

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

CRISTINA BARTELLE LORENZINI

**INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS PELA ALFA-1-
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA: RELEVÂNCIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS**

Florianópolis
2015

CRISTINA BARTELLE LORENZINI

**INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS PELA ALFA-1-
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA: RELEVÂNCIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

Florianópolis
2015

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

Lorenzini, Cristina Bartelle
INIBIÇÃO DA QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS PELA ALFA-1-
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA: RELEVÂNCIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS /
Cristina Bartelle Lorenzini ; orientador, Fernando
Spiller - Florianópolis, SC, 2015.
99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Neutrófilos. 3. Quimiotaxia. 4.
Siglec. 5. Alfa-1-glicoproteína ácida. I. Spiller, Fernando
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"A lectina bacteriana SMTL-13 regula morte celular e produção de fator de necrose tumoral em macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*".
por

STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 09/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

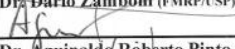


Prof. Dr. André Báfica (MIP/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Dario Zamboni (FMRP/USP)



Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto (MIP/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Oscar Bruna Romero (MIP/CCB/UFSC)

Coordenador:



Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 14 de abril de 2014.

Dedico este trabalho ao meu pai
Cezar por todo apoio e amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador e amigo Prof. Fernando Spiller por ter me apresentado à ciência e por abrir as portas do laboratório me oferecendo todo apoio para realização desse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, críticas, paciência, pela amizade, mas principalmente por contribuir imensamente para que hoje eu finalize essa etapa como uma pessoa muito melhor.

Ao professor André Báfica pelas discussões enriquecedoras e ensinamentos científicos que contribuíram diretamente para minha formação. Seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento e formação de senso crítico.

Ao professor Daniel Mansur pelas suas contribuições, críticas e discussões, sempre muito engrandecedoras.

Aos professores Adriane Todeschini, Jamil Assreuy e Juliano Ferreira, assim como à Dra. Patricia Dillenburg Pilla que gentilmente se dispuseram a avaliar este trabalho.

Agradeço a todos os professores que contribuíram com o empréstimo de reagentes e ferramentas para que esse trabalho fosse concluído. Aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia por disponibilizarem seu laboratório, pelo empréstimo de reagentes, equipamentos, além das contribuições científicas.

Aos professores do departamento de Farmacologia que de uma maneira ou outra fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional. Em especial ao professor Anicleto Poli por me receber na UFSC, assim como pelos ensinamentos, paciência e consideração com que sempre me tratou.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório que nesses dois anos deixaram de ser colegas e passaram a ser grandes amigos. Agradeço a cada um de vocês pelas críticas, discussões e ajudas nos experimentos. Tudo que aprendi sobre “a vida no laboratório” devo a vocês. Agradeço também por todas as conversas de bar, festas “temáticas”, aniversários, congressos.....enfim, essa caminhada se tornou muito mais leve com a presença de vocês.

Agradeço em especial àqueles que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Lívia, Filho, Puka, Murilo e claro a Flávia, a quem agradeço por todo carinho e dedicação mas principalmente por ter contribuído imensamente para que este trabalho fosse finalizado. Meu muito obrigada de coração.

À Fernanda Junkes, Livia Yamashiro e Reanata Fleith por cuidarem de mim e de meus prazos. Agradeço o carinho sincero e a amizade verdadeira que levo do mestrado para a vida.

Aos meus amigos por inúmeras vezes estarem dispostos a ouvir minhas lamentações, assim como por dividirem comigo as alegrias da vida. Em especial aos amigos Paloma e Binho que se tornaram minha família aqui em Floripa. Agradeço imensamente pela acolhida de todo final de semana, pela amizade, carinho e apoio. Com certeza sem vocês minha vida não seria tão divertida.

Às minhas duas pequenas que fazem meus dias muito mais felizes.

À minha mãe e ao meu pai, pelo exemplo de integridade e dedicação, pelas palavras de conforto, incentivo e seu amor incondicional. À minha irmã por estar sempre ao meu lado na caminhada da vida, pelos conselhos sinceros e amor maior. Sem vocês eu nada seria!

RESUMO

A chegada dos neutrófilos até o foco da inflamação desenvolve papel essencial na resposta inflamatória. Além de serem uma população celular fundamental para conter e eliminar o patógeno, seu acúmulo leva ao dano tecidual uma vez que essas células não são capazes de discriminar entre as células do hospedeiro e o agente causador da inflamação. Neutrófilos se acumulam no local da inflamação através de uma série de eventos sequenciais, entre eles a quimiotaxia. A quimiotaxia é responsável por guiar os neutrófilos até o foco exato da inflamação. Estudos experimentais demonstram que a proteína de fase aguda Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) é capaz de interferir nesse processo, pois inibe o rolamento, a adesão e a migração dos neutrófilos *in vivo*, assim como a quimiotaxia *in vitro*. Altamente glicosilada, aproximadamente 12% dos carboidratos da AGP são de ácido siálico. Dentre os receptores que reconhecem os ácidos siálicos estão as lectinas do tipo Siglecs (*Sialic acid binding Ig-like lectins*). Siglecs apresentam em sua estrutura um domínio inibitório capaz de interferir na resposta intracelular ativada por outros receptores. Assim, a hipótese deste estudo é de que os resíduos de ácido siálico presentes na estrutura da AGP seriam responsáveis pela ativação de Siglec-5 e/ou 9, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos. Para investigar essa hipótese, foi gerada uma AGP desialilada sem a presença desse carboidrato. Neutrófilos tratados com essa proteína foram submetidos a um ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden. Esse ensaio revelou que a retirada do ácido siálico reverteu o perfil inibitório induzido pela proteína sialilada. Ainda mais, os resultados demonstram que o ácido siálico em sua forma livre também foi capaz de inibir a quimiotaxia de maneira equivalente à AGP. Sabendo que a AGP é capaz de ligar-se à superfície dos neutrófilos, procurou-se investigar se essa interação ocorre através da ligação do ácido siálico à Siglec-5 ou 9. Para isso foi feita uma citometria de fluxo e avaliada a intensidade de fluorescência emitida pela AGP ou por anticorpos fluorescentes anti-hSiglec-5 e 9, quando na presença de anticorpos neutralizantes hSiglec-5 e 9 ou da AGP não marcada, respectivamente. No entanto nenhuma diferença na média de intensidade de fluorescência foi observada. Em conjunto nossos resultados sugerem que o reconhecimento do ácido siálico é necessário na inibição da quimiotaxia induzida pela AGP.

Palavras chave: Quimiotaxia, alfa-1-glicoproteína ácida, neutrófilo, ácido siálico, Siglecs.

ABSTRACT

Neutrophil recruitment has a central role in host response and in resolution of inflammation, but if uncontrolled can lead to severe tissue damage. Overwhelming activation of neutrophils result in an inappropriate infiltration of neutrophils known to elicit cell and tissue damage that can lead to an organ dysfunction. The acute phase protein Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) was shown to inhibit neutrophil migration, rolling and adhesion *in vivo*. AGP also inhibits neutrophil chemotaxis *in vitro*, and evidence suggests that AGP terminal sialic acid residues interact with an inhibitory receptor known as Siglec (*Sialic-acid-binding immunoglobulin-like*). However, how AGP affects neutrophil-response is not completely understood. In this study, we examine mechanisms related to the effect of AGP on neutrophil chemotaxis responses, and we hypothesized that Alpha-1-acid glycoprotein inhibits neutrophil chemotaxis *in vitro* by Siglec-5 e/or 9 activation. AGP 6 μ M inhibits neutrophil migration *in vitro*, as does 6 μ M of sialic acid, when compared with control neutrophils. Neuraminidase treatment of AGP reversed the suppressive effect of the protein. To investigate how AGP interacts with neutrophils, flow cytometry analyses using AGP labeled with Alexa Fluor 488 and hSiglec-5 and 9 neutralizing antibodies, or AGP and hSiglec-5 and 9 fluorescent antibodies were used. Although no difference in the MFI was observed. Taken together these results suggest that sialic acid recognition is required for its inhibitory function, and that the interaction of AGP with neutrophils depend on this carbohydrate. However, this study was not able to determine if this interaction was due to the ligation of AGP sialic acid to the receptor Siglec-5 and/or -9.

