA / PBS, 0,1% BSA), seguido por incubação com anticorpos anti-CD66b FITC, anti-Siglec-5 APC e anti-Siglec-9 PE.

Para determinar a viabilidade celular, utilizamos o BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450 (FVS450) (BD Biosciences, EUA), que nos permitiu ver a diferenciação de células de mamíferos viáveis de não viáveis de acordo com a intensidade de fluorescência das células, medida por citometria de fluxo. Além disso, o FC-Block (1: 100; TruStain FcXTM humano, Biolegend) sempre foi adicionado para bloquear a ligação não específica pelos receptores Fc presentes nas células. Assim, a incubação foi realizada por 40 minutos a 4 °C, seguida pela adição de 160 μ L de tampão FACS em cada amostra.

Finalmente, os leucócitos foram centrifugados novamente, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200 μ L de tampão FACS contendo 2% de paraformaldeído (PFA). Em seguida, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse™ BD (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A expressão de Siglec -3; -5; -7; -8; -9 e -10 em células CD66b- foi caracterizada incubando os leucócitos totais separadamente com anticorpos anti-

Siglec-3; -5; -7; -8; -9; -10 conjugados com ficoeritrina (PE) e anticorpo anti-CD66b conjugado com fluoresceína (FITC). Foram avaliadas a intensidade mediana de fluorescência (MFI) e a frequência de células positivas para os tipos Siglec.

O LPS foi adicionado ao sangue total em concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µg/mL no ensaio de dose-resposta, seguido por incubação a 37 °C ± 5% CO₂ por 3 horas. Após a lise dos eritrócitos, os leucócitos totais foram lavados e incubados com anticorpos anti-CD66b conjugado com Alexa Fluor 647, anti-Siglec-3, anti-Siglec-5, anti-Siglec-7 e anti-Siglec-9 (PE).

Nos experimentos contendo os inibidores de neuraminidase Oseltamivir e Zanamivir, o sangue total incubado com LPS, seguido de LPS + oseltamivir (100 µM, Sigma-Aldrich) ou LPS + Zanamivir (30 µM, Sigma-Aldrich) durante 90 min em 37 °C e 5% CO₂.

Como o sangue é uma fonte rica em glicoconjugados, foram utilizados leucócitos totais em vez de sangue total para avaliar o efeito da neuraminidase exógena. Para isso, leucócitos totais foram submetidos a 37 °C e 5% CO₂ com neuraminidase de *Clostridium perfringens* (CpNEU) (10 mU, Sigma), CpNEU + oseltamivir (100 µM) ou CpNEU + Zanamivir (30 µM) por 60 min. Os leucócitos foram então lavados e ressuspensos em tampão FACS (2 mM EDTA / PBS, 0,1% BSA) e a marcação foi realizada com os anticorpos anti-CD66b (G10F5; BioLegend), CD62L (DREG-56; BioLegend), lectina *Maackia amurensis* II biotinizada (MAL-II, Vector Labs) acoplada a estreptavidina (Biolegend), Fc-block e marcador de viabilidade celular BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450 (FVS450) (BD Biosciences, EUA) por 30 min a 4 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em tampão FACS para leitura no citômetro de fluxo. Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos em cada análise.

A análise de todos os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo FACSVerse™ BD foi realizada no software FlowJo X (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, EUA).

