

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lucas Feltz de Faria

**Análise do papel da neuraminidase na resposta fagocítica de neutrófilos humanos
estimulados com LPS**

Florianópolis
2020

Lucas Feltz de Faria

**Análise do papel da neuraminidase na resposta fagocítica de neutrófilos humanos
estimulados com LPS**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do título de Licenciado em
Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

Florianópolis
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Feltz de Faria, Lucas

Análise do papel da neuraminidase na resposta fagocítica de neutrófilos humanos estimulados com LPS / Lucas Feltz de Faria ; orientador, Fernando Spiller, 2020.

38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Farmacologia. 3. Imunologia.
I. Spiller, Fernando. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Lucas Feltz de Faria

Análise do papel da neuraminidase na resposta fagocítica de neutrófilos humanos estimulados com LPS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso Ciências Biológicas

Florianópolis, 17 de Novembro de 2020.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof.(a) Fabienne Antunes Ferreira, Dra.
Avaliadora
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Rodrigo de Oliveira Formiga, Mestre
Avaliador
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais e à minha futura esposa
Carolina.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Sidnei e Ana Maria, por me proporcionarem todo auxílio financeiro e estrutural que eu tive e que possibilitou o acontecimento dessa graduação.

A minha maravilhosa namorada, Carolina, que me acompanhou por grande parte da minha graduação, fortalecendo o meu emocional e apoiando meu crescimento pessoal, fazendo aflorar sempre o melhor de mim.

Aos meus irmãos, Vinícius e Ana Clara, que apesar das brigas e desavenças que acontecem entre irmãos, sempre foram grandes amigos que moldaram uma grande parte do que sou hoje em dia e que tenho certeza que desejam o melhor para mim.

Ao Prof. Spiller, por ter me dado a oportunidade de participar do seu Laboratório nesses dois anos de iniciação científica que foram de grande importância para mim.

Aos meus colegas de laboratório, sejam aqueles que já se despediram das bancadas quanto aos que continuam na função, em especial ao Rodrigo e ao Nicholas, todos foram essenciais para o acontecimento desse trabalho, seja por meio do ensino de técnicas, ajuda em experimentos, fornecimento de reagentes, ou até mesmo manutenção da minha saúde mental com histórias, risadas e idas ao RU.

Aos meus amigos, sejam eles conhecidos na minha época de ensino fundamental, médio, ou até mesmo na graduação. São amizades que eu prometo manter por muito tempo, pois sempre que precisei fui auxiliado por eles e sempre serão de extrema importância para mim.

Ao Marcus, apesar de já ter agradecido aos meus amigos vivos, não poderia de deixar de agradecer a ti, mesmo tu não estando presente para vivenciar esse momento tão especial para mim, saiba que continuarás vivendo para sempre em meus pensamentos.

Agradeço por fim a UFSC por proporcionar ensino gratuito e de qualidade a todas as camadas sociais.

“É interessante contemplar uma ribanceira coberta por plantas de todos os tipos, com pássaros cantando nos arbustos e vários insetos voando e vermes rastejando pela terra úmida, e refletir que essas formas elaboradamente construídas, tão diferentes umas das outras e dependentes entre si de um modo tão complexo, foram todas produzidas por leis que atuam à nossa volta.” (DARWIN, 1859)

RESUMO

O contato de prolongado do sistema imune com patógenos pode gerar danos teciduais e até a morte do organismo, tanto pelo não controle da infecção quanto por uma resposta imune exacerbada devido a presença e reconhecimento desses patógenos. Os neutrófilos são células fundamentais para o controle de infecções, em especial as bacterianas. Dentre os mecanismos citotóxicos contra patógenos pode-se destacar a fagocitose, que compreende o processo pelo qual essas células usam sua membrana plasmática para englobar microrganismos, dando origem a um compartimento interno chamado fagossoma. Para isso, as células precisam reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos, a exemplo do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas via receptores de reconhecimento padrão, como o receptor do tipo *toll* (TLR)-4. Evidências demonstram que a ativação mediada pelo TLR4 em monócitos e células dendríticas pode induzir a interação e a atividade da enzima neuraminidase (NEU). Essa, por sua vez, é uma sialidase e dessa forma cliva os ácidos siálicos membranares, que podem influenciar na resposta imune inata. Em um estado de repouso, os ácidos siálicos presentes na membrana de leucócitos interagem com os receptores Siglecs (Sialic acid binding Ig-like lectins), que possuem uma função inibitória, funcionando como uma espécie de freio na ativação celular. Dessa forma, o rompimento da interação Siglec-ácido siálico pela NEU parece ser um mecanismo importante para a ativação dos leucócitos durante um processo infeccioso. No entanto, esse mecanismo ainda não foi elucidado em neutrófilos. Esse trabalho teve como objetivos analisar a função da via LPS/TLR4/NEU e a clivagem de ácidos siálicos. Para isso, células de doadores saudáveis foram tratadas ou não com fosfato de oseltamivir (100 uM), um inibidor de NEU viral, seguido do estímulo ou não com LPS (1 ug/mL). A resposta fagocítica então foi mensurada pelo percentual de neutrófilos que fagocitaram bactérias, a quantidade de partículas fagocitadas por cada célula e a eficácia da morte bacteriana (*killing*). O tratamento do sangue total com LPS (1 µg/mL) aumentou o percentual de fagocitose para *Escherichia coli* e para *Staphylococcus aureus*. O número de *E. coli* ou *S. aureus* ingeridas por neutrófilos aumentou no grupo tratado com LPS. O pré-tratamento do sangue total com Oseltamivir inibiu os efeitos do LPS. Nossos resultados sugerem que a ativação da neuraminidase pelo LPS contribui para a fagocitose e morte de bactérias pelos neutrófilos.

Palavras-chave: LPS, Siglecs, sialidase, oseltamivir, ácido siálico, neutrófilos.

ABSTRACT

Neutrophils are key cells to the control of bacterial infections. Phagocytosis is one of the main mechanisms used by neutrophils to bacteria killing. The lipopolysaccharide (LPS) present in the membrane of Gram-negative bacteria is recognized by TLR4 on neutrophils. TLR4 can physically interact with the neuraminidase enzyme [NEU, a sialidase (an enzyme that cleaves sialic acid from glycoconjugates)], which influences the innate immune response, such as phagocytosis and cell activation. In resting state, sialic acids present on leukocyte interact with Siglecs receptors (Sialic acid binding Ig-like lectins), which have an inhibitory function. Thus, the disruption of the Siglec-sialic acid binding by NEU seems to be an important mechanism for leukocytes response during an infectious process. This mechanism has been demonstrated in macrophages and dendritic cells, but not in human neutrophils. This work analyzed the role of neuraminidase enzyme in bacteria phagocytosis by human neutrophils. Phagocytic response was evaluated by the percentage of neutrophils with bacteria, the amount of particles phagocytosed per neutrophil. Moreover, we also analyzed bacterial killing. Whole blood from healthy donors treated with LPS (1 μg / mL) increased the percentage of phagocytosis of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The number of *E. coli* or *S. aureus* ingested by neutrophils increased in cells treated with LPS. Pretreatment of whole blood with Oseltamivir inhibited the effects of LPS. Our results suggest that the activation of neuraminidase by LPS contributes to phagocytosis and death of bacteria by neutrophils.