Keywords: Chemotaxis, Alpha-1-acid glycoprotein, neutrophil, sialic acid, Siglecs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipo das células isoladas com gradiente de Percoll.....	56
Figura 2. Avaliação da viabilidade celular em decorrência do tratamento com AGP ou Neu5Ac.....	57
Figura 3. O tratamento com LPS induz uma resposta quimiotática em neutrófilos <i>in vitro</i>	59
Figura 5. AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	62
Figura 6. O ácido siálico inibe a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	64
Figura 7. Purificação por exclusão de tamanho em FPLC da AGP desialilada, após tratamento com neuraminidase.	65
Figura 8. Confirmação da remoção do ácido siálico da AGP e avaliação da presença de outros carboidratos.....	67
Figura 9. AGP inibe a quimiotaxia dos neutrófilos humanos de maneira parcialmente dependente de ácido siálico.	68
Figura 10. AGP liga-se à superfície de neutrófilos.	70
Figura 11. O tratamento com AGP não foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência de neutrófilos marcados com anti-Siglec-5 ou -9.....	71
Figura 12. O tratamento com anti-Siglec-5 ou -9 neutralizantes não interfere na ligação entre a AGP marcada e os neutrófilos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP –adenosina difosfato
AGP - alfa-1-glicoproteína ácida
APPs – proteínas de fase aguda
BSA – albumina bovina sérica
C5a - quinto fragmento do complemento ativado
CCR2 - chemokine receptor type 2
CXCR – *CXC chemokine Receptor*
DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica
EPM - erro padrão médio
ESL-1 - *E-selectin ligand-1*
FITC - fluoresceína
fMLP - *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine*
FPLC - *fast protein liquid chromatography*
FSC - *forward scatter*
GPCR - receptores acoplados à proteína G
i.v. – intravenosa
ICAM - *intercellular adhesion molecule*
Ig Immune globulin
IgSF - imunoglobulin superfamily
IIFNs - interferon do tipo I
IL - interleucina
ITAM - tyrosine-based activation motifs
ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
LAD I - Leukocyte adhesion deficiency-1
LAL - Limulus Amebocyte Lysate
LFA1 - *lymphocyte function-associated antigen*
LPS - lipopolissacarídeo
LTB4 – leucotrieno B4
MAC 1 - Macrophage-1 antigen
MAG - *Myelin-associated glycoprotein*
MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*
NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
NETs - *neutrophil extracellular traps*
Neu5AC -*N-acetylneuraminic acid*,
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos
PBS - tampão fosfato salina
PE - ficoeritrina
PECAM - *platelet endothelial cell adhesion molecule*
PGN - *Peptidoglycan*

PI3K - *phosphoinositide-3 kinase*
PILR - *Paired immunoglobulin-like receptor*
PIP2 - *phosphatidylinositol (3,4,)-bisphosphate*
PIP3 - *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*
PKB- Protein kinase B
PRRs - receptores de reconhecimento padrão
PSGL-1 - *P-selectin glycoprotein ligand-1*
SHIP - *SH2-containing inositol phosphatase*
SHP 1 - *SH2-containing phosphatase 1*
SHP 2 - *SH2-containing phosphatase 2*
Siglecs - *sialic acid binding Ig-like lectins*
SSC - side scatter
SYK - *tyrosine-protein kinase*
TLR – *toll-like receptor*
TNF - fator de necrose tumoral
TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
VCAM - *vascular cell adhesion molecules*
VLA 4 - *Very Late Antigen-4*

SUMÁRIO

1	Introdução.....	23
1.1	Neutrófilos.....	23
1.2	Lectinas do tipo I – Siglecs (Sialic acid-binding Ig super-family lectins).....	31
1.3	Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP).....	36
2	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos.....	39
3	Materiais e métodos.....	41
3.1	Avaliação da presença de contaminantes na AGP ...	41
3.1.1	Análise da contaminação por outras proteínas..	41
3.2	Western blot.....	42
3.3	Quantificação de endotoxina.....	42
3.4	Obtenção de neutrófilos humanos.....	43
3.4.1	Amostras de sangue humano e considerações éticas.....	43
3.4.2	Obtenção de neutrófilos a partir de sangue periférico humano.....	43
3.4.3	Análise fenotípica da população celular obtida na separação por gradiente de Percoll®.....	44
3.4.4	Avaliação por citometria de fluxo de morte celular em células incubadas com Alfa-1-glicoproteína ácida...	45
3.5	Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos.....	46
3.6	Retirada do ácido siálico presente na Alfa-1-glicoproteína ácida.....	47
3.6.1	Desialilação da AGP por neuraminidase.....	47
3.6.2	Avaliação da presença de carboidratos na AGP desialilada.....	48
3.6.3	Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA).....	48
3.7	Marcação da AGP com <i>Alexa Fluor 488</i>	49
3.8	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford ...	49
3.9	Citometria de Fluxo.....	50
3.10	Soluções.....	50

3.10.1	Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X.....	50
3.10.2	Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X.....	51
3.10.3	Tampão de ácido acético	51
3.10.4	Solução de Hank's (HBSS).....	51
3.10.5	Tampão de lise.....	51
3.10.6	Meio RPMI.....	51
3.10.7	Meio RPMI + 0,01% de BSA.....	52
3.10.8	Corante Panótico Rápido (LaborClin).....	52
3.10.9	Tampão de FACS	52
3.10.10	Tampão para anexina.....	52
3.10.11	Solução de lavagem para Western Blot (Tris Buffer Saline – TBS).....	52
3.11	Análise estatística	52
4	Resultados.....	55
4.1	Caracterização da população isolada por gradiente de Percoll	55
4.2	O tratamento de neutrófilos com Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) não altera a viabilidade celular	56
4.3	Avaliação da presença de contaminantes nas amostras de AGP comercial.....	58
4.3.1	As concentrações de endotoxina presentes na amostra não interferiram na resposta inibitória da AGP sobre a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	58
4.3.2	Avaliação da presença de proteínas com peso molecular distinto da AGP.	59
4.4	A AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo fator quimiotático fMLP.....	62
4.5	Ácido siálico inibe a resposta quimiotática de neutrófilos ao fMLP.....	63
4.6	AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos de maneira dependente de ácido siálico.	64
4.6.1	Produção da proteína desialilada	64
4.6.2	Confirmação da ausência de ácido siálico.....	66
4.6.3	Avaliação da quimiotaxia.....	68
4.7	A AGP interage com neutrófilos de maneira dependente da sua concentração.....	69
4.8	O tratamento de neutrófilos com AGP não interfere na ligação dos anticorpos fluorescentes anti-Siglec-5 ou 9.....	70

4.9	O tratamento com anticorpos neutralizantes anti-hSiglec-5 ou 9 não foi capaz de deslocar a ligação da AGP Alexa Fluor 488 dos neutrófilos.	72
5	Discussão.....	74
6	Conclusão	81
7	Referências Bibliográficas	83

1 Introdução

1.1 Neutrófilos

Neutrófilos são células efetoras essenciais para o sistema imune inato, formando a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores como bactérias e fungos (PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Os neutrófilos são uma das principais células responsáveis pela resposta inflamatória, pois temporalmente, são a primeira população de células a migrarem até o foco da inflamação. Quando estão no local, são capazes de conter e eliminar o patógeno, assim como remover debris celulares do local afetado (KAUFMANN, 2008; KUMAR; SHARMA, 2010; NATHAN, 2006). Defeitos em alguma das atividades desenvolvidas por essas células no processo de controle do agente microbiano, ou a diminuição da quantidade dessas células disponíveis são fatores deletérios para a integridade do organismo, resultando em infecções graves e recorrentes (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010; KOBAYASHI; DELEO, 2009; LEKSTROM-HIMES; GALLIN, 2000; RABSON; ANDERSON; GLOVER, 1978; SCHMIDT; MOSER; SPERANDIO, 2013).

Consideradas células de vida curta, a estimativa de sobrevivência dos neutrófilos humanos *in vivo* é de 8h - 12h (SHI, 2001). São continuamente produzidos na medula a qual serve também como um reservatório, do qual essas células podem ser rapidamente recrutadas/mobilizadas em grande número quando necessário (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Em condições fisiológicas, os neutrófilos são encontrados no sangue, na medula óssea, no fígado, no baço e em maior quantidade nos pulmões (SIBILLE; MARCHANDISE, 1993). Normalmente, os neutrófilos permanecem no centro dos vasos. No entanto, nas condições inflamatórias os vasos sanguíneos são dilatados tornando o fluxo circulatório mais lento e permitindo que os neutrófilos, antes presentes no centro do vaso, movam-se para a periferia, o que facilita sua interação com o endotélio vascular (HUTTENLOCHER; SANDBORG; HORWITZ, 1995; PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Diante de estímulos inflamatórios, neutrófilos maduros presentes na circulação sanguínea são ativados e sofrem modificações que

envolvem principalmente a modulação de duas principais classes de moléculas de adesão, as quais favorecem a sua interação com o endotélio vascular: as selectinas e as integrinas. Além disso, uma série de eventos sequenciais guiados por quimiocinas permitem que os neutrófilos sejam recrutados e se acumulem no foco da inflamação (BORREGAARD, 2010; LEY et al., 2007; MCDONALD; KUBES, 2011).

O processo de migração de neutrófilos envolve quatro etapas distintas, as etapas de captura, rolamento, adesão e transmigração. A migração inicia com o recrutamento dos neutrófilos através da ativação dos leucócitos residentes que passam a liberar mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos e citocinas, os quais são responsáveis por ativar a superfície do endotélio. O endotélio também pode ser ativado diretamente pelo patógeno, através do reconhecimento por receptores do tipo PRR (*Pattern recognition receptor*), ou ainda por produtos intracelulares resultantes do dano tecidual. Ativado, o endotélio aumenta rapidamente a expressão de moléculas de adesão previamente produzidas e armazenadas. Algumas selectinas como a E-selectina, no entanto requerem uma síntese de novo para que sejam expressas, demandando um tempo maior, de aproximadamente noventa minutos para que ocorra o pico máximo de expressão (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; SPRINGER, 1994).