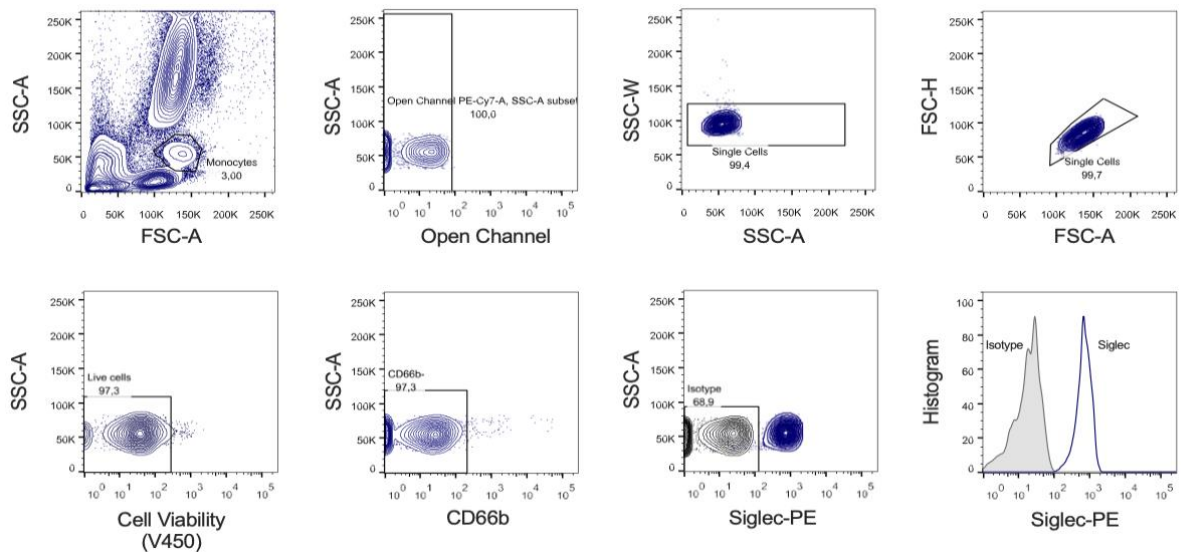
O *software* GraphPad Prism9® (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e confecção dos gráficos. Para os resultados, foi aplicado o teste t de Student não pareado usando um teste paramétrico com correção de Welch entre grupo controle e estimulado. Em todas as análises o valor de p menor do que 0,05 foi considerado significativo ($\alpha=0,05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. Os resultados nos gráficos foram expressos como média ± erro padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização dos receptores Siglecs em célula CD88b-humanas (monócitos):

Para entendermos melhor o papel dos receptores Siglecs na população CD66b-, primeiramente, incubamos o sangue total com alguns dos principais tipos de Siglecs encontrados na literatura. Após a lise dos eritrócitos e análise no citômetro de fluxo, seguimos a estratégia de *gate* representada na Figura 5 para definirmos nossa população de interesse, as células CD66b-, caracterizada pelos monócitos, e assim, observamos uma maior expressão de Siglec-9 (MFI=2406), seguido de -3 (MFI=953), Siglec-5 (MFI=596) e Siglec-7 (MFI=532) (Figura 2). A expressão de Siglec-8 e Siglec-10 foi ausente, ou seja, a população CD66b- não expressa esses dois receptores.

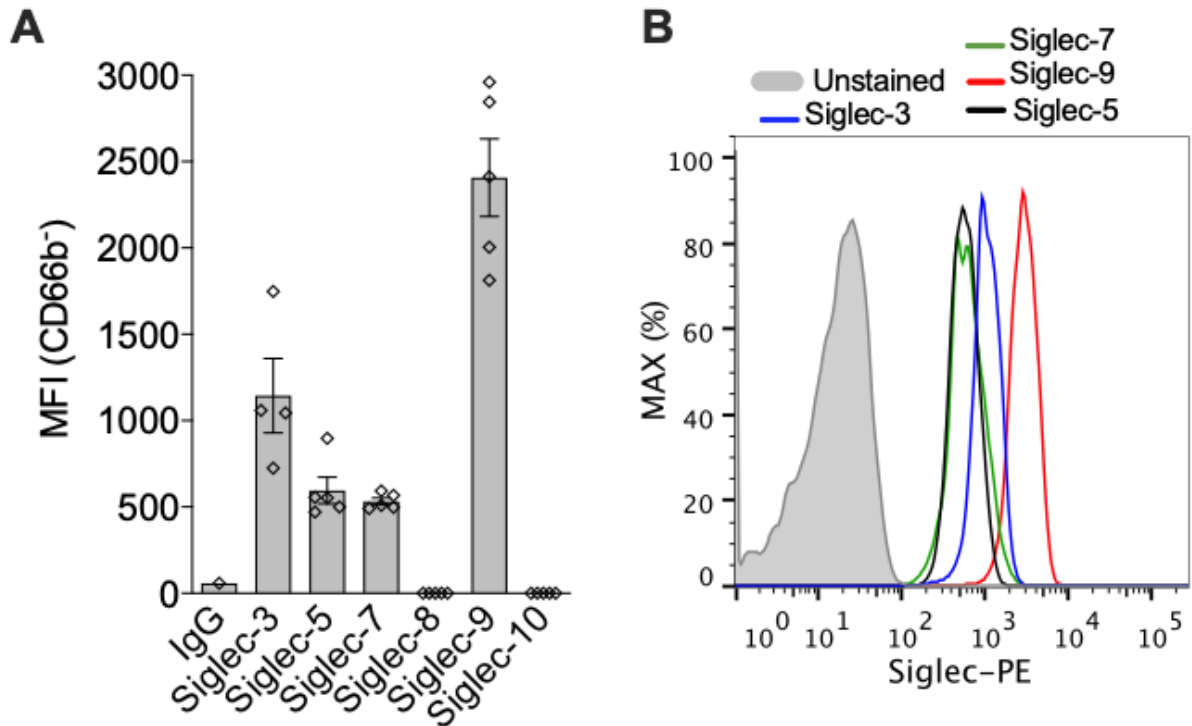
Figura 5 – Estratégia de Gates para marcação da população celular de interesse