Keywords: LPS, Siglecs, sialidase, Oseltamivir, sialic acid, neutrophils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos de combate a patógenos realizado por neutrófilos.....	14
Figura 2: Representação de uma Siglec-1 presente em células dendríticas realizando uma ligação do tipo <i>trans</i> e outros tipos de Siglec realizando uma ligação do tipo <i>cis</i>	17
Gráfico 1: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose dos neutrófilos induzido pelo LPS.....	26
Gráfico 2: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose de <i>E.coli</i> realizada por neutrófilos quando estimulados por LPS.....	27
Gráfico 3: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose de <i>S. aureus</i> realizada por neutrófilos quando estimulados por LPS.....	28
Gráfico 4: Oseltamivir inibe o <i>killling</i> de <i>E. coli</i> induzido pelo LPS..	29
Gráfico 5: Oseltamivir inibe a sobrevivência intracelular de <i>S. aureus</i> induzido pelo LPS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC (*American Type Culture Collection*)

BHI (*Brain-heart infusion*)

UFC Unidades formadoras de colônias (*Colony forming unit*)

DNA Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

IL-6 Interleucina 6

ITAM Imunorreceptor baseado em tirosina com teor ativatório (*Immunoreceptor tyrosine-based activatory motifs*)

ITIM Imunorreceptor baseado em tirosina com teor inibitório (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*)

K3EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico

LPS Lipopolissacarídeo

NETs Armadilha nuclear extracelular (*Nuclear extracellular traps*)

NEU Neuraminidase

OD Densidade óptica (*Optical density*)

PAMP Padrão molecular associado a patógeno (*Pathogen associated molecular patterns*)

PBS Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)

ROS Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

RPM Rotações por minuto

Siglec Lectinas do tipo imunoglobulina que se ligam ao ácido siálico (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*)

TLR Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptor*)

TNF- α Fator de necrose tumoral Alfa (*Tumoral necrosis factor*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	HIPÓTESE.....	20
3	OBJETIVOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÕES.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

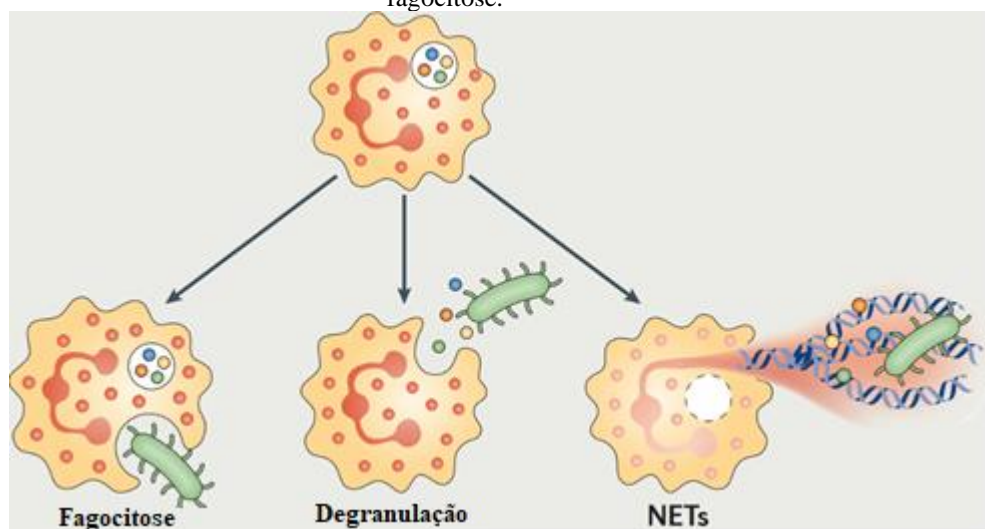
1 INTRODUÇÃO

O sistema imune existe em diferentes seres vivos, desde organismos basais até organismos mais complexos, funcionando de diferentes formas, o qual é um sistema fundamental para a sobrevivência do organismo como unidade e como espécie, pois afeta diretamente as relações ecológicas de diversos seres vivos (MURPHY, 2014). Vertebrados em geral são organismos extremamente expostos, suscetíveis a infecções virais, bacterianas, fúngicas e a parasitas, por isso, o desenvolvimento de um sistema imune eficiente o suficiente para combater esses organismos chamados de patógenos, e antígenos derivados desses patógenos, é essencial para esses indivíduos. Vertebrados mandibulados apresentam uma dicotomização do sistema imune em sistema imune inato e o sistema imune adaptativo como é conhecido e estudado em humanos (TIZARD, 2009). O sistema imune inato humano funciona como uma barreira, impedindo grande parte das infecções de se desenvolverem à um quadro mais grave, exemplos de parte dessa defesa são a pele e grande parte dos leucócitos, como basófilos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Já o sistema imune adaptativo humano é caracterizado principalmente pela formação de anticorpos e constituído pelos produtos originados de linfócitos e pelos próprios linfócitos, um subtipo de leucócito. Esse tipo de defesa depende de um estímulo prévio para funcionar, podendo levar em média três semanas para construir uma resposta imune eficaz quando o patógeno é desconhecido, mas que pode ter uma resposta imediata caso o estímulo seja conhecido (NICHOLSON, 2016).

Neutrófilos são células do sistema imune humano que possuem uma ação imediata contra patógenos, sendo parte do sistema imune inato. São uma das primeiras células a serem recrutadas ao sítio de infecção e apresentam um papel muito importante para erradicação bacteriana e fúngica. Também são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea em humanos, possuem um tempo de vida curto e são produzidos constantemente na medula óssea. Para neutralização de patógenos extracelulares e intracelulares, neutrófilos possuem múltiplos mecanismos, como fagocitose, degranulação e a liberação de NETs (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*, em português armadilhas extracelulares de neutrófilos) (CHRISTOFFERSSON et al., 2018; CASTANHEIRA & KUBES, 2019). O processo de fagocitose envolve o reconhecimento do patógeno, a ingestão do mesmo em um compartimento denominado fagossomo e a degranulação de ROS (do inglês *Reactive oxygen species*, em português espécies reativas de oxigênio) ou proteínas antibacterianas para a erradicação do micro-organismo no fagossomo. A degranulação também pode ocorrer em

patógenos não fagocitados, ou seja, sem o processo de internalização. O outro mecanismo de combate a patógenos realizado por neutrófilos anteriormente citado são as NETs, moléculas complexas formadas por DNA, histonas, proteínas e enzimas liberadas no meio extracelular para imobilizar o patógeno, impedindo sua disseminação e facilitando o processo de fagocitose (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Figura 1: Mecanismos de combate a patógenos realizado por neutrófilos. Nessa figura podemos observar a representação dos 3 mecanismo de combate a patógenos realizado por neutrófilos. A fagocitose, onde ocorre o englobamento do patógenos, formação do fagossoma e fusão deste com um endossoma com a presença de ROS. A degranulação, onde ROS são liberados no meio extracelular para neutralizar o patógenos. E também a liberação de NETs, que tem como principal função captura e neutralização do patógeno para uma posterior fagocitose.



Fonte: Kolaczowska e Kubes (2013).

Apesar da eficácia do sistema imune inato combatendo patógenos, a liberação de antígenos em grandes quantidades pode gerar uma ativação desregulada dos neutrófilos, ocasionando diversas complicações locais e sistêmicas para o organismo, como por exemplo o dano tecidual devido a grande produção de ROS. Por isso a resposta do neutrófilo precisa ocorrer da maneira controlada, evitando que a ação do sistema imune cause danos teciduais ao organismo ou seja fraca ao ponto de que não seja suficiente para lidar com a taxa de replicação do patógeno (ZHANG et al., 2016). Por exemplo, lesões típicas na sepse podem ser originadas da superativação de neutrófilos devido a presença de moléculas como o LPS (Lipopolissacarídeo) em grandes concentrações. Essa superativação causa um aumento da interação das células endoteliais e dos neutrófilos, que induz a secreção de ROS, enzimas líticas e substâncias vasoativas, como o óxido nítrico e a endotelina. A secreção desses compostos no meio extracelular causa danos em diversos tecidos de órgãos vitais, como o tecido epitelial (MCGOWN et al., 2011).