Em seguida, iniciam-se as etapas de captura e rolamento. Durante a etapa de captura, os neutrófilos circulantes aderem ao endotélio por meio das selectinas, moléculas de adesão presentes em sua superfície e também nas superfícies das células endoteliais. Tanto o rolamento como a captura são mediados, basicamente, por ligantes glicosilados e três tipos de selectinas P e E, expressas no endotélio e L-selectina expressa, na sua maioria, em leucócitos. Essas lectinas reconhecem e interagem com a estrutura *Sialyl-Lewis X* de glicoproteínas como a PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), presente tanto na membrana dos neutrófilos como na membrana do endotélio. O acúmulo das células ocorre através da interação entre L-selectinas e PSGL1, permitindo assim a interação leucócito-leucócito, facilitando a adesão de leucócitos secundários ao endotélio (MCEVER; CUMMINGS, 1997). A interação entre leucócitos e endotélio tem como característica química ser uma ligação de baixa afinidade, o que permite que novas pontes de adesão sejam formadas ao mesmo tempo em que as já estabelecidas sejam quebradas. Essa característica de aderência transitória permite que a célula deslize sobre o endotélio, reduzindo a velocidade com que ela percorre o vaso em um processo denominado de rolamento

(LAWRENCE et al., 1997; RAMACHANDRAN et al., 2004; SUNDD et al., 2012).

As selectinas, essenciais nesse estágio inicial da migração, não são as únicas moléculas de adesão que participam desse processo. A etapa de rolamento facilita a interação do neutrófilo com quimiocinas depositadas na superfície do endotélio. Quando leucócitos entram em contato com essas quimiocinas produzidas localmente, passam a expressar moléculas de alta afinidade conhecidas como integrinas (LFA1 e MAC1). Ao mesmo tempo, citocinas secretadas no local da inflamação como TNF-alfa e IL-1beta ativam as células endoteliais que aumentam a expressão de ligantes para essas integrinas (ICAM1 e VCAM1) (BERLIN et al., 1995). A cascata de sinalização ativada por receptores de quimiocinas do tipo acoplados à proteína G, adjacentes a essas integrinas, induz uma mudança conformacional, ativando-as de maneira quase que instantânea em uma reação chamada de sinalização *inside-out* (ABRAM; LOWELL, 2009). Ativadas, as integrinas apresentam uma maior afinidade por seus ligantes e estabelecem uma firme adesão entre a célula e o endotélio, diminuindo a velocidade de rolamento do neutrófilo, até os leucócitos aderirem firmemente ao endotélio vascular. Aderidos, os neutrófilos estão prontos para iniciarem a etapa final do processo conhecido como transmigração. Nessa etapa, os leucócitos têm que atravessar três diferentes barreiras: as células endoteliais, a membrana basal das células endoteliais e os pericitos. Além das integrinas LFA-1 e MAC-1, VLA4 e VCAM1, uma nova molécula, chamada de PECAM1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), expressa tanto nos leucócitos quanto nas junções intracelulares das células endoteliais, passa a participar ativamente do processo de migração. Essas interações permitem que o neutrófilo mude de conformação e consiga passar por entre as células endoteliais. Em seguida, ele penetra na membrana basal com a ajuda de enzimas proteolíticas (JANEWAY, 2001; WILLIAMS et al., 2011). A transmigração dos leucócitos pode acontecer através de duas rotas. A rota paracelular, onde o neutrófilo passa por entre as junções intracelulares endoteliais; e a rota transcelular, onde o neutrófilo migra através das células endoteliais (FENG et al., 1998; PHILLIPSON et al., 2006).

Ultrapassada a barreira endotelial, os leucócitos deslocam-se pelo tecido extravascular guiados por um gradiente de moléculas quimioatrativas num processo chamado de quimiotaxia. A quimiotaxia é responsável por recrutar uma grande quantidade de neutrófilos ainda nos estágios iniciais da resposta inflamatória. Neutrófilos em migração

devem seguir sinais quimiotáticos variados, para que encontrem sua saída do meio intravascular e, através do interstício, até o sítio da inflamação (JANEWAY, 2001; WILLIAMS et al., 2011). Na quimiotaxia, cada neutrófilo individualmente reconhece um gradiente quimiotático, polariza e migra em direção a esse atrativo. Neutrófilos seguem esse gradiente quimiotático até o local da inflamação que pode ter sido causada por um patógeno ou ainda por uma inflamação estéril.

Para fazerem o movimento quimiotático, os leucócitos migratórios devem aderir ao substrato para adquirir a tração necessária e impulsionarem-se pelo tecido. Em neutrófilos, essa adesão ocorre predominantemente pela atuação de integrinas da família beta-2. Pacientes com deficiência genética nessa subunidade beta-2 da integrina (LAD-1) apresentam neutrófilos incapazes de migrar ou de fazerem quimiotaxia (CROWLEY et al., 1980). Os neutrófilos expressam duas integrinas do tipo beta-2, a LFA-1 e a MAC-1, que desenvolvem papéis divergentes. Estudos vêm demonstrando que a ação dessas integrinas pode ser opostora, onde integrinas LFA-1 aumentam o extravasamento dos neutrófilos, e a MAC-1 diminui, sugerindo que a MAC-1 possa estar atuando como um mecanismo regulatório durante esse processo (DING et al., 1999). Contrariamente, Gao e colaboradores descobriram que a MAC-1 é a principal integrina envolvida na quimiotaxia da barreira sinovial e dos fibroblastos dérmicos, sugerindo que o papel desenvolvido por cada uma dessas integrinas depende do ambiente em que está ocorrendo esse processo e dos quimioatrativos envolvidos (GAO; ISSEKUTZ, 1996).

Mudanças na conformação, como já mencionado anteriormente, assim como o agrupamento de integrinas em determinada posição da membrana permitem a interação da célula com o endotélio e ocorrem com a ativação de uma via de sinalização do tipo *inside-out pathway* (ABRAM; LOWELL, 2009). Apenas recentemente detalhes sobre a via de sinalização das integrinas foram conhecidos. Experimentos demonstraram que as Rap GTPases são as principais reguladoras dessa via, onde a ativação de Rap1 induz à redistribuição espacial intracelular de integrinas para estimular esse agrupamento que contribui para o aumento da avidéz dessas moléculas (MONTRESOR et al., 2013; SCHMIDT; MOSER; SPERANDIO, 2013; SHIMONAKA et al., 2003).

A maneira como esses neutrófilos são guiados, através do tecido vascular até o local inflamado, é normalmente governada por gradientes quimiotáticos. Agentes quimiotáticos são produzidos no foco da infecção e ligam-se a proteoglicanos na matriz extracelular formando um gradiente crescente de mediadores quimiotáticos até o local de

infecção (ELEANOR LAWRENCE; JOANA MOLDOVAN, 2011). Neutrófilos são recrutados por uma variedade de moléculas: quimiocinas, leucotrienos (LTB₄), componentes da cascata do complemento (C5a), por algumas moléculas liberadas diretamente pela bactéria como o peptídeo fMLP e ainda por produtos da inflamação estéril como os liberados pela mitocôndria.

O fator quimiotático fMLP (fMet -Leu - Phe) é derivado de fontes bacterianas Gram positivas ou negativas e também do rompimento da mitocôndria, indicador de dano celular bastante sensível. É o menor peptídeo quimiotático e contém apenas três aminoácidos (CARP, 1982; MARASCO et al., 1984). Seu reconhecimento é feito através do receptor formil peptídeo (FPR), do qual já foram identificados dois receptores distintos, o receptor formil peptídeo - tipo 1 (FPRL1) e o receptor formil peptídeo – tipo 2 (FPRL2) (YANG et al., 2008).

A família das quimiocinas tem um papel central na migração de leucócitos e os neutrófilos respondem a uma diversidade delas. Existem aproximadamente quarenta quimiocinas diferentes em suas propriedades químicas e alvos aos quais se ligam. São liberadas de maneira diferente em cada tecido e podem ser produzidas por uma variedade de células em resposta a bactérias, vírus e agentes causadores de lesão tecidual. No local da infecção são encontradas diversas dessas quimiocinas, induzindo sinais de certa forma redundantes, mas com o intuito de assegurar a chegada dessas células até o local correto da infecção de maneira rápida e precisa. No entanto, estudos recentes vêm demonstrando que a resposta do neutrófilo depende de padrões espaciais e temporais de expressão de quimiocinas, assim como do receptor nos neutrófilos correspondente e das diferenças nas propriedades bioquímicas desses quimioatrativos (FUNAMOTO et al., 2002).