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A estratégia de análise para determinar as células CD66b- (FITC) com a caracterização dos receptores Siglecs foi baseada nas células sem marcação, seguido pela eliminação da autofluorescência e duas formas de exclusão de eventos duplos. Posteriormente, foi feita a seleção das células viáveis a partir dos eventos negativos para o FVS e eventos negativos para o marcador CD66b. Selecionando as células CD66b- conseguimos caracterizar a expressão dos receptores Siglecs por meio dos marcadores específicos para cada Siglec estudado, conjugado com o fluorocromo PE.

Figura 6 – As células CD66b negativas expressam os receptores Siglec-9,-7,-5 e -3



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A expressão de receptores Siglec em células CD66b⁻ humanas. (A) Os leucócitos totais foram incubados separadamente com anticorpos anti-Siglec -3; -5; -7; -8; -9; -10 conjugados com ficoeritrina (PE) e anticorpos anti-CD66b conjugados com fluoresceína (FITC) n=5. (B) Histograma representativo.

2. Avaliação dos receptores Siglecs após estímulo LPS:

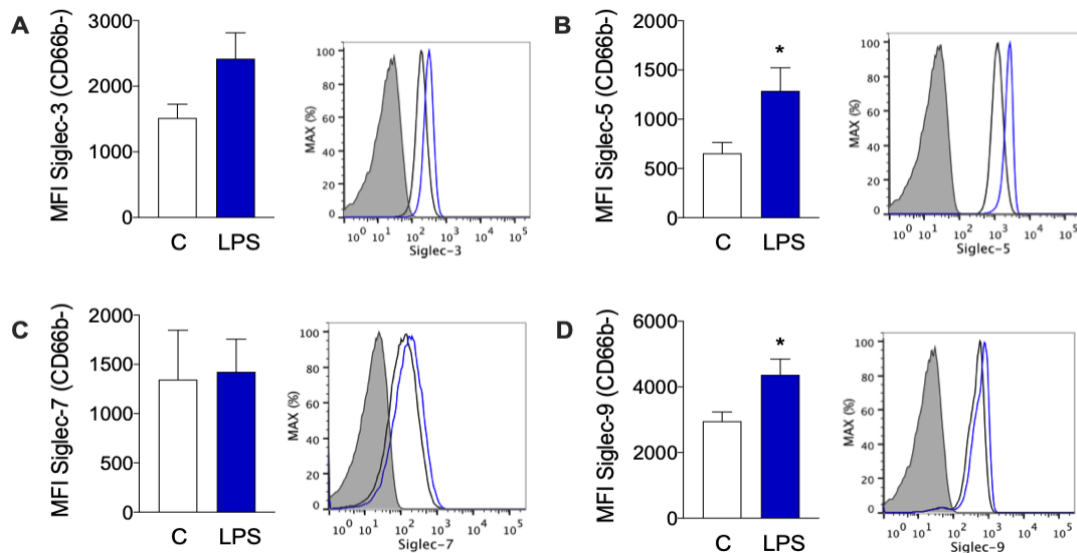
Para avaliar os receptores Siglecs frente ao perfil de ativação das células CD66b, utilizamos um PAMP encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas, o LPS. O LPS induz a sinalização de vias que ativam leucócitos e, portanto, uma vez que os receptores Siglec são em sua maioria inibitórios e possuem uma função descrita de regular essa ativação, foi avaliado se havia alguma alteração em sua expressão após o estímulo. Observamos aumento na expressão de todos os receptores Siglecs avaliados (Figura 7), porém, o aumento na expressão de Siglec-5 e Siglec-9 nas células tratadas comparada ao controle é significativo, enquanto nos outros dois receptores essa diferença estatística não ocorre (Siglec-3 e Siglec-7).