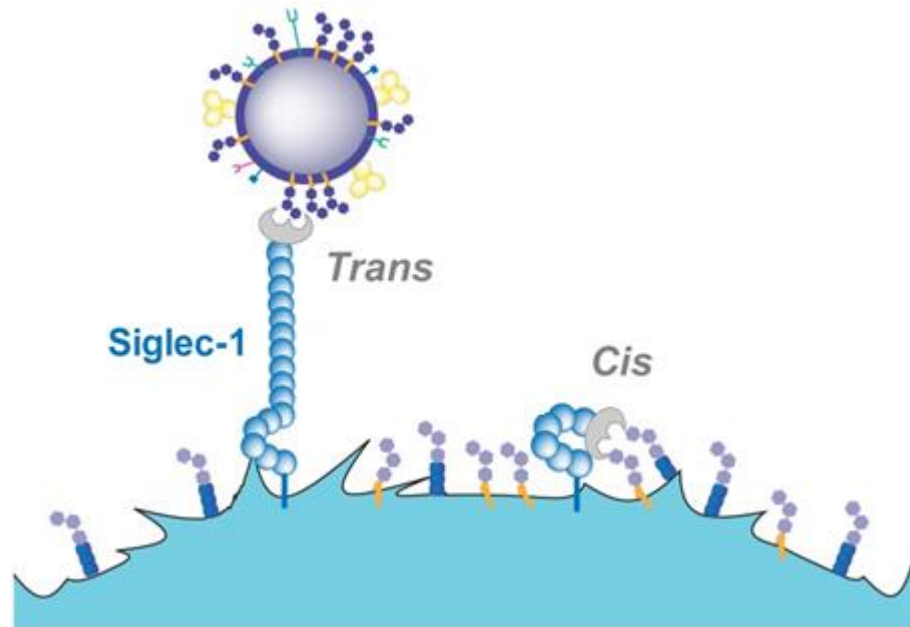
Para todos os mecanismos citados acima funcionarem, o primeiro passo a ser executado para a eliminação de patógenos do nosso organismo é o reconhecimento dos mesmos. Patógenos e moléculas associadas a esses patógenos podem ser reconhecidos pelos TLRs (do inglês *Toll-like receptors*, em português receptores do tipo Toll), receptores presentes na superfície e interior de células que reconhecem PAMP's (do inglês *Pathogen associated molecular pattern*, em português padrões moleculares associados a patógenos), moléculas comumente associadas a patógenos. Um exemplo de PAMP é o LPS, uma molécula presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, conhecida por ser um PAMP que estimula a ativação do sistema imune humano quando reconhecida pelo receptor TLR4, aumentando a produção e liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- α . A associação da molécula de LPS pelo TLR4 também induz a ativação da enzima neuraminidase endógena. A neuraminidase é uma enzima presente no interior celular que realiza a clivagem dos ácidos siálicos, a diminuição de ácidos siálicos na superfície celular de leucócitos estimula a resposta inflamatória, um dos motivos desse estímulo é a desativação de receptores de teor inibitório como as Siglecs que mantêm sua função inibitória quando estão em ligação com ácidos siálicos. Associado a isso, altas concentrações de LPS no sangue podem desencadear quadro de choque séptico e levar o paciente a morte (TAKEDA et al., 2007; FANG et al., 2010; POLTORAK et al., 1998; AMITH et al., 2009).

Presentes na superfície celular, os ácidos siálicos são um grupo de moléculas conservadas evolutivamente em grande parte dos eucariotos, responsáveis por mecanismos de adesão e reconhecimento, representados por um grupo de carboidratos organizados em uma cadeia composta por 9 carbonos. O ácido siálico possui capacidade de realizar uma ligação de alta afinidade com as Siglecs (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) e também com diversas outras lectinas presentes na superfície celular de células sanguíneas. Quando associadas realizam importantes funções relacionadas com a ativação ou inibição da resposta imune (BÜLL et al., 2016). De forma geral, a ligação entre as Siglecs e o ácido siálico é responsável por auxiliar as células do sistema imune no reconhecimento do próprio e não próprio, ou seja, interações de ácidos siálicos de patógenos e Siglecs de humanos estão presentes no processo de reconhecimento celular de patógenos realizado por leucócitos (CARLIN et al., 2009). Uma grande prova disso é que problemas de síntese do ácido siálico e a não expressão tanto de Siglecs quanto do ácido siálico geram anormalidades no funcionamento do sistema imune, podendo levar ao colapso do organismo pela desregulação

de macrófagos e neutrófilos, onde suas funções acabam comprometidas devido ao processo de superativação celular (MACAULEY et al., 2014). A diminuição do nível de ácidos siálicos presentes na superfície celular de alguns tipos celulares específicos pode servir como uma sinalização para que ocorra a fagocitose de células autofágicas que já não são mais tão eficientes quanto deveriam, relatando um processo de apoptose relacionado a clivagem de ácidos siálicos, como já citado, neutrófilos são células com tempo de vida curto e realizam apoptose após o combate a patógenos, a perda de ácidos siálicos de sua superfície está relacionado com esse processo apoptótico (MEESMANN et al., 2010).

A ligação do ácido siálico com as Siglecs pode ser caracterizadas de duas maneiras: quando o ácido siálico ligante da Siglec está presente na membrana da própria célula é caracterizada como uma ligação do tipo *cis*, quando a ligação da Siglec ocorre com um ácido siálico presente na membrana de outras células ou até mesmo com o ácido siálico de patógenos, é determinada como uma ligação do tipo *trans*. Na maioria dos casos, as ligações do tipo *cis* possuem uma preferência na regulação das funções celulares sobre as ligações do tipo *trans*. Então, para que a Siglec possa ter seu sítio de ligação exposto e ocorra uma ligação do tipo *trans*, em decorrência de, por exemplo, um estímulo derivado da presença de um patógeno, é necessário que ocorra uma clivagem do ácido siálico que está em contato com o receptor em uma ligação do tipo *cis*. Para que ocorra essa clivagem, é necessária a ação da enzima neuraminidase que é exportada do interior da célula para realizar esta clivagem. Mas a clivagem do ácido siálico não é realizada exclusivamente pela ação da neuraminidase, esse processo também pode ocorrer pela ativação celular por estímulos específicos que possuem um potencial de alteração de padrão das glicoproteínas e glicopeptídeos presentes na membrana do leucócito, assim como também pode ocorrer um deslocamento da ligação *cis* caso as células presentes no arredores estejam com uma alta densidade de ligações do tipo *trans*, ou seja, quando existe um contato com o patógeno, leucócitos podem ter seus ácidos siálicos pelo reconhecimento de outros leucócitos já ativados e também pelo reconhecimento de ácidos siálicos não-próprios de patógenos (CROCKER et al., 2007; VARKI & ANGATA, 2005; CROCKER, 2005).

Figura 2: Representação de uma Siglec-1 presente em células dendríticas realizando uma ligação do tipo *trans* e outros tipos de Siglec realizando uma ligação do tipo *cis*. **Essa imagem mostra a ligação de uma Siglec-1 com o ácido siálico presente na superfície de uma outra célula, caracterizando uma ligação do tipo *trans*. Ao lado é possível ver uma Siglec realizando uma ligação com um ácido siálico presente na superfície da mesma célula em que está localizada a Siglec, caracterizando uma ligação do tipo *cis*.**



Fonte: Isquierdo et al. (2014)

A enzima neuraminidase, ou sialidase, é uma enzima muito difundida evolutivamente, presente em diversos grupos taxonômicos seja em organismos de nível macroscópicos como os vertebrados ou até mesmo diversos grupos de micro-organismos como vírus, protozoários, bactérias e fungos (ROSENBERG & SCHENGRUND, 1976 apud MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012; CORFIELD et al., 1981 apud MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012; CORFIELD & SCHAUER 1982 apud MIYAGI, YAMAGUCHI, 2012; CORFIELD, 1992; SAITO; FRONDA; YU, 2002). Em vertebrados são encontrados quatro tipos diferentes de sialidases, com diferenças enzimáticas e localizações diferentes no meio celular, os tipos são: NEU1, NEU2, NEU3 e NEU4. Estudos demonstram que a migração dessas enzimas é baseada do estímulo recebido pela célula. A enzima NEU1, normalmente localizada em lisossomos no interior celular, é uma das únicas neuraminidases presentes em vertebrados que possui função imune descrita, possui um leque extenso de funções, participando da degradação de lisossomos, exocitose dos grânulos de granulócitos e pode ser relacionada ao processo de fagocitose realizado por células do sistema imune (MIYAGI & TSUIKI 1984; MIYAGI et al., 1990, MIYAGI & YAMAGUCHI 2012; SAITO; FRONDA; YU, 2002).

Há evidências de que células com gene nocaute de NEU1 são muito menos eficazes na fagocitose geral, tanto de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como em partículas

opsonizadas e não opsonizadas (SEYRANTEPE et al., 2009). Estudos sugerem que existe a formação de um complexo entre a NEU1 e o TLR4, garantindo uma ativação mais rápida e também causando uma grande influência na funcionalidade desses receptores e de outros receptores glicosilados (AMITH et al., 2010). Mas o TLR4 não é o único receptor que expressa essa interatividade com a NEU1, outros receptores, como TLR2, TLR3, receptores do tipo FC e outros receptores característicos de fagocitose possuem relação com a NEU1 para otimizar a resposta imune, visto que em camundongos nocautes para NEU1, a fagocitose é menor e a presença de ácido siálico nesses receptores é maior, caracterizando uma associação no processo fagocítico entre esses receptores e NEU1 (SEYRANTEPE et al., 2009).