No ambiente inflamatório, uma rede distinta de sinais quimiotáticos é formada com o objetivo de direcionar a célula imune correta até o lugar certo, corroborando para a especificidade da resposta imune celular. Nesse contexto, é essencial que a célula consiga distinguir a direção de qual quimiocina seguir e, conseqüentemente, de qual sinal quimiotático ela deve se afastar. O estudo de Kolaczowska e colaboradores em 2013 demonstrou que existe uma prevalência de um gradiente quimiotático sobre o outro, formando uma hierarquia entre as diferentes moléculas quimioatrativas que guiam os neutrófilos. Os atrativos foram divididos em atrativos intermediários e atrativos que levam a um alvo final. As moléculas que se originam nos primeiros estágios da resposta inflamatória, como o fMLP ou o componente da

cascata do complemento C5a, denominadas de mediadores finais, sobrepõem-se a estímulos quimiotáticos liberados em estágios intermediários, como as moléculas CXCL8 e LTB4 liberadas pelo endotélio, as quais são denominadas de mediadores intermediários (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A maioria dos quimioatrativos sinaliza através da ligação a receptores heterotriméricos acoplados à proteína G (GPCR), expressos na superfície do neutrófilo. A ligação do quimioatrativo ao seu receptor específico induz à dissociação das subunidades da proteína G em alfa e beta/gama. Essa dissociação permite que as subunidades beta/gama ativem uma cascata de sinalização que resulta na polarização celular assim como na ativação do seu citoesqueleto. Como a distribuição desses receptores na membrana celular não é polarizada, estudos sugerem que, após sua ativação, ocorre uma redistribuição intracelular da subunidade beta/gama (JIN et al., 2000; NISHIO et al., 2007). Dissociada, essa subunidade é capaz de concentrar-se na porção frontal da célula e ativar a PI3K, enzima responsável pela fosforilação de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), transformando-o em PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 –trifosfato). A formação e acúmulo de PIP3 leva à ativação da proteína kinase B (PKB, também conhecida como AKT) e subsequentemente à polimerização da actina, polarizando a célula e direcionando sua migração (FERGUSON et al., 2007; FUNAMOTO et al., 2002; LI et al., 2000; NISHIO et al., 2007). Diversos estudos vêm demonstrando que a redução das concentrações de PI3K acarreta diminuição na polarização da célula, mas não afeta a capacidade da célula de reconhecer o gradiente quimiotático e de responder a ele. Sendo assim, a quimiotaxia pode ocorrer independentemente da ativação da polimerização de actina induzida por PI3K, sugerindo que possam existir outras cascatas de sinalização envolvidas na quimiotaxia dessas células (ANDREW; INSALL, 2007; CHODNIEWICZ; ZHELEV, 2003; FUNAMOTO et al., 2002; HIRSCH et al., 2000).

Estudos recentes vêm demonstrando que a via de sinalização a ser ativada depende diretamente do tipo de fator quimiotático envolvido. A direção na qual os neutrófilos se movem depende de uma cascata de sinais intracelulares também dispostas de maneira hierárquica (ELKS et al., 2011; HEIT et al., 2002). A ativação da via p38 MAPK também demonstrou estar envolvida na resposta quimiotática pois neutrófilos deficientes para a isoforma catalítica (p110 γ) da enzima PI3K ainda conseguem, em número significativo, fazer quimiotaxia (CARA et al., 2001; HEIT et al., 2002; NICK et al., 1997; ZU et al., 1998). A ligação de quimiocinas do tipo mediadores de alvos finais (fMLP e C5a) ao seu

receptores seria a responsável pela ativação dessa cascata, e a via sinalizada através da PI3K/AKT, estaria sendo ativada por receptores ligados a quimioatrativos intermediários (BILLADEAU, 2008; HEIT et al., 2008).

Depois de chegar ao local desejado, os neutrófilos usam seus mecanismos de defesa para combater o patógeno. Finalmente, para limitar a extensão da inflamação, esses neutrófilos entram em apoptose e seus debris celulares são fagocitados por macrófagos. Para combater os patógenos invasores e manter a integridade do organismo, esses granulócitos utilizam diferentes estratégias de defesa. A mais conhecida é a fagocitose, onde o neutrófilo engolfa o patógeno e o encapsula no fagossomo, matando esse microrganismo através do mecanismo de liberação de espécies reativas de oxigênio (mecanismo dependente de NADPH), ou através do mecanismo de liberação de proteínas bactericidas, contidas em grânulos citoplasmáticos (SEGAL, 2005). Quando ativados, os neutrófilos ainda liberam tramas extracelulares denominadas de NETS (*neutrophil extracellular traps*). Altamente eficiente, essa trama é capaz de matar diretamente o patógeno, assim como imobilizá-lo, favorecendo a fagocitose e impedindo que ele se espalhe pelo organismo do hospedeiro. A fagocitose do patógeno e a liberação de espécies reativas de oxigênio, assim como a liberação de proteases contribuem como fatores essenciais do neutrófilo para o controle do agente infeccioso (BRINKMANN et al., 2004; NAUSEEF; BORREGAARD, 2014; PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Esses potentes mecanismos de defesa entretanto não são capazes de discriminar entre o agente causador da infecção e as células do hospedeiro, o que torna o dano causado no tecido do hospedeiro inevitável (NATHAN, 2002). Por mais que a inflamação seja importante para o reparo tecidual e erradicação do patógeno, uma inflamação não resolvida, que ocorre quando o organismo não consegue remover ou controlar esse patógeno, pode ser prejudicial para o organismo hospedeiro. Normalmente esse dano se resume ao local infectado, no entanto pode evoluir e eventualmente levar a complicações mais graves, como à falência de múltiplos órgãos, causando a morte do indivíduo (BENJAMIM et al., 2002; SIBILLE; MARCHANDISE, 1993; SOUTO et al., 2011).

O processo pelo qual neutrófilos são responsáveis pela lesão tecidual inicia-se nos leitos capilares, onde são sequestrados acumulando-se no endotélio vascular, causando oclusão desse lúmen e impedindo o aporte de sangue, resultando em hipóxia tecidual (BROWN et al., 2006). O encontro de neutrófilos primados com o endotélio

ativado leva ao aumento da meia-vida dessas células, contribuindo ainda mais para o dano extracelular. Além disso, a liberação de produtos inflamatórios exacerba a ativação da célula e intensifica o recrutamento de uma grande quantidade de neutrófilos para o local afetado, agravando ainda mais esses danos (BAGGE; AMUNDSON; LAURITZEN, 1980). Quando no tecido, os neutrófilos são capazes de induzir ao dano de forma direta, através da liberação de enzimas proteolíticas, citocinas pró inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e NETS. (ANDRADES et al., 2011; HEUTINCK et al., 2010; ISHII et al., 2010; KESHARI et al., 2012).

A infiltração e a ativação excessiva de neutrófilos contribuem para o processo de dano tecidual das doenças agudas tais como a lesão pulmonar aguda e as lesões medulares. Além disso, contribuem para o agravamento de doenças crônicas como artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Outro exemplo no qual os neutrófilos contribuem ativamente para o dano tecidual é na sepse. A sepse é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica induzida por infecção. Sua forma grave está associada com disfunção tecidual e falência de múltiplos órgãos que resulta em altos índices de mortalidade. Os neutrófilos contribuem para o início e a progressão da sepse grave. Assim, na sepse grave ou no choque séptico, a migração ineficiente de neutrófilos até o foco da infecção leva a uma falha na remoção do agente patogênico invasor, iniciando uma resposta inflamatória desregulada com a hiperativação de células do sistema imune. O dano ocorre através da ativação sistêmica excessiva e inapropriada dos neutrófilos, em resposta às condições inflamatórias geradas por um estímulo infeccioso. Essa ativação sistêmica permite a infiltração de neutrófilos em órgãos distantes de onde esteja ocorrendo a inflamação, levando à lesão tecidual, o que contribui para a falência de múltiplos órgãos, característica da sepse grave e do choque séptico (BROWN et al., 2006; WEISS, 1989). A principal infiltração ocorre primeiramente no tecido pulmonar, e conforme a doença progride, passa a atingir outros órgãos fundamentais para o funcionamento do organismo. O recrutamento de neutrófilos para órgãos secundários aumenta ainda mais a incidência do dano tecidual (ROBERTSON et al., 2008; ROGER; CALANDRA, 2009; SATO et al., 1993). A alteração do padrão de expressão de receptores de quimiocinas do tipo CC parece estar envolvida nesse processo. Observou-se um aumento da expressão de receptores CCR2 em pacientes que não sobreviveram à sepse, e animais *knockout*, para o receptor de quimiocina CCR2, demonstraram uma redução do acúmulo de neutrófilos em

órgãos como pulmão, rins, e coração (NESS et al., 2004; RIOS-SANTOS et al., 2007; SOUTO et al., 2011).

1.2 Lectinas do tipo I – Siglecs (Sialic acid-binding Ig superfamily lectins)

Lectinas são proteínas que reconhecem e ligam carboidratos, através de sítios terminais específicos de uma cadeia de carboidratos. Os ligantes naturais para a maioria das lectinas são, geralmente, complexos de glicoconjugados ligados a uma matriz, que pode ser lipídica ou proteica (VARKI et al., 2009).