No ensaio preliminar de dose-resposta (Figura 8), foi adicionado ao sangue total LPS nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µg/mL, seguido da incubação a 37°C ± 5% de CO₂ por 3 horas. Após este tempo, as hemácias foram lisadas, os leucócitos totais foram lavados e incubados com anticorpos anti-CD66b conjugado a Alexa Fluor 647, anti-Siglec-3, anti-Siglec-

5, anti-Siglec-7 e anti-Siglec-9-PE. Observamos que a expressão de Siglecs avaliada com diferentes concentrações de LPS foi aumentada para Siglec-3, Siglec-5, e Siglec-7. O receptor Siglec-9 demonstrou um perfil invertido, diminuindo a expressão junto com o aumento da concentração de LPS. Esses ensaios precisam ser repetidos para aumentar o n e avaliar a reprodutibilidade do experimento.

Além do ensaio de dose-resposta, foi realizado um ensaio de tempo-resposta (Figura 9). Dessa forma, o sangue total foi estimulado com LPS 1,0 µg/mL por 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas. Posteriormente, após a lise das hemácias, os leucócitos totais foram incubados com anticorpos anti-CD66b FITC, anti-Siglec-5 APC e anti-Siglec-9-PE, visto que esses dois receptores demonstraram diferenças estatisticamente significativas no seu perfil de ativação com LPS. Observamos, tanto para Siglec-5 como para Siglec-9, um aumento da expressão dos receptores Siglecs em todos os tempos analisados, porém, o receptor Siglec-5 mostrou maior diferença entre os grupos controle e estimulado, principalmente nos tempos 1, 3 e 6 horas, com maior diferença no último tempo analisado.

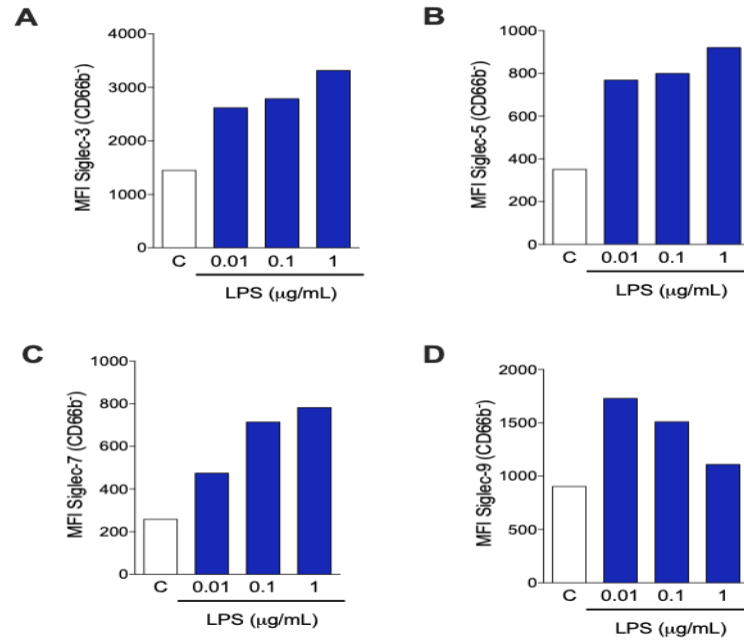
Figura 7 – A expressão de Siglec-9, Siglec-7 e Siglec-3 aumenta após ativação de células CD66b- induzidas por LPS



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O sangue total foi incubado com LPS 1,0 µg/mL por 3 horas. Após a incubação as células foram marcadas com anticorpos anti-CD66b FITC e anti- Siglec-3, -5, -7 ou -9 PE. n=3 em 3 experimentos independentes.