Já são reconhecidos na literatura casos de patógenos que alteram a morfologia dos seus ácidos siálicos presentes na cápsula polissacarídica para poderem passar despercebidos pelo sistema imune, como é o caso dos *Streptococcus* do grupo B (CARLIN et al., 2009), assim como também é demonstrado que *Streptococcus pneumoniae* promove a clivagem do ácido siálico da superfície de leucócitos pela liberação da enzima neuraminidase e estimula uma resposta inflamatória desregulada (CHANG et al., 2012).

Englobando tudo que foi citado até aqui, o fosfato de Oseltamivir é um fármaco antiviral presente no mercado, utilizado para o tratamento de pessoas infectadas com *influenza* do tipo A e B devido a sua eficácia no controle da taxa de replicação do vírus no organismo por meio da disposição de ácido siálico “isca” que será clivado no lugar do glicocálice celular pela neuraminidase viral, impedindo a entrada do vírus na célula. Reconhecido por ser um fármaco inibidor de neuraminidase, quando ingerido por via oral, a droga é transformada pelo fígado em carboxilato de oseltamivir, e já pode ser encontrada no plasma em mais ou menos 30 minutos após a ingestão (MOSCONA, 2005; HE et al., 1999).

Existem evidências que o fosfato de Oseltamivir possui o potencial de reduzir o aumento da taxa de fagocitose de micro-organismos por leucócitos promovida pela dessiliação de plaquetas, essas plaquetas tornam-se alvos de fagocitose justamente pela função de reconhecimento do próprio e não próprio que os ácidos siálicos promovem (ZHANG et al., 2015).

Por esse motivo, esse estudo busca analisar o comportamento fagocítico *in vitro* de neutrófilos humanos pré-tratados com Oseltamivir e estimulados pelo LPS. Sabendo que o LPS pode promover uma resposta desregulada do sistema imune devido a esse processo de superativação, queremos observar como é o comportamento fagocítico de neutrófilos

humanos quando estimulado com LPS e tentar entender o quanto desse estímulo promovido é derivado da clivagem dos ácidos siálicos realizada pela enzima neuraminidase. Com a utilização do fármaco Oseltamivir teremos uma resposta aproximada, pois como o carboxilato de Oseltamivir é seletivo da enzima neuraminidase, o utilizaremos como mecanismo de investigação. Mas esse fármaco e outros inibidores de neuraminidase também poderiam ser utilizado em futuros casos clínicos, se nossos resultados coincidirem com a hipótese, como um medicamento profilático para evitar a morte devido ao dano tecidual causado por leucócitos durante a sepse.

2 HIPÓTESE

O pré-tratamento com fosfato de oseltamivir inibe a ativação de neutrófilos humanos induzida pelo LPS.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo do trabalho é analisar o efeito da neuraminidase no comportamento fagocítico de neutrófilos humanos quando estimulados por LPS. Essa investigação será feita com uso do Oseltamivir, um fármaco inibidor de neuraminidase.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da neuraminidase de neutrófilos humanos na resposta fagocítica estimulada pelo LPS em sangue total por meio de microscopia de campo claro pela interação ou não de partículas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*, utilizando o Oseltamivir como ferramenta de investigação;
- Verificar o efeito da neuraminidase de neutrófilos humanos na resposta fagocítica estimulada pelo LPS em sangue total por meio de microscopia de campo claro pela quantidade de partículas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* que cada neutrófilo interagiu, utilizando o Oseltamivir como ferramenta de investigação
- Avaliar a eficiência do processo de morte bacteriana realizado por leucócitos tanto de maneira intracelular quanto extracelular quando *E. coli* e *S. aureus* são incubadas com sangue total estimulado com LPS e pré-tratado com fosfato de Oseltamivir;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Os experimentos foram realizados no laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Spiller, localizado no Departamento de Farmacologia (FMC) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 VIABILIDADE TÉCNICA

Os experimentos foram possíveis devido aos materiais utilizados nos procedimentos experimentais que já se encontravam no laboratório e todas as metodologias estavam padronizadas.

4.3 COLETA DE SANGUE E ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE: 82815718.2.0000.0121). Os voluntários saudáveis foram recrutados para doação de sangue. Após esclarecimentos quanto aos objetivos do estudo, metodologia que foi utilizada e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi então, realizada a coleta de 4 mL de sangue para desenvolvimento da pesquisa.

Para o desenvolvimento da pesquisa foi utilizado amostras de sangue de doadores saudáveis entre 18 e 41 anos, os quais não apresentavam sintomas de doenças crônicas, não declararam situação de estresse e que não tenham ingerido bebida alcóolica nas últimas 24 horas.

As amostras de sangue foram coletadas em tubo a vácuo contendo K3EDTA (Labor Import, Brasil), homogeneizadas lentamente e transportadas adequadamente para o fluxo laminar. Alíquotas de 100 μ L de sangue foram coletadas em tubo eppendorf de 0,6 mL para análise no contador hematológico ABX Micro 60 (Horiba ABX SAS, França) para contagem de leucócitos totais.

4.4 BACTÉRIAS UTILIZADAS

Nesse estudo, foram utilizadas a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 (não expressa o gene NanA responsável pela síntese de neuraminidase bacteriana) e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Foi realizado o crescimento dessas bactérias em um período de 14 horas em placas de BHI (*Brain-heart infusion* da marca KASVI) à uma temperatura de 37°C. Após esse crescimento, algumas colônias foram transferidas para o meio de BHI em caldo e realocadas em estufa a 37°C para crescimento até atingirem um DO (Densidade óptica) de absorbância no entorno de 0,6 em 600nm medidos no Espectrofotômetro. Após atingirem este DO, as amostras foram lavadas em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com processos de centrifugação (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 3000 RPM, durante 15 minutos para formação do *pellet* (em português sedimento) e ressuspensão em PBS, esse processo foi realizado duas vezes para uma retirada mais eficaz de resquícios de BHI.

Após a ressuspensão, foi novamente quantificado o DO das amostras e utilizando curvas já feitas no laboratório ou descritas na literatura, foi calculado o volume suficiente da bactéria desejada para a seleção de 10^6 UFC (Unidades formadoras de colônias) para a incubação em sangue total.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NEURAMINIDASE NO MECANISMO FAGOCÍTICO DE NEUTRÓFILOS

Nesse experimento foi realizada a incubação a 37°C de volumes com 10^6 UFC da bactéria *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 em um volume de sangue total contendo 10^6 leucócitos totais por um período de 90 minutos. Amostras de sangue foram pré-tratadas com 100 μ M de fosfato de oseltamivir 210 minutos antes da incubação e estimuladas com LPS 1,0 μ g/mL 90 minutos antes da incubação, também realizamos todos os procedimentos de estufa em um grupo não estimulado (NE) e um grupo somente estimulado com LPS para elucidação dos estudos. Então temos 3 grupos: NE (não estimulado), LPS (somente estimulado com LPS) e LPS + Osel (estimulado com LPS e pré-tratado com Oseltamivir).

Após o período de incubação, o material foi retirado da estufa e foi feita a lise das hemácias utilizando tampão de lise (NH_4Cl 0.15 M; EDTA 0.1 mM; Na_2HCO_3 12 mM)

adicionado na amostra e colocado em repouso por um período de 7 minutos, seguido de uma centrifugação a 270g por 7 minutos, esse processo foi realizado duas vezes para completa lise das hemácias da amostra. Ao término do processo a amostra foi ressuspensa em PBS. Esses processos foram seguidos da fixação das células nas lâminas por meio da centrífuga citológica e a coloração das lâminas por panótico rápido.

Finalizando a coloração, a leitura de lâminas foi feita em microscópio óptico (Olympus CX41), será feita a contagem de 100 neutrófilos em cada lâmina. Os critérios avaliados nos neutrófilos foram: a quantidade de neutrófilos que fagocitaram bactérias e a quantidade de partículas de bactérias que cada neutrófilo teve interação. Esse experimento e a avaliação dele é uma adaptação do método utilizado por Torres-Dueñas et al. (2007). A análise estatística foi feita por teste T entre cada um dos grupos para avaliar ou não diferença significativa e ANOVA entre os 3 grupos ao mesmo tempo para avaliar diferença estatística significativa entre as amostras.