Podem estar tanto solúveis quanto ligadas à membrana de diferentes tipos celulares. São classificadas de acordo com sua sequência de aminoácidos e com suas características bioquímicas (BERG JM, TYMOCZKO JL, 2002; VARKI et al., 2009). A classificação dessas lectinas ainda não foi unanimemente estabelecida, no entanto existem alguns subtipos já bem categorizados como é o caso das Lectinas do tipo I (*Ig-like lectins*) (VARKI et al., 2009). As lectinas do tipo I são membros da família das imunoglobulinas IgSF (*immunoglobulin superfamily*) a qual abrange proteínas que não sejam anticorpos nem receptores de células T, mas que sejam capazes de reconhecer carboidratos através de um domínio do tipo imunoglobulina (*Ig-like*) (VARKI; ANGATA, 2006). Dentre essas lectinas do tipo I, as Siglecs são as mais bem caracterizadas. São uma família de receptores transmembranares que interagem diretamente com ácido siálico em posições diversas e específicas, tornando-se assim a maior família de moléculas presentes em vertebrados e capaz de reconhecer carboidratos contendo ácido siálico (CROCKER, 2002; MAGESH et al., 2011; ORR et al., 2007; SCHAUER, 2009; VARKI, 1997)

Com base na semelhança entre suas sequências intracelulares e extracelulares e na conservação delas ao longo dos anos, essas lectinas foram divididas em dois grandes grupos. O primeiro, representado pelas Siglecs -1, -2, -4, e -15 (com moléculas correspondentes em camundongos) que tiveram suas estruturas conservadas durante a evolução. O segundo grupo é representado por Siglecs em constante evolução, identificadas como homólogas ao CD33, chamadas de *CD33r Siglecs* (ANGATA et al., 2004). Essa categoria abrange as Siglecs-3, 5-14, e -16 em primatas e a suas correspondentes em roedores, as Siglecs -E, F, G e H respectivamente. Essa evolução constante ocorre em função

da necessidade de adaptação frente a microrganismos capazes de incorporar o ácido siálico, mimetizando o reconhecimento por células do hospedeiro (CAO; CROCKER, 2011; CROCKER; ZHANG, 2002).

Siglecs são expressas em diferentes tipos celulares, mas a maioria das CD33r apresentam um padrão de expressão específico e dependente do tipo celular. Com exceção das Siglecs-4/MAG, que também são expressas por algumas células do sistema nervoso, todos os tipos de Siglecs são expressos em leucócitos (GUPTA, 2012). Algumas dessas lectinas têm seu padrão de expressão restrito a algumas células, como é o caso da Siglec-8 expressa apenas em eosinófilos circulantes e em basófilos, nesses últimos, com baixa intensidade (FLOYD et al., 2000). Outras no entanto, são amplamente expressas entre os leucócitos, como é o caso da Siglec-9 que é encontrada em neutrófilos, em monócitos e em algumas subpopulações de células NK e de células B. Outra característica da expressão desses receptores é que uma única célula é capaz de expressar mais de uma Siglec, como é o caso de monócitos que expressam CD33, Siglecs-5, -7, -9 e -10 (ANGATA; VARKI, 2000; LOCK et al., 2004; MUNDAY et al., 2001; VARKI et al., 2009). Os neutrófilos expressam três tipos dessas lectinas. Apenas as Siglecs – 5, 9 e 14 são encontradas em sua superfície (ANGATA; VARKI, 2000; ANGATA et al., 2006; CONNOLLY; JONES; WATT, 2002; CORNISH et al., 1998; ERICKSON-MILLER et al., 2003; ZHANG et al., 2000).

Muitas dessas Siglecs, como a 5, 7 e a 9, apresentam aumento ou diminuição de expressão de acordo com a exposição a drogas ou mediadores inflamatórios, sugerindo que pode estar ocorrendo uma regulação transcricional desse receptor durante a resposta inflamatória (LOCK et al., 2004). Após uma hora de tratamento com TNF-alfa ou fMLP, o aumento da expressão de Siglec-5, na superfície de neutrófilos, pode ser observada (ERICKSON-MILLER et al., 2003).

Pouco se sabe sobre as funções biológicas referentes às Siglecs do tipo CD33r, porém a especificidade de expressão dessas moléculas em leucócitos sanguíneos sugere que a ativação desses receptores inicie a ativação de células envolvidas na resposta imune. Com o aumento dos estudos referentes à atividade dessas moléculas, fica cada vez mais evidente que os receptores do tipo Siglecs utilizam vias de sinalização inibitórias para diminuir as funções celulares. Nesse contexto, estudos indicam que as Siglecs atuam principalmente como reguladores da homeostase do sistema imune (CROCKER; PAULSON; VARKI, 2007; CROCKER; VARKI, 2001b; PILLAI et al., 2012).

Características estruturais transmembranar e citoplasmática refletem o principal mecanismo pelo qual esses receptores desenvolvem sua atividade biológica. A estrutura dessas Siglecs consiste em um domínio extracelular N-terminal do tipo Ig que reconhece o ácido siálico, seguido de um *C2-set Ig-like domain*, e de um domínio citosólico responsável por modular a resposta celular (ANGATA; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, 2002; ANGATA; VARKI, 2000; CROCKER, 2002; VARKI; ANGATA, 2006).

A maioria das Siglecs apresenta um domínio citosólico inibitório devido à presença da molécula ITIM na porção terminal do receptor (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*). A ativação desse receptor altera a conformação do mesmo e permite que quinases da família Src tenham acesso a esse domínio. Essas quinases, fosforilam tirosinas presentes no domínio ITIM que passam a recrutar fosfatases (tirosine fosfatase) como SHP-1 e SHP-2. No entanto, estudos recentes demonstram que algumas Siglecs, das quais fazem parte as Siglec-14 15 e 16, não apresentam um domínio citoplasmático proeminente mas sim resíduos carregados positivamente em sua região transmembranar, capazes de interagir com a proteína adaptadora DAP12, a qual possui em sua estrutura um domínio ITAM (*tyrosine-based activation motifs*). Essa interação induz uma mudança conformacional que favorece a atuação de tirosinas fosfatases capazes de fosforilar o domínio ITAM, resultando no recrutamento de tirosina kinases da família das SYK. Essas, por sua vez, estão envolvidas tanto com a inibição quanto com a ativação celular (AVRIL et al., 2004; SHIN et al., 2010; VARKI; ANGATA, 2006; WILLIAMS; BARCLAY, 1988).

Domínios ITIM são normalmente encontrados em co-receptores que modulam a sinalização intracelular. Receptores que apresentem em sua estrutura esse domínio inibem as vias de sinalização da célula. Estudos demonstraram que a maioria das Siglecs funciona como co-receptor endocítico, capaz de controlar a resposta imune inata e adaptativa, modular as interações celulares, sinalizar informações intracelularmente, além de modular o crescimento e sobrevivência da célula, inibindo a proliferação ou induzindo apoptose (CROCKER; REDELINGHUY, 2008; WANG et al., 2010).

Diversos estudos têm sugerido que as Siglecs são responsáveis pela contenção da resposta imune excessiva, ativada por receptores do tipo Toll (TLR). Experimentos *in vitro* utilizando o *cross-linking* de anticorpos ou a super expressão dessas lectinas, ainda que não mimetizam o comportamento *in vivo*, vêm demonstrando que existe uma interação entre esses receptores. O mecanismo pelo qual isso estaria

ocorrendo ainda é desconhecido (BOYD et al., 2009; PAULSON; KAWASAKI, 2011).

Em resposta à ativação de TLR4 por LPS ou TLR2 por PGN, a expressão de Siglec-5 e Siglec-9 em linhagem celular de macrófagos (RAW264) mostrou ser capaz de inibir a produção de TNF-alfa e aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (ANDO et al., 2008). De forma contrária, uma linhagem celular de monócitos (THP-1) com super expressão de Siglec-14, que compartilha 99% de semelhança com a Siglec-5, diferindo dessa pela presença da molécula ITAM, apresentou um aumento na produção de TNF-alfa induzida por LPS. O estudo sugere que esse alelo da Siglec-5 atue em sinergia com os receptores do tipo Toll através da ativação de seu domínio ITAM (ALI et al., 2014; ANGATA et al., 2006)

Em neutrófilos, a Siglec-9 é capaz de induzir apoptose em condições fisiológicas normais ou inflamatórias e, dependendo das citocinas que estão presentes no meio, pode também induzir morte por uma via caspase não dependente (CARLIN et al., 2009b; GUNTEN et al., 2005). O aumento da taxa de mortalidade dessas células reduz o número de neutrófilos no local e sugere que as Siglecs possam ser importantes no controle do acúmulo celular que é um dos fatores responsáveis pelo dano causado ao tecido do hospedeiro. Estudos realizados em camundongos, utilizando um modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, demonstraram que animais deficientes para a Siglec-E (correspondente da Siglec-5 em humanos) apresentavam um aumento da atividade migratória dos neutrófilos em direção ao pulmão, efeito revertido com adição de anticorpos específicos contra integrinas beta-2 (CD11b) envolvidas na migração celular. Além disso, a via de sinalização ativada por integrinas beta 2 apresentava um perfil de fosforilação das proteínas kinases SYK e p38 mais elevado do que nos animais selvagens (MCMILLAN et al., 2013).