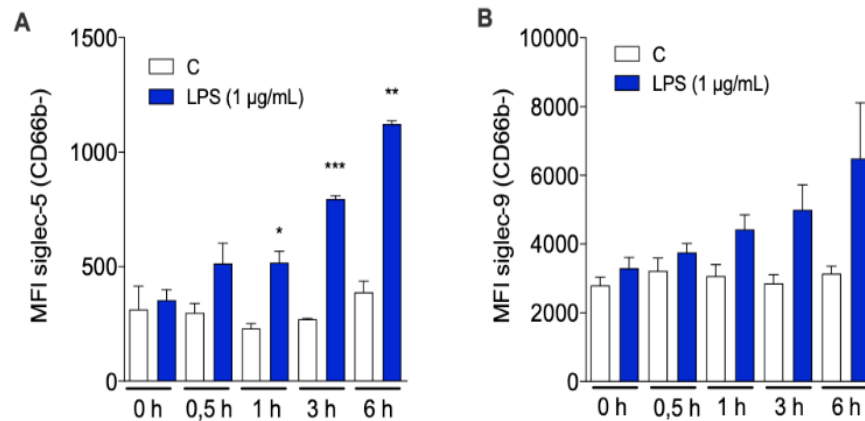
Figura 8 – Estimulação *in vitro* de sangue total com diferentes concentrações de LPS aumenta a expressão de Siglec-3, -5, -7 e -9



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Foi adicionado ao sangue total LPS nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µg/mL, seguido da incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ de CO_2 por 3 horas. Os leucócitos totais foram lavados e incubados com anticorpos anti-CD66b conjugado a Alexa Fluor 647, anti-Siglec-3, anti-Siglec-5, anti-Siglec-7 e anti-Siglec-9-PE. $n=1$.

Figura 9 – Estimulação *in vitro* de sangue com LPS em diferentes *timepoints*



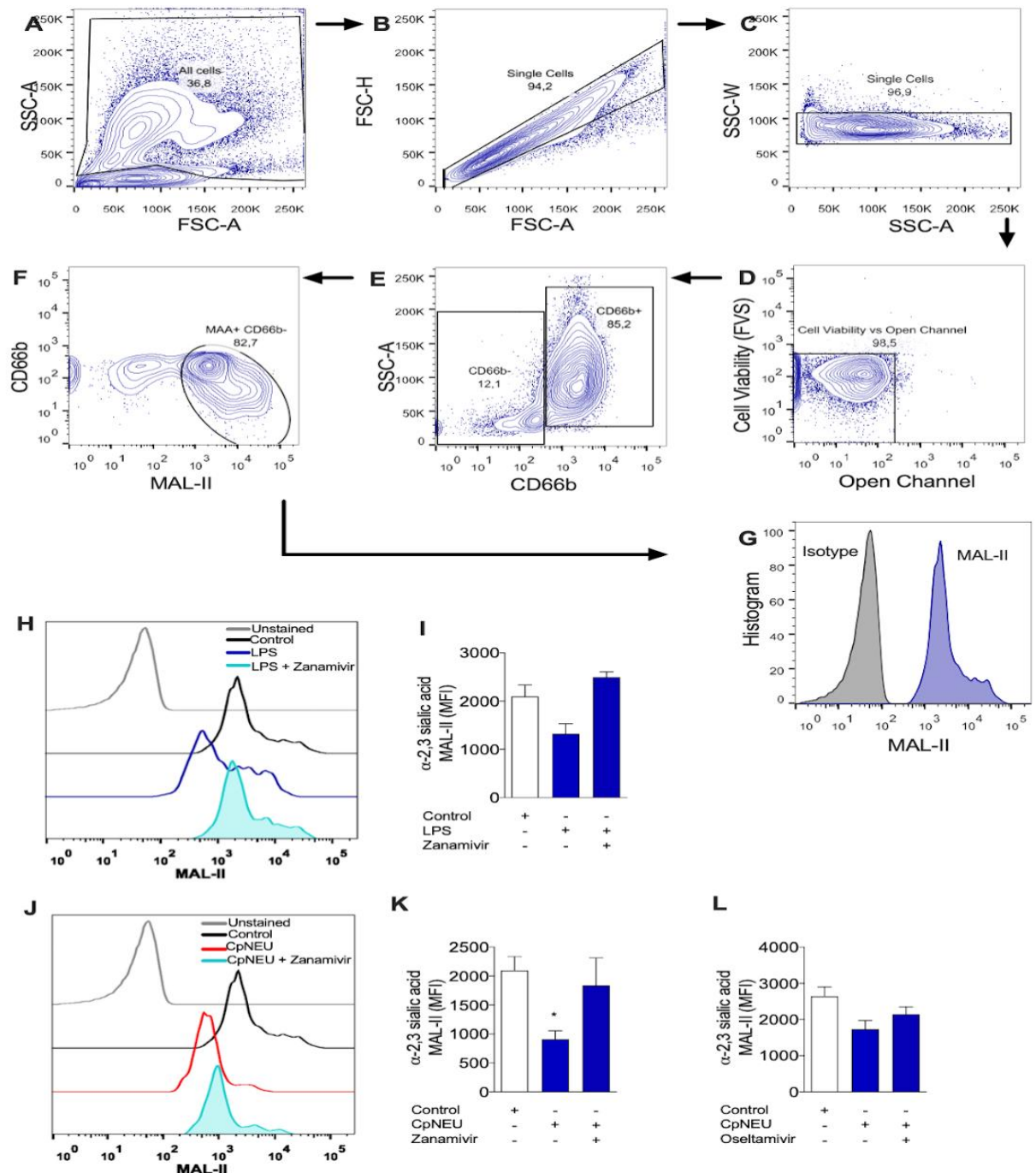
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O sangue total foi estimulado com 1,0 µg / mL de LPS por 30 min, 1 hora, 3 horas e 6 horas. Posteriormente, após a lise dos eritrócitos, os leucócitos totais foram incubados com anticorpos anti-CD66b FITC, anti-Siglec-5 APC e anti-Siglec-9 PE. N=3.