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO MECANISMO DE MORTE BACTERIANA APÓS A FAGOCITOSE

Nesse experimento foi realizada a incubação a 37°C de volumes com 10⁶ UFC da bactéria *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 em um volume de sangue total contendo 10⁶ leucócitos totais por um período de 180 minutos. Amostras de sangue foram pré-tratadas com 100µM de oseltamivir 210 minutos antes da incubação e estimuladas com LPS 1,0 µg/mL 90 minutos antes da incubação, também realizamos todos os procedimentos de estufa em um grupo não estimulado (NE) e um grupo somente tratado com LPS para elucidação dos estudos. Então temos 3 grupos: NE (não estimulado), LPS (somente estimulado com LPS) e LPS + Osel (estimulado com LPS e pré-tratado com Oseltamivir).

Ao fim do período de incubação, a lise das hemácias foi realizada por meio do tampão de lise (NH₄Cl 0.15 M; EDTA 0.1 mM; Na₂HCO₃ 12 mM) adicionado na amostra e colocado em repouso por um período de 7 minutos, seguido de uma centrifugação a 270g por 7 minutos, esse processo foi realizado duas vezes para completa lise das hemácias da amostra, ao término do processo a amostra foi ressuspensa em PBS.

Logo após foi feita uma centrifugação a 270g e 4°C durante 10 minutos para que os leucócitos formassem um *pellet*, o sobrenadante foi realizada uma diluição seriada seguida de plaqueamento em ágar BHI para amostragem do meio extracelular.

Para amostragem do meio intracelular, o material foi centrifugado a 270g por 10 minutos a 4°C e ressuspendido em PBS, esse processo é realizado duas vezes para retirada de bactérias do meio extracelular que não interagiram com leucócitos, na segunda suspensão o material foi ressuspendido em TRITON-X 1% para a lise dos leucócitos e exposição do conteúdo intracelular, após um período de 5 minutos para ação do TRITON e por fim foi realizada uma diluição seriada e as amostras foram inoculadas em placas de ágar BHI.

Após um período de 12 a 24 horas de incubação das placas em uma estufa a 37° C, foi avaliado o crescimento das bactérias baseado na formação de colônias na placa, pois as bactérias que conseguiram resistir ao processo de *killig* de neutrófilos formaram colônias. Esse experimento e a avaliação dele também é uma adaptação do método utilizado por Torres-Dueñas et al. (2007) A análise estatística foi feita por teste T entre cada um dos grupos para avaliar ou não diferença significativa e ANOVA entre os 3 grupos ao mesmo tempo para avaliar diferença estatística significativa entre as amostras..

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OSELTAMIVIR INIBE O AUMENTO DA FAGOCITOSE INDUZIDA PELO LPS

A leitura foi feita em microscopia óptica em campo claro, contando 100 neutrófilos de cada grupo. Foram avaliados dois critérios durante a contagem, um deles foi a quantidade de neutrófilos que fagocitaram *E. coli* ou *S. aureus* (Gráfico 1), e o segundo critério foi realizada uma contagem de partículas bacterianas interagindo com neutrófilos (Gráfico 2).

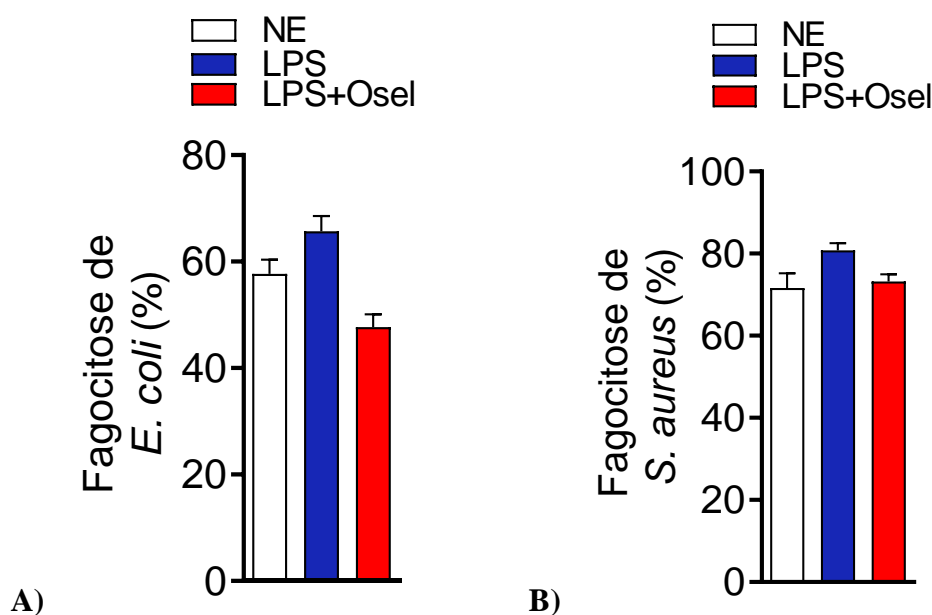


Gráfico 1: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose por neutrófilos induzido pelo LPS. Sangue total (n=3) contendo 10^6 leucócitos totais foi incubado com *E. coli* ou *S. aureus* (10^6 UFC) por 1 hora e meia.

Posteriormente, foi realizada a lise das hemácias, seguida da fixação dos leucócitos em lâmina pela centrifugação em CytoSpin e a coloração por panótico rápido. **1A)** As amostras são diferentes entre si**, onde o grupo tratado com LPS fagocita mais do que o grupo LPS+Oseltamivir**. O grupo LPS+Oseltamivir e o grupo NE são similares*. **1B)** As amostras são diferentes entre si*. O grupo estimulado com LPS fagocita mais do que NE e LPS+Oseltamivir*. Os grupos NE e LPS+Oseltamivir são similares*. * = **P 0,05** **P= **0,005**

É possível observar no Gráfico 1 um aumento na taxa de neutrófilos que fagocitaram quando estimulados com LPS e uma diminuição dessa taxa de fagocitose quando pré-tratados com Oseltamivir $100\mu\text{M}$. Um dos mecanismos propostos para a ação do LPS é através do seu reconhecimento pelo TLR4 e a ativação da enzima neuraminidase endógena que estimula a ativação celular pela clivagem do ácido siálico presente na superfície celular. Com a ação do Oseltamivir (inibidor competitivo da enzima), quando a enzima neuraminidase é ativada, a ação dela não ocorre nos ácidos siálicos da célula, e sim no fosfato de Oseltamivir, evitando com que ocorra a clivagem dos ácidos siálicos endógenos e a ativação celular causada pelo

LPS.