Em humanos, a ativação de neutrófilos por LPS (via TLR4) *in vitro* resultou na indução transcricional de Siglec-9. De forma semelhante com o que ocorre com a Siglec-F em ratos, o estudo apresentou um aumento do recrutamento de SHP-2 ao ITIM fosforilado. A ativação desse receptor resultou na inibição da via de sinalização de TLR mediada por TRIF, diminuindo a produção de interferon do tipo I (IIFNs) (ANDO et al., 2008; BOYD et al., 2009).

Estudos vêm demonstrando que uma variedade de patógenos sialilados tem feito uso desse mecanismo inibitório. Eles se ligam a Siglecs com o objetivo de modular as funções celulares, contribuindo

assim para um aumento na sua patogenicidade e sobrevivência no organismo do hospedeiro (CARLIN et al., 2007, 2009a; CHANG et al., 2014).

Cada Siglec apresenta uma especificidade única de ligação ao ácido siálico, comumente encontrados na superfície da célula, assim como no meio extracelular (BRINKMAN-VAN DER LINDEN; VARKI, 2000). A interação dessas proteínas com ligantes sialilados se dá por duas formas: i. a ligação ocorre entre Siglec e ligante presentes na mesma célula, denominada de ligação *cis*. ii. a ligação ocorre entre Siglec e ligantes presentes em células adjacentes, glicoproteínas, vírus, bactérias etc., essa, chamada de ligação *trans*. A capacidade de cada Siglec interagir com uma ligação do tipo *trans* é influenciada pelas interações *cis* que estão sendo formadas. A interação entre carboidrato e Siglec, presentes na mesma célula, pode mascarar o sítio de ligação dessa lectina, impedindo que outras ligações do tipo *trans* aconteçam (CROCKER; VARKI, 2001b). Estudos indicam que a maior parte das Siglecs existentes em células que estão em seu estado não ativado, apresenta-se mascarada pelas ligações *cis* (PAULSON; MACAULEY; KAWASAKI, 2012). A presença de sialidases, que são enzimas capazes de clivar o ácido siálico, a mudança no padrão de glicosilação dos carboidratos da proteína, ou ainda o reconhecimento de domínios sialilados são os responsáveis pela conversão das interações do tipo *cis* para interações do tipo *trans* (CROCKER; VARKI, 2001a; CROSS; WRIGHT, 1991; GUTHRIDGE; KAPLAN; COHEN, 1994; RAZI; VARKI, 1999).

Para Siglecs pertencentes ao grupo de estrutura altamente conservado existem evidências bem concretas de ligantes sialilados específicos, porém os ligantes para as *CD33r Siglecs*, dos quais as Siglec-5 e 9 fazem parte ainda não foram estabelecidos. Com exceção da siglec-6, os únicos ligantes para as *CD33r Siglecs* são glicanos sialilados presentes em glicoproteínas e glicolipídeos. No entanto, ainda não está bem claro quais seriam exatamente esses ligantes oligossacarídeos, nem as proteínas ou lipídeos aos quais eles estariam ancorados (LANOUE et al., 2002). Em 2007, Gunnarsson e colaboradores sugeriram um possível ligante endógeno para Siglec-5. Nesse estudo foi demonstrado sua possível interação com a proteína glicosilada de fase aguda Alfa-1-glicoproteína ácida, demonstrando assim o primeiro ligante endógeno para essa Siglec. No entanto, o estudo não é conclusivo e outras abordagens experimentais devem ser realizadas para comprovar as ligações da AGP com Siglec-5 (GUNNARSSON et al., 2007).

1.3 Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP)

Durante a resposta inflamatória, a liberação de citocinas como TNF-alfa, IL-1beta e, em especial a liberação de IL-6, incide em células hepáticas, alterando a concentração de algumas proteínas secretadas pelo fígado (GAULDIE et al., 1987). Algumas têm suas concentrações diminuídas, enquanto outras se apresentam em concentrações bastante elevadas. Proteínas envolvidas nesse processo são denominadas de proteínas de fase aguda e caracterizam uma resposta conhecida como resposta de fase aguda, um dos eventos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório (GABAY; KUSHNER, 1999; JANEWAY, 2001).

Diversas são as proteínas produzidas durante essa resposta aguda, e algumas delas são particularmente interessantes por restaurarem a homeostase do organismo através de atividades imunossupressoras. A Alfa-1-glicoproteína ácida é uma dessas proteínas, e sua interação com algumas células do sistema imune é capaz de regular atividades celulares envolvidas no processo inflamatório protegendo o organismo de uma reação inflamatória exacerbada e conseqüentemente reduzindo o dano tecidual (GABAY; KUSHNER, 1999; HOICHEPIED et al., 2003).

A Alfa-1-glicoproteína é uma das proteínas mais abundantes no plasma, representando 1% de todas as proteínas plasmáticas. Durante o processo inflamatório aumenta sua concentração no plasma, atingindo valores que vão de 0.8 g/L (2,4 mM) em indivíduos saudáveis até 3 g/L (7,3 mM) em condições inflamatórias (HIGAI et al., 2005; LARSSON; HANSSON, 2006).

Sintetizada principalmente por hepatócitos, embora também por neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos, a AGP tem como uma das principais funções descrever-se a compostos exógenos, como as drogas básicas e neutras e a compostos endógenos, como hormônios e fatores de ativação plaquetária. Já foi demonstrado que a expressão gênica da AGP em macrófagos alveolares aumenta durante o processo de inflamação crônica desse órgão, e os dados obtidos sugerem que a produção local dessa proteína imunomodulatória, no espaço alveolar, esteja envolvida no controle antiinflamatório (FOURNIER et al., 1999).

Também conhecida como orosomucóide, a Alfa-1-glicoproteína ácida foi isolada em 1950 por Karl Schmid e Richard J. Winzler. Altamente glicosilada, apresenta um peso molecular entre 41-43 KDa,

sendo 45% desse peso devido à presença de carboidratos, dos quais 12% são de ácido siálico (SMITH et al., 1950; TAMURA et al., 1981).

Sua estrutura consiste em uma cadeia única de 183 aminoácidos, e a glicosilação ocorre através da ligação com o nitrogênio do aminoácido asparagina (N-glycans), localizado nas posições 15, 28, 54, 75 e 85. Diferentes formas da AGP podem ser encontradas. Duas variações da proteína, que se diferenciam em 22 aminoácidos, são detectadas no soro: AGP-1 (AGP-A) e AGP-2 (AGP-B/B'). No entanto, é a porção de carboidratos que contribui para sua grande diversidade estrutural. No processo de glicosilação, estruturas bi-, tri- e quaternárias de cadeias de oligossacarídeos podem ser incorporadas à proteína, o que contribui para a formação de diferentes padrões de glicosilação capazes de gerar 10^5 glicofomas diferentes dessa proteína. Porém, algumas combinações não foram observadas na natureza, apenas 12-20 glicofomas diferentes foram identificadas no soro, e o padrão de glicosilação apresentado está diretamente relacionado com a condição patofisiológica do indivíduo. Aparentemente, indivíduos saudáveis apresentam diferentes perfis de glicosilação os quais variam na quantidade de fucosilações. Durante o processo inflamatório ocorre um aumento na quantidade de glicosilação dessa proteína, e as modificações mais comumente encontradas são o aumento das estruturas binárias e o aumento dos resíduos de fucose estruturadas nas posições alfa 1,3 resultando na conformação de epítopos de *Sialyl Lewis X* (DE GRAAF et al., 1993; HIGAI et al., 2003; LEVANDER et al., 2009; MACKIEWICZ; MACKIEWICZ, 1995). Os significados patofisiológicos dessas alterações permanecem desconhecidos.