3. Avaliação do tratamento dos inibidores de Neuraminidase oseltamivir e zanamivir estimulados com LPS e Neuraminidase:

Para avaliar se os inibidores de neuraminidase oseltamivir e zanamivir possuem influência sobre a clivagem de ácidos siálicos mediados pela enzima neuraminidase, tratamos as células com esses inibidores (figura 10). Observamos que o estímulo com LPS causa diminuição dos ácidos siálicos na conformação $\alpha 2-3$ em células CD66b- (monócitos) na membrana da célula, porém, o tratamento com zanamivir consegue inibir a enzima neuraminidase, restabelecendo os ácidos siálicos aos níveis do controle. Este padrão também foi reproduzido em células estimuladas com neuraminidase exógena (CpNEU). A neuraminidase exógena possui capacidade de ativar a célula pela clivagem dos ácidos siálicos na superfície de membranas celulares, possuindo perfil semelhante à ativação induzida por LPS. O tratamento com zanamivir e oseltamivir, neste caso, também demonstrou inibir a clivagem dos ácidos siálicos, porém, os dados não apresentaram estatística validada, apesar de haver um fenótipo comum. São necessários mais experimentos para podermos confirmar essas análises.

Figura 10 – Tratamento com os inibidores de neuraminidase oseltamivir e zanamivir inibe a redução dos ácidos siálicos na membrana de monócitos



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Leucócitos totais (1×10^6) foram incubados com neuraminidase exógena (CpNEU) (10 mU, 60 min, 37°C, 5% CO₂), CpNEU + Oseltamivir (100 μ M), ou CpNEU + zanamivir (30 μ M), LPS (1,0 μ g/mg) ou LPS (1,0 μ g/mg) + zanamivir. Os leucócitos totais foram marcados com a lectina MAL-II para a detecção de ácidos siálicos na conformação α 2-3. (A-G) Estratégia de gates utilizada para análise. Histograma representativo em Half-Offset (H) dos dados da ativação da célula por LPS e o tratamento com zanamivir (I). Histograma representativo em Half-Offset (J) dos dados da ativação celular por neuraminidase e o

tratamento com zanamivir (K). Gráfico representando a ativação das células CD66b- por neuraminidase e o tratamento com oseltamivir (L). n=4

Diante dos resultados expostos, conseguimos entender melhor a dinâmica de expressão dos receptores Siglec em monócitos não estimulados *versus* após a estimulação das células com LPS utilizando diferentes parâmetros. As diferentes doses simulam qual o comportamento dos receptores Siglec frente ao grau de infecção por um patógeno que induz uma resposta imune mediada por TLR, ou seja, o LPS, sendo um forte indutor de resposta imune inata, altera o perfil dos receptores expressos na superfície da célula e, mecanisticamente, há envolvimento de vias de ativação e de inibição que competem entre si para que um estado de homeostasia ou de ativação seja alcançado. Neste estudo, vimos que essas vias envolvem maior ou menor expressão dos diferentes Siglecs avaliados.