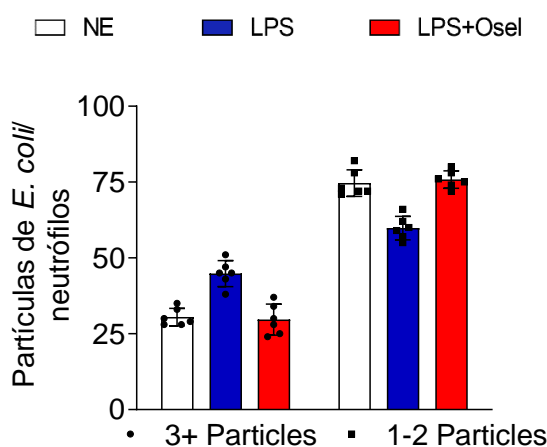


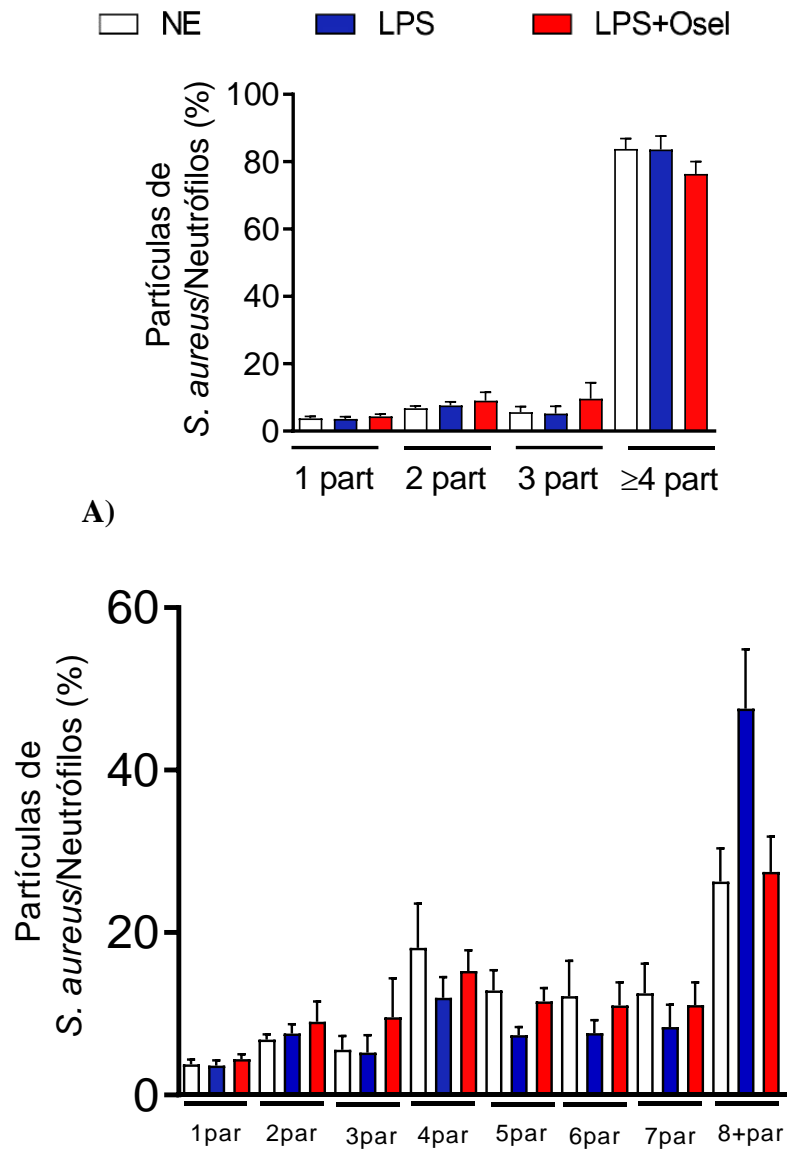
Gráfico 2: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose de *E. coli* realizada por neutrófilos quando estimulados por LPS. Sangue total (n=5) contendo 10^6 leucócitos totais foi incubado com *E. coli* ou *S. aureus* (10^6 UFC) por 1 hora e meia. Posteriormente, foi realizada a lise das hemácias, seguida da fixação dos leucócitos em lâmina pela centrifugação em CytoSpin e a coloração por panótico rápido. Os grupos NE, LPS e LPS+Oseltamivir são diferentes entre si tanto com 1-2 partículas quanto 3+ partículas**. Podemos perceber uma similaridade entre os grupos NE e LPS+Oseltamivir**. O grupo LPS interage com mais partículas de *E. coli* que NE* e LPS*. *= P 0,05 **P= 0,005.

Após a contagem de neutrófilos que realizaram fagocitose, o segundo critério estabelecido foi a contagem da quantidade de partículas que interagiram com cada neutrófilo que realizou a fagocitose, também por meio de microscopia óptica e dos mesmos grupos citados anteriormente. Foi visto que neutrófilos estimulados com LPS, além de terem uma taxa de fagocitose maior, possuem também um maior aumento na quantidade de *E. coli* fagocitadas. Entretanto, não observamos diferença significativa no número de *S. aureus* ingeridas quando os neutrófilos foram tratados com LPS ou LPS+Oseltamivir (Gráfico 3A).

Como os resultados referentes ao gráfico 3A em relação a *S. aureus* foram inconclusivos, foi realizada uma nova contagem, mas dessa vez utilizando como limite oito partículas ao invés de quatro (Gráfico 3). É perceptível que assim como nos resultados com *E. coli* o estímulo com LPS aumenta a taxa de fagocitose realizada por neutrófilos e o pré-tratamento com Oseltamivir 100 μ M consegue neutralizar essa resposta, fazendo com que o neutrófilo tenha uma resposta similar ao grupo não estimulado. Apesar de cada grupo possuir picos diferentes em determinados números de partículas fagocitadas, quando observamos o grupo estimulado com LPS em 8+ partículas, é perceptível que ocorre um grande aumento na quantidade de partículas fagocitadas pelos neutrófilos, provavelmente devido a superativação causada pelo LPS.

Por estatística é demonstrado que o estímulo com LPS faz com que seja apresentado

um aumento no número de neutrófilos que realizam fagocitose de 8+ partículas de *S. aureus* e que o pré-tratamento com fosfato de Oseltamivir inibe esse efeito ativatório causado pelo LPS.



B)
Gráfico 3: Oseltamivir inibe o aumento da fagocitose de *S. aureus* realizada por neutrófilos quando estimulados por LPS. Sangue total (n=5) contendo 10^6 leucócitos totais foi incubado com *S. aureus* (10^6 UFC) por 1 hora e meia. Posteriormente, foi realizada a lise das hemácias, seguida da fixação dos leucócitos em lâmina pela centrifugação em CytoSpin e a coloração por panótico rápido. Grupo NE e LPS+Oseltamivir não demonstraram diferença significativa. **3A)** Os grupos não possuem diferença entre si, então uma nova contagem foi realizada. **3B)** Aqui a análise será feita em 8+ partículas. Os grupos NE, LPS e LPS+Oseltamivir são diferentes entre si***. O grupo LPS interage mais que os grupos NE** e LPS+Oseltamivir***. O que demonstra que quando o sangue total é estimulado com LPS, neutrófilos interagem com mais partículas de *S. aureus*. Os grupos NE e LPS+Oseltamivir são similares, demonstrando que o estímulo fagocítico de neutrófilos pelo LPS é suprimido pelo Oseltamivir. *= P 0,05 **P= 0,005 ***=P=0,0005.

5.2 OSELTAMIVIR INIBIU O AUMENTO DE MORTE INTRACELULAR E EXTRACELULAR DE *E. coli* INDUZIDA PELO LPS

A bactéria *E. coli* no grupo com leucócitos estimulados com LPS possui uma taxa de sobrevivência menor, e assim demonstrando um menor crescimento de colônias na placa tanto no meio intracelular quanto extracelular. O grupo LPS+Oselt apresenta um crescimento de bactérias similar ao do grupo NE, ambos demonstrando uma menor morte bacteriana quando comparados ao grupo LPS, essa similaridade acontece provavelmente devido a ação do fosfato de oseltamivir.

Quando há o estímulo prévio com o LPS, o reconhecimento dessa molécula gera uma cascata de sinalização que resulta na ativação dos leucócitos, como citado na introdução, apesar de garantir uma sobrevivência menor de *E. coli* como observado neste resultado, pode resultar em diversos problemas locais e sistêmicos no corpo humano (ZHANG et al., 2016; MCGOWN et al., 2011). O Oseltamivir promove uma resposta capaz de suprimir o estímulo causado pelo LPS e garantir uma resposta imune similar a condições homeostáticas, mesmo em casos onde o organismo possui uma pré-exposição à molécula de LPS.

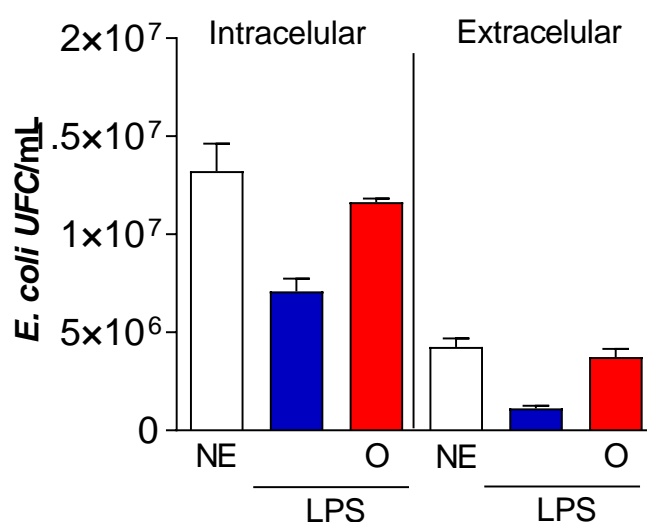


Gráfico 4: Oseltamivir inibe o killing de *E. coli* induzido pelo LPS. Sangue total (n=5) foi incubado com *E. coli* (10^6 UFC) por 3 horas. Posteriormente, foi centrifugada em 4°C para formação de um *pellet* de leucócitos, descartado o sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em TRITON-X 1%. Foi realizada a diluição seriada, os grupos diluídos em 10x, 100x e 1.000x tiveram $10\mu\text{L}$ coletados, plaqueados em meio BHI ágar e incubados a 37°C , as colônias foram contadas após 24h. Os grupos NE, LPS e LPS+Oselt apresentam diferença estatística entre si tanto intracelular** quanto extracelular***. No intracelular o grupo estimulado com LPS o crescimento bacteriano de *E. coli* é menor que nos grupos NE** e LPS+Oselt***. No

extracelular, o crescimento de *E. coli* também é menor no grupo estimulado pelo LPS que nos grupos NE*** e LPS+Osel***. NE e LPS+Osel são similares tanto no extracelular quanto no intracelular. Demonstrando que o LPS estimula o *killing* de *E.coli* realizado por leucócitos e que o Oseltamivir suprime essa resposta de forma que a resposta seja similar ao grupo NE. *= P 0,05 **P= 0,005 ***=P=0,0005.