Por mais que o papel fisiológico dessa proteína ainda não esteja completamente elucidado, a maioria dos estudos apontam para um papel imunomodulatório e anti-inflamatório natural. Como membro da família das lipocalinas e da subfamília das imunocalinas, as quais apresentam características imunomodulatórias conhecidas, a AGP já teve descritas algumas atividades capazes de influenciar a resposta do sistema imunológico. Estudos sugerem que essa proteína seja capaz de interagir com a superfície de linfócitos, modulando negativamente sua resposta proliferativa induzida por fitohemaglutinina (CHIU et al., 1977). Em plaquetas, pode inibir a agregação plaquetária induzida por ADP (adenosina difosfato) ou epinefrina e em células mononucleadas, induzir ou aumentar a secreção de citocinas pro e anti-inflamatórias, como IL-6, IL-1beta e TNF-alfa (BOUTTEN et al., 1992; COSTELLO; FIEDEL; GEWURZ, 1979; TILG et al., 1993). Nos neutrófilos, ela parece exercer influências em diversas atividades celulares. Estudos demonstraram que

in vitro ela é capaz de inibir a fagocitose de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (VAN OSS et al., 1974). Inibe a geração de superóxido induzida por *zymosan* e, em altas concentrações, ela inibe a agregação de neutrófilos (COSTELLO; GEWURZ; SIEGEL, 1984; DIRIENZO et al., 1987). Estudos ainda demonstram que ela é capaz de inibir *in vivo* a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e *in vitro* inibir a quimiotaxia induzida por *formil-methionil-leucil-fenilalanine* (fMLP) sem afetar a migração randômica (LAINÉ et al., 1990; MESTRINER et al., 2007; SPILLER et al., 2012; VASSON et al., 1994).

Mesmo com suas funções ainda não bem estabelecidas, já foi determinado que sua atividade imunomodulatória está diretamente relacionada com a porção de carboidratos da proteína e que essa desenvolve papel fundamental na interação célula proteína (PUKHALSKY et al., 1998; SHIYAN; BOVIN, 1997). Proteínas que passaram pelo processo de retirada de carboidratos, em especial a desialilação (retirada de ácido siálico), apresentaram uma menor capacidade de modular as células do sistema imune (BENNETT; SCHMID, 1980; GUNNARSSON et al., 2010; LIU et al., 2014).

Sabendo que dentre os carboidratos presentes na AGP o que aparece em maior abundância é o ácido siálico, estudos sugerem que a interação entre essa proteína e os neutrófilos esteja ocorrendo através de uma lectina de membrana capaz de reconhecer esse carboidrato. Gunnarsson e colaboradores em 2007, através de estudos de mobilização de cálcio intracelular, observaram que a ligação entre o ácido siálico presente na AGP e o receptor do tipo lectina Siglec-5 presentes na membrana de neutrófilos pode ser responsável por modular respostas funcionais dessa célula (GUNNARSSON et al., 2007).

Juntando estas evidências a hipótese do nosso trabalho é que a Alfa-1-glicoproteína ácida inibe a quimiotaxia dos neutrófilos pela ligação de seus resíduos de ácido siálico a receptores do tipo Siglec-5 e/ou 9.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo estudar o envolvimento da ativação de lectinas do tipo Siglec-5 e ou Siglec-9 na inibição da quimiotaxia de neutrófilos pela Alfa-1-glicoproteína ácida.

2.2 Objetivos Específicos

I. Avaliar a influência do carboidrato ácido siálico da AGP na quimiotaxia dos neutrófilos.

II. Avaliar a possível existência de interação entre a proteína AGP e Siglecs, presentes em neutrófilos.

3 Materiais e métodos

3.1 Avaliação da presença de contaminantes na AGP

3.1.1 Análise da contaminação por outras proteínas.

Com o intuito de determinar a pureza da AGP comercial (Sigma-Aldrich) em relação à contaminação com outras proteínas foi feito um gel de SDS-PAGE. Para isso, amostras contendo 0,1; 1; 2; 10 e 20 µg de proteína foram incorporadas ao tampão de corrida 1X e incubadas em banho seco por 5 minutos a 95°C para desnaturação da mesma. Desnaturadas, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE (4% de concentração e 10% de separação) utilizando tampão de corrida tris-glicina nas condições 100V/80 mA. Após a eletroforese, o gel foi revelado utilizando-se a coloração por nitrato de prata. Para tanto, o gel foi fixado durante 15 minutos em temperatura ambiente, com uma solução de ácido acético 5% e etanol 50%. Em seguida, a solução fixadora foi descartada e o gel lavado sob agitação durante 10 minutos com 200 ml da solução de lavagem (etanol 50%). A seguir, foram adicionados 100 ml de água Milli-Q[®] e o gel mantido por 10 minutos sob agitação. Após esse período foram adicionados 200ml da solução de sensibilização, composta por 0,02% de tiosulfato de sódio sob agitação durante 2 minutos. Posteriormente, o gel foi lavado duas vezes com água Milli-Q[®] por 2 minutos. Para a coloração foram adicionados 200 ml de solução de prata (0,1% de nitrato de prata) e o gel foi incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente. Finalizado esse período, foi feita uma breve lavagem com água Milli-Q[®] seguida da adição da solução reveladora (2% de carbonato de sódio). Após a solução já estar em contato com o gel, foram adicionados 80 µl de formaldeído. O gel permaneceu em contato com a solução reveladora até o aparecimento da cor. Para interromper a reação, foram adicionados 200 ml de solução de parada (5% de ácido acético) e o gel mantido nessa solução até a documentação.

3.2 Western blot

Para a realização do Western Blot, 0,1 µg, 1 µg e 10 µg de AGP foram ressuspensas em tampão de corrida 1X, desnaturadas por 5 minutos a 95°C, aplicadas em gel SDS-PAGE e submetidas à eletroforese conforme descrito anteriormente. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, New York, 2014) por 2 horas, utilizando-se o módulo de transferência molhado XCell II™ Blot Module 25V/100 mA (Life Technologies Corporation, USA), seguindo as especificações do fabricante. Completada a transferência, a membrana foi lavada por 5 minutos sob agitação em tampão de lavagem Tris Buffer Saline (TBS + 0,1% de Tween-20) e em seguida bloqueada por 6 horas a 4°C sob agitação, em solução de bloqueio, composta por 5 % de leite em pó desnatado em tampão de lavagem. Posteriormente, o anticorpo primário anti-hAGP foi adicionado (1:1000 em solução de bloqueio) a essa membrana e incubado *overnight* a 4°C sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG murino, ligado a HRP (1:2000 em tampão de bloqueio) por mais 1h em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada e a revelação realizada utilizando-se o kit ECL (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, a imagem foi obtida através do aparelho foto documentador ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, USA).

3.3 Quantificação de endotoxina

Para excluir a interferência do contaminante LPS no ensaio, foi necessário determinar a quantidade de endotoxina presente na AGP comercial. Assim, a quantidade de endotoxina presente na amostra foi dosada pelo método de LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) com o Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, aos tubos contendo 50 µl de padrão, amostra (AGP – 500 µg/ml), branco (água livre de endotoxina) ou controle positivo (AGP + LPS – 1 EU/ml) foram adicionados 50 µl de LAL e os tubos incubados a 37°C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 100 µl do substrato e os tubos foram incubados por

mais 6 minutos a 37°C. Para o término da reação, foram adicionados 50 µl de ácido acético 25% e a absorbância medida em leitora de placa de ELISA (ELX-800 Biotek, USA), no comprimento de onda de 405 nm. Das absorbâncias obtidas o branco foi subtraído e o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi maior que 0.98.

3.4 Obtenção de neutrófilos humanos

3.4.1 Amostras de sangue humano e considerações éticas

Para o estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico humano, obtidas de doadores voluntários saudáveis, na faixa etária de 20 a 40 anos. O protocolo para utilização desse tipo de amostra foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob o número: 283/08.

3.4.2 Obtenção de neutrófilos a partir de sangue periférico humano

O isolamento de neutrófilos foi realizado por meio do gradiente de densidade de Percoll[®] com densidade 1,130 g/mL (Percoll[®], GE Healthcare, UK), conforme protocolos de estudos anteriores e adaptados para o laboratório. Para isso, quatro gradientes contendo diferentes concentrações de Percoll[®] juntamente com a solução de Hanks, sem cálcio e sem magnésio (Solução Balanceada Hanks – HBSS, Gibco, USA) foram preparados conforme a listagem abaixo:

- A. Percoll[®] 72% - 7,2 ml de Percoll[®] + 2,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,8 ml de solução de Hanks 10x
- B. Percoll[®] 63% - 6,3 ml de Percoll[®] + 3,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,7 ml de solução de Hanks 10x
- C. Percoll[®] 54% - 5,4 ml de Percoll[®] + 4,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,6 ml de solução de Hanks 10x
- D. Percoll[®] 45% - 4,5 ml de Percoll[®] + 5,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,7 ml de solução de Hanks 10x

Em seguida, aproximadamente 10 ml de sangue venoso humano foi coletado em tubo de Heparina de Lítio (BD Vacutainer[®], Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Brasil). Em uma capela de fluxo laminar e com o auxílio de uma pipeta sorológica, 2 ml de cada

gradiente foram adicionados a um tubo de centrifugação de 15 ml de fundo cônico tipo Falcon, mantido em inclinação de aproximadamente 45°, conforme a ordem: Percoll 72%, Percoll 63%, Percoll 54% e Percoll 45%.

Depois de posicionadas as camadas, 2 a 2,5 ml do sangue coletado foram adicionados sobre esse gradiente e em seguida submetidos ao processo de separação por centrifugação. Para isso, os tubos foram centrifugados (Centrífuga Eppendorf 300™) por 30 minutos a uma rotação de 650g com 2 m/s^2 de aceleração e desaceleração, à temperatura de 22°C.