O tempo variado de incubação com LPS simula qual o comportamento dos receptores Siglec diante de uma exposição mais curta ou mais prolongada a um PAMP. No nosso estudo, demonstramos que houve aumento dos receptores de acordo com o tempo de incubação. Biologicamente, esse aumento nos receptores pode representar uma maneira intrínseca de controlar a ativação da célula pelo LPS utilizando um mecanismo de *feedback*, na qual há maior produção dos receptores inibitórios afim de mitigar os efeitos ativatórios causados pela estimulação da célula. Além disso, o ensaio com neuraminidase exógena demonstrou um perfil de sialilação parecido ao LPS, demonstrando seu papel importante na clivagem de ácidos siálicos na membrana de monócitos. Além disso, esse ensaio representa um bom modelo de estudo das vias de regulação do eixo ácido siálico-Siglec e serviram como validação para testar a nossa hipótese de que os inibidores de neuraminidase restabelecem os níveis de ácidos siálicos na membrana da célula.

6 CONCLUSÃO

A família de receptores Siglecs vem demonstrando um papel importante na modulação do sistema imunológico pelo reconhecimento de ácido siálico endógeno, inibindo a sinalização celular ativatória (ALI et al., 2014). A ativação das células com LPS e neuraminidase exógena parece modular a expressão do ácido siálico na conformação α 2-3 na população CD66b- (monócitos). Além disso, o tratamento com os inibidores de neuraminidase zanamivir e oseltamivir se mostraram promissores em inibir sua ativação. Os resultados sugerem uma correlação entre a ativação celular e a expressão dos receptores Siglecs em monócitos humanos, demonstrado pelo aumento no número desses receptores após estímulo celular, o que pode ser importante para futuras investigações na modulação imunológica como um alvo para o tratamento da sepse e outras doenças com perfil celular ativado. Há ainda várias questões que precisam ser respondidas e que estão relacionadas a uma melhor compreensão sobre a interação entre os receptores Siglecs e as células imunes, como, por exemplo, como os vários Siglecs expressos em uma célula se comunicam entre si? Qual é a especificidade exata desses receptores para ácidos siálicos? A multivalência de ácidos siálicos ou receptores Siglec é importante? Precisamos inibir apenas um receptor Siglec ou mais receptores Siglec simultaneamente em uma célula para alterar sua função? Qual é a importância da estrutura proteica ou lipídica na qual o ácido siálico é exposto? Com o avanço no campo da glicobiologia esperamos encontrar essas respostas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology, 9e. 2014.
- ABDULKHALEK, S. et al. Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for toll-like receptor activation and cellular signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 42, p. 36532–36549, 2011.
- ALI, S. R. et al. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. **The Journal of experimental medicine**, v. 211, n. 6, p. 1231–42, 2014.
- ÁLVAREZ-ESTRADA et al., TLR2, Siglec-3 e expressões de CD163 em monócitos de sangue periférico suíno aumentam durante sepse causada por Haemophilus parasuis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 64, p. 31 -39, 2019.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 4018–4023, 10 mar. 2009.
- AMITH, S. R. et al. Dependence of pathogen molecule-induced Toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, n. 9, p. 1197–1212, 2009.
- ANGATA, Takashi et al. Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 36, p. 13251-13256, 2004.
- AVRIL, Tony et al. The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and-9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6841-6849, 2004.
- BAIN, C. C. et al. **Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same LyChi monocyte precursors.** *Mucosal immunology*, v. 6, n. 3, p. 498-510, 2013.
- BORNHÖFFT, Kim F. et al. Siglecs: a journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. **Dev Comp Immunol**, v. 86, p. 219-231, 2018)
- CAO, Huan et al. SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans. **European journal of immunology**, v. 38, n. 8, p. 2303-2315, 2008.
- CARLIN, Aaron F. et al. **Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response.** *Blood*, v. 113, n. 14, p. 3333-3336, 2009.