A análise estatística confirma que o grupo estimulado com LPS têm uma menor taxa de sobrevivência de *E. coli*, tanto intracelular quanto extracelular, essa resposta causada pelo LPS é suprimida pelo fosfato de Oseltamivir, onde os grupo LPS+Osel demonstram resultados similares aos grupos NE.

5.3 OSELTAMIVIR INIBIU A SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *S. aureus* INDUZIDA PELO LPS

Observando e comparando com os resultados apresentados previamente derivados dos experimentos com *E. coli*, temos agora os resultados provenientes de experimentação realizada com a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. No *killing* realizado com *S. aureus* é perceptível que quando estimulados com LPS, as bactérias possuem uma sobrevivência maior no meio intracelular, do que quando comparadas com o grupo não estimulado. O pré-tratamento com Oseltamivir inibiu a sobrevivência intracelular causada pelo estímulo com LPS. Apesar disso, no meio extracelular ocorreu o contrário, os grupos não estimulado e o grupo pré-tratado com oseltamivir e estimulado com LPS possuem uma menor taxa de morte bacteriana do que o grupo somente estimulado pelo LPS (Gráfico 5).

A bactéria *S. aureus* possui uma sobrevivência intracelular pós processo de fagocitose já conhecida e descrita em estudos dos anos de 1950 e 1960 (KAPRAL 1959), também se é reconhecido que essa sobrevivência intracelular pós fagocitose também estimula processos infecciosos (GRESHAM, 2000). O curioso é perceber que a superativação de neutrófilos oriunda do estímulo por LPS garante uma sobrevivência maior da *S. aureus*, a qual tem resultados positivos de controle via pré-tratamento com 100 µM de fosfato de oseltamivir, onde os resultados são similares ao grupo não estimulado.

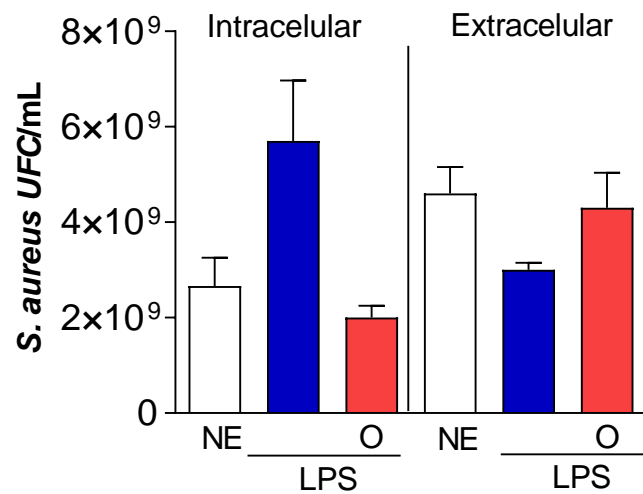


Gráfico 5: Oseltamivir inibe a sobrevivência intracelular de *S. aureus* induzido pelo LPS. Sangue total (n=3) foi incubado com *S. aureus* (10^6 UFC) por 3 horas. Posteriormente, foi centrifugada em 4°C para formação de um *pellet* de leucócitos, descartado o sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em TRITON-X 1%. Foi realizada a diluição seriada, os grupos diluídos em 1.000x, 10.000x e 100.000x tiveram 10 μL coletados, plaqueados em meio BHI ágar e incubados a 37°C , as colônias foram contadas após 24h. Os grupos NE, LPS e LPS+Osel apresentam diferença estatística entre si tanto intracelular* quanto extracelular*. No intracelular o grupo estimulado com LPS o crescimento bacteriano de *S. aureus* é maior que nos grupos NE* e LPS+Osel*. No extracelular, o crescimento de *E. coli* também é maior no grupo estimulado pelo LPS que nos grupos NE* e LPS+Osel*. NE e LPS+Osel são similares tanto no extracelular quanto no intracelular. Demonstrando que o LPS estimula o *killing* de *S. aureus* realizado por leucócitos e que o Oseltamivir suprime essa resposta de forma que a resposta seja similar ao grupo NE no extracelular. No intracelular o crescimento de *S. aureus* é maior no grupo estimulado por LPS do que quando comparado aos grupos NE e LPS+Osel. *= **P 0,05.**

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- I. O estímulo com LPS resulta em um maior número de neutrófilos que fagocitam e um maior número de partículas das bactérias *E. coli* e *S. aureus* que interagem com neutrófilos do que quando comparado com o grupo não estimulado;
- II. O oseltamivir inibe a ação do LPS sobre neutrófilos em relação ao percentual de neutrófilos que fagocitaram e ao número de partículas que interagem com as células;
- III. A morte de *E. coli* intracelular e a sobrevivência de *S. aureus* intracelular é maior no grupo estimulado com LPS, ambas inibidas pelo pré-tratamento com oseltamivir. Além disso tanto com *E. coli* quanto com *S. aureus*, o estímulo com LPS gerou uma maior taxa de morte extracelular da bactéria do que quando comparado com o grupo não estimulado. O pré-tratamento com Oseltamivir 100 μ M inibiu o efeito do LPS sobre a morte de ambas as bactérias.

Apesar de podermos ter estas conclusões diante dos resultados, ainda existem alguns reverses derivados dos métodos utilizados. Os experimentos de fagocitose, onde a contagem foi realizada por microscopia de campo claro possuem um resultado um pouco subjetivo devido a falta de uma visão tridimensional do método, então mesmo que digamos que a bactéria está presente no interior do neutrófilo não temos certeza absoluta que ela não está apenas acima ou abaixo do neutrófilo interagindo com a sua superfície.

Além disso, nos resultados de *killing* com *S. aureus* possuem um N amostral menor do que os resultados com *E. coli*, então seria necessário realizar novos experimentos para confirmar os resultados obtidos.

Acredito que esse trabalho possui resultados similares a outros estudos que já demonstraram que a enzima neuraminidase é importante para o efeito fagocítico de outras células do sistema imune, como os macrófagos, pois nessas células quando a atividade da enzima foi diminuída a função fagocítica foi afetada negativamente (SEYRANTEPE et al., 2009; ALLENDORF; PUIGDELLÍVOL; BROWN, 2019).

Por isso, mesmo com as inconsistências experimentais citadas acreditamos que é possível sugerir que em neutrófilos humanos a enzima neuraminidase possa ser regulada em condições infecciosas (por exemplo, na presença de PAMPs como o LPS).

REFERÊNCIAS

- 1) ALLENDORF, David H.; PUIGDELLÍVOL, Mar; BROWN, Guy C.. Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia*, [S.L.], v. 68, n. 5, p. 989-998, 27 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23757>.
- 2) ALI, Syed Raza; FONG, Jerry J.; CARLIN, Aaron F.; BUSCH, Tamara D.; LINDEN, Rebecka; ANGATA, Takashi; ARESCHOUG, Thomas; PARAST, Mana; VARKI, Nissi; MURRAY, Jeffrey. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 211, n. 6, p. 1231-1242, 5 maio 2014. Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20131853>
- 3) AMITH, Schammim Ray; JAYANTH, Preethi; FRANCHUK, Susan; SIDDIQUI, Sarah; SEYRANTEPE, Volkan; GEE, Katrina; BASTA, Sameh; BEYAERT, Rudi; PSHEZHETSKY, Alexey V.; SZEWCZUK, Myron R.. Dependence of pathogen molecule-induced Toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. **Glycoconjugate Journal**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 1197-1212, 9 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-009-9239-8>.
- 4) AMITH, Schammim R.; JAYANTH, Preethi; FINLAY, Trisha; FRANCHUK, Susan; GILMOUR, Alanna; ABDULKHALEK, Samar; SZEWCZUK, Myron R.. Detection of Neu1 Sialidase Activity in Regulating TOLL-like Receptor Activation. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], v. 2142, n. 43, p. 1-3, 7 set. 2010. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/2142>.
- 5) AMITH, Schammim Ray; JAYANTH, Preethi; FRANCHUK, Susan; FINLAY, Trisha; SEYRANTEPE, Volkan; BEYAERT, Rudi; PSHEZHETSKY, Alexey V.; SZEWCZUK, Myron R.. Neu1 desialylation of sialyl α -2,3-linked β -galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. **Cellular Signalling**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 314-324, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.038>.