Após a centrifugação, ocorreu a formação de dois halos. O primeiro, localizado na parte superior do tubo concentram-se as células mononucleadas; e o segundo, na parte inferior do tubo, concentram-se os granulócitos.

Com auxílio de uma pipeta, o halo superior, assim como as camadas de Percoll® e o soro foram descartados. Em seguida, com uma pipeta *Pasteur*, o halo inferior foi coletado e transferido para um novo tubo de centrifugação de 15 ml.

Para remoção de possíveis hemácias contidas entre os polimorfonucleares, foi adicionado tampão de lise NH_4Cl , completando o volume para 12 ml. A solução foi então homogeneizada por inversão, por 5 minutos e colocada em repouso por mais 5 minutos. Finalizado esse período, as células foram centrifugadas por 8 minutos a uma velocidade de rotação de 450g, aceleração e desaceleração de 7m/s^2 a 22°C. O sobrenadante dessa centrifugação foi descartado e as células lavadas com solução de Hanks 1x. O *pellet* de células formado foi ressuspenso em 2 mL de meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Gibco, USA) contendo 0,01% de albumina bovina.

Para obtenção do número de células e determinação da viabilidade celular, essas células foram contadas na Câmara de Neubauer e a sua viabilidade determinada com auxílio do corante de exclusão azul de Tripan 1%. Apenas as células viáveis foram consideradas e sua concentração ajustada para 1×10^6 células/ml. Para os ensaios, apenas as amostras com pureza acima de 90% foram utilizadas.

3.4.3 Análise fenotípica da população celular obtida na separação por gradiente de Percoll®

Para determinar o fenótipo das células isoladas através do gradiente de Percoll®, as células obtidas na separação foram analisadas por citometria de fluxo, conforme descrito na seção 3.8. Nesse ensaio,

1×10^6 células foram marcadas com os seguintes anticorpos humanos: anti-CD11b (1:50, clone D12 BD Biosciences) e anti-CD66b (1:200, clone G10F5 BD Biosciences). Um total de 50.000 eventos/amostra foram adquiridos no equipamento FACSverse (BD FACSVerserTM, BD Biosciences, USA).

3.4.4 Avaliação por citometria de fluxo de morte celular em células incubadas com Alfa-1-glicoproteína ácida

Para avaliar a viabilidade dos neutrófilos incubados com a proteína foram utilizados dois marcadores de morte celular: anexina e iodeto de propídio (PI). A marcação com anexina permite avaliar as células apoptóticas, através da ligação à fosfatidilserina, que é um componente fosfolipídico presente na parte interna da bicamada lipídica da membrana celular. Essa passa a ser exposta ao meio extracelular no início do processo de morte celular por apoptose, quando a membrana ainda está íntegra. Já o PI é um marcador para células necróticas, pois sua molécula é capaz de intercalar-se ao DNA celular, desde que a membrana da célula esteja permeável, visto o alto peso molecular do PI. Sendo assim, esse marcador permite avaliar os casos de morte celular por necrose, assim como células em estágio final de apoptose, no qual a célula também apresenta alteração na permeabilidade da membrana. Sendo assim, para uma a marcação positiva para Iodeto de propídio, a célula já deve estar em estágio final de apoptose, ou ter sofrido morte por necrose.

Para este ensaio, as células isoladas por gradiente de Percoll, na concentração de 1×10^6 células/ml foram incubadas em placa de 96 poços por 1h, na presença de 0,1 mg/ml, 0,250 mg/ml ou 1mg/ml de AGP ou ainda com *N-acetylneuraminic acid*, (Neu5Ac), nas molaridades correspondentes à concentração utilizada para AGP (3 μ M, 6 μ M ou 10 μ M), a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ em diferentes *time points*. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X e marcadas com anexina 1:100 (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmigen, USA) e PI 1:100 (Iodeto de propídio, R&D Systems, USA) em tampão de anexina. Em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos para anexina e 1 minuto para PI, em temperatura ambiente para análise por citometria de fluxo.

3.5 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos

Para a avaliação da quimiotaxia dos neutrófilos foi realizado o ensaio em Câmara de Boyden de 48 poços da Neuro Probe AP48 (Neuro Probe AP48 Chamber™, USA), conforme protocolo descrito nas especificações do fabricante.

Esse ensaio de quimiotaxia consiste em uma câmara de dois compartimentos, separados por uma membrana microporosa de policarbonato com poros de 5µm de diâmetro. A câmara apresenta duas partes de acrílico, superior e inferior, onde são adicionadas as células e o fator quimiotático, respectivamente.

Na parte inferior, foram adicionados 26,8 µl do quimioatrativo fMLP (*Formyl Methionyl Leucyl Phenylalanine*) na concentração de 10^{-7} M; e para a migração ao acaso (controle negativo, sem fator quimiotático) foi usado meio RPMI com 0,01% de albumina bovina. Após a adição do fator quimiotático, a membrana de policarbonato foi colocada sobre esse compartimento, de forma a cobrir todos os poços da câmara. Em cima da membrana foi então colocada uma peça de polietileno e a parte superior da câmara foi encaixada. Para fixar e finalizar a montagem, os parafusos foram atarraxados e apertados firmemente. Na parte superior foram adicionados, de maneira a evitar a formação de bolhas, 50 µl da suspensão de células previamente ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células/ml em RPMI contendo 0,01% de albumina bovina. Pronta, essa câmara foi então levada para uma estufa e incubada por 2 h a 37°C com 5% de CO₂.

Após o período de incubação, a câmara foi desmontada e a membrana retirada. Para remoção dos neutrófilos que não migraram e permaneceram aderidos ao lado oposto dos que migraram na membrana, essa passou pelo processo de limpeza, no qual a face que não continha as células que migraram foi raspada em uma lâmina de borracha e posteriormente lavada em solução salina. Esse processo foi repetido por 3 vezes. Feito isso, as células aderidas à membrana foram fixadas e coradas. Para isso, a coloração utilizada foi o Kit de Coloração Panótico (Laborclin Ltda, BR), onde a membrana permaneceu com a face que contém os neutrófilos voltada para baixo, em contato com a solução fixadora 1, durante 1 minuto e 30 segundos, 3 minutos na solução corante 2 e por fim mais 3 minutos na solução corante número 3. Para retirada do excesso de corante, a membrana foi então colocada em solução salina por alguns segundos e em seguida disposta sobre uma lâmina de vidro para secagem e posterior contagem dessas células.

Para quantificação do número de células que migraram foi usado um microscópio óptico no aumento de 20x e os 5 campos que continham mais células foram contados. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em número de neutrófilos por campo. Os resultados apresentados são os que melhor representaram uma bateria de três experimentos distintos.

3.6 Retirada do ácido siálico presente na Alfa-1-glicoproteína ácida

3.6.1 Desialilação da AGP por neuraminidase

Para retirada do ácido siálico presente na AGP, e consequente avaliação do seu envolvimento na inibição da quimiotaxia dos neutrófilos, foi utilizado o protocolo de neuraminidase segundo *Gunnarsson et al. 2007*. A neuraminidase utilizada foi originária de *Clostridium perfringens* e é uma enzima capaz de clivar ácido siálico nas posições α -2,3- α -2,6- ou α -2,8 ligados a uma galactose.

Para este ensaio, 5 mg da AGP comercial foi solubilizada em tampão de ácido acético 0,1 M e pH 5,0. Após, a proteína foi incubada com a enzima neuraminidase *Clostridium perfringens* na proporção de 100 mU da enzima para cada 1 mg da proteína por 16 h a 37°C.

A purificação dessa proteína, separando-a da enzima e do ácido siálico solúvel, foi realizada através de gel filtração, utilizando-se o equipamento Äkta Avant 25 (Äkta Avant 25, GE Healthcare Life Sciences, USA). A gel filtração separa as moléculas de acordo com seu tamanho, conforme elas passam pela matriz da coluna Superdex 200 10/300 GL (Superdex GL™, GE Healthcare Life Sciences, USA). Para isso, foram injetados no sistema 500 μ L da amostra e para a eluição da proteína usou-se o tampão PBS. O método de purificação utilizado seguiu as seguintes especificações:

Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 0,2 CV
Injeção da amostra	Loop capilar de 500 μ L
Eluição	Isocrática Porcentagem de B – 0% 3 CV
Lavagem da coluna	Porcentagem de B – 0% 2,5 CV

Ao final da corrida, foi feita a identificação do pico correspondente à AGP e as frações correspondentes coletadas. Como controle, 5 mg da proteína comercial que não passou pelo processo de desialilação foram submetidos às mesmas condições da proteína desialilada.

3.6.2 Avaliação da presença de carboidratos na AGP desialilada

As frações confirmadas como positivas para AGP foram ainda avaliadas quanto à presença de carboidratos. A identificação dos carboidratos presentes na AGP das frações 1A5, 1A6 e 1A7 foi realizada por ensaios de Western Blot, utilizando as lectinas biotinizadas de *Sambucus nigra