CHANG, Yung-Chi et al. Leukocyte inflammatory responses provoked by pneumococcal sialidase. **MBio**, v. 3, n. 1, p. e00220-11, 2012.

CHANG, Yung-Chi; NIZET, Victor. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. **Glycobiology**, v. 24, n. 9, p. 818-825, 2014.

COHEN, Jonathan et al. Sepsis: a roadmap for future research. **The Lancet infectious diseases**, v. 15, n. 5, p. 581-614, 2015.

COLLINS, Brian E. et al. Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 6104-6109, 2004.

CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 4, p. 255–266, 2007.

CROCKER, Paul R. CAO huan. **Evolution of CD33-related Siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation?**. *Immunology*, v. 132, n. 1, p. 18-26, 2011).

ESKO, Jeffrey D.; LINHARDT, Robert J. **Proteins that bind sulfated glycosaminoglycans**. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition, 2009.

FAVIER, B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 140–155, 2016.

FLEISCHMANN, Carolin et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2016.

FORMIGA, Rodrigo O. et al. Neuraminidase inhibitors rewire neutrophil function in murine sepsis and COVID-19 patient cells. **bioRxiv**, 2020.

GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GINHOUX, Florent et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-845, 2010.

GONG, Jianzhi; XU, Wenfang; ZHANG, Jie. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 1, p. 113-122, 2007.

HOTCHKISS, Richard S.; MONNERET, Guillaume; PAYEN, Didier. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862-874, 2013.

LÄUBLI, Heinz; VARKI, Ajit. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) detect self-associated molecular patterns to regulate immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 593-605, 2020.

- LOCK, Kevin et al. **Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells.** *Immunobiology*, v. 209, n. 1-2, p. 199-207, 2004.
- LÜBBERS, Joyce; RODRÍGUEZ, Ernesto; VAN KOOYK, Yvette. Modulation of immune tolerance via siglec-sialic acid interactions. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2807, 2018.
- MACAULEY, M. S.; CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. **Nature Reviews Immunology**, 2014.
- MACHADO, Flavia R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.
- MANTOVANI, Alberto et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.
- MARSHALL, Jean S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2018.
- MURPHY, Kenneth; WEAVER, Casey. Janeway's immunobiology. **Garland science**, 2016.
- NETEA, Mihai G. et al. Innate and adaptive immune memory: an evolutionary continuum in the host's response to pathogens. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 1, p. 13-26, 2019.
- PAULSON, James C.; KAWASAKI, Norihito. Sialidase inhibitors DAMPen sepsis. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 406-407, 2011.
- PILLAI, S. et al. Siglecs and Immune Regulation. *Annual Review of Immunology*, 2012.
- QUARLES, Richard H. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. **Journal of neurochemistry**, v. 100, n. 6, p. 1431-1448, 2007.
- RAZI, Nahid; VARKI, Ajit. Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. **Glycobiology**, v. 9, n. 11, p. 1225-1234, 1999.
- TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.
- TELFORD, Judith C. et al. The *Aspergillus fumigatus* sialidase is a 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid hydrolase (KDNase): structural and mechanistic insights. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10783-10792, 2011.
- TURVEY, Stuart E.; BROIDE, David H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24-S32, 2010.
- VAN DER POLL, Tom et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 7, p. 407, 2017.
- VARKI, Ajit. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1023-1029, 2007.

VARKI, Ajit. Sialic acids in human health and disease. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 8, p. 351-360, 2008).

VON ITZSTEIN, Mark. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 12, p. 967-974, 2007.

WALTER, R. B. et al. ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 1, p. 200–211, 2008.

WIERSINGA, Willem Joost et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2014.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.

YAZDANI, Reza et al. Characteristics of innate lymphoid cells (ILCs) and their role in immunological disorders (an update). **Cellular immunology**, v. 298, n. 1-2, p. 66-76, 2015.

ZHOU, J. Y. et al. **The Glycoscience of Immunity. Trends in Immunology**, v. xx, p. 1–13, 2018.