- 6) ANGATA, T.; MARGULIES, E. H.; GREEN, E. D.; VARKI, A.. 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**, [S.L.], v. 101, n. 36, p. 13251-13256, 26 ago. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404833101>.
- 7) BORNHÖFFT, Kim F.; GOLDAMMER, Tom; REBL, Alexander; GALUSKA, Sebastian P.. Siglecs: a journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. **Developmental & Comparative Immunology**, [S.L.], v. 86, p. 219-231, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.008>.
- 8) BÜLL, Christian; HEISE, Torben; ADEMA, Gosse J.; BOLTJE, Thomas J.. Sialic Acid Mimetics to Target the Sialic Acid–Siglec Axis. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 519-531, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.03.007>.
- 9) CARLIN, Aaron F.; UCHIYAMA, Satoshi; CHANG, Yung-Chi; LEWIS, Amanda L.; NIZET, Victor; VARKI, Ajit. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood*, [S.L.], v. 113, n. 14, p. 3333-3336, 2 abr. 2009. **American Society of Hematology**. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-11-187302>.
- 10) CASTANHEIRA, Fernanda V. S.; KUBES, Paul. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, [S.L.], v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 16 maio 2019. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>.
- 11) CHANG, Yung-Chi; UCHIYAMA, Satoshi; VARKI, Ajit; NIZET, Victor. Leukocyte Inflammatory Responses Provoked by Pneumococcal Sialidase. *Mbio*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-10, 3 jan. 2012. **American Society for Microbiology**. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00220-11>.
- 12) CHRISTOFFERSSON, Gustaf; PHILLIPSON, Mia. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas?. **Cell And Tissue Research**, [S.L.], v. 371, n.

3, p. 415-423, 12 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-017-2780-z>.

13) CORFIELD, Tony. Bacterial sialidases—roles in pathogenicity and nutrition. **Glycobiology**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 509-521, 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/2.6.509>.

14) CROCKER, P. Siglecs in innate immunity. **Current Opinion In Pharmacology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 431-437, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2005.03.003>.

15) CROCKER, Paul R.; PAULSON, James C.; VARKI, Ajit. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 255-266, abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2056>.

16) FANG, Jiazhu; FANG, Dan; SILVER, Phyllis B.; WEN, Feng; LI, Bing; REN, Xiangrong; LIN, Qing; CASPI, Rachel R.; SU, Shao Bo. The Role of TLR2, TLR3, TLR4, and TLR9 Signaling in the Pathogenesis of Autoimmune Disease in a Retinal Autoimmunity Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 3092-3099, 1 jun. 2010. **Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)**. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.09-4754>.

17) GRESHAM, Hattie D.; LOWRANCE, Jon H.; CAVER, Tony E.; WILSON, Bridget S.; CHEUNG, Ambrose L.; LINDBERG, Frederik P.. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 164, n. 7, p. 3713-3722, 1 abr. 2000. **The American Association of Immunologists**. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3713>.

18) HE, George; MASSARELLA, Joseph; WARD, Penelope. Clinical Pharmacokinetics of the Prodrug Oseltamivir and its Active Metabolite Ro 64-0802. **Clinical Pharmacokinetics**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 471-484, 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199937060-00003>.

- 19) IZQUIERDO-USEROS, N., LORIZATE, M., McLaren, P. J., TELENTI, A., KRÄUSSLICH, H.-G., & MARTINEZ-PICADO, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. **PLoS Pathogens**. v. 10, n. 7, p. 1-9, Jul. 2014. 10.1371/journal.ppat.1004146
- 20) KAPRAL, Frank A.; SHAYEGANI, Mehdi Gh.. INTRACELLULAR SURVIVAL OF STAPHYLOCOCCI. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 123-138, 1 jul. 1959. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.110.1.123>.
- 21) KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 159-175, 25 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>.
- 22) MACAULEY, Matthew S.; CROCKER, Paul R.; PAULSON, James C.. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 653-666, 19 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3737>.
- 23) MEESMANN, H. M.; FEHR, E.-M.; KIERSCHKE, S.; HERRMANN, M.; BILYY, R.; HEYDER, P.; BLANK, N.; KRIENKE, S.; LORENZ, H.-M.; SCHILLER, M.. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 123, n. 19, p. 3347-3356, 7 set. 2010. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.066696>.
- 24) MIYAGI, Taeko; TSUIKI, Shigeru. Rat-liver lysosomal sialidase. Solubilization, substrate specificity and comparison with the cytosolic sialidase. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 141, n. 1, p. 75-81, maio 1984. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08159.x>.
- 25) MIYAGI, T.; YAMAGUCHI, K.. Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 880-896, 28 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cws057>.

- 26) MIYAGI, Taeko; SAGAWA, Junji; KONNO, Kimio; HANDA, Shizuo; TSUIKI, Shigeru. Biochemical and Immunological Studies on Two Distinct Ganglioside-Hydrolyzing Sialidases from the Particulate Fraction of Rat Brain1. **The Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 107, n. 5, p. 787-793, maio 1990. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123126>.
- 27) MOSCONA, Anne. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 353, n. 13, p. 1363-1373, 29 set. 2005. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra050740>.
- 28) MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. xx, 868 . p.
- 29) NICHOLSON, Lindsay B.. The immune system. **Essays In Biochemistry**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 275-301, 26 out. 2016. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20160017>.
- 30) O'REILLY, Mary K.; PAULSON, James C.. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 240-248, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2009.02.005>.
- 31) POLTORAK, A.. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: mutations in tlr4 gene. **Science**, [S.L.], v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 11 dez. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>.
- 32) SAITO, Megumi; FRONDA, Christian L.; YU, Robert K.. Sialidase Activity in Nuclear Membranes of Rat Brain. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 2205-2208, 23 nov. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66052205.x>.
- 33) SEYRANTEPE, Volkan; IANNELLO, Alexandre; LIANG, Feng; KANSHIN, Evgeny; JAYANTH, Preethi; SAMARANI, Suzanne; SZEWCZUK, Myron R.; AHMAD, Ali; PSHEZHETSKY, Alexey V.. Regulation of Phagocytosis in Macrophages by Neuraminidase 1. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 285, n. 1, p. 206-215, 4 nov. 2009. American

Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.055475>.

34) TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Toll-Like Receptors. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 1-8, maio 2007. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1412s77>.

35) TIZARD, Ian R.. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8ª Edição Roca 2009 p. 608

36) TORRES-DUEÑAS, D; CELES, M R N; A FREITAS,; ALVES-FILHO, J C; SPILLER, F; DAL-SECCO, D; DALTO, V F; A ROSSI, M; FERREIRA, S H; CUNHA, F Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 152, n. 3, p. 341-352, out. 2007. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707393>.

37) VARKI, Ajit; ANGATA, Takashi. Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. **Glycobiology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-27, 13 jul. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwj008>.

38) ZHANG, Fang; LIU, An-Lei; GAO, Shuang; MA, Shui; GUO, Shu-Bin. Neutrophil Dysfunction in Sepsis. **Chinese Medical Journal**, [S.L.], v. 129, n. 22, p. 2741-2744, nov. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.193447>.

39) ZHANG, Xiao-Hui; WANG, Qian-Ming; ZHANG, Jia-Min; FENG, Fei-Er; WANG, Feng-Rong; CHEN, Huan; ZHANG, Yuan-Yuan; CHEN, Yu-Hong; HAN, Wei; XU, Lan-Ping. Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. **Journal Of Hematology & Oncology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-15, 23 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13045-015-0216-3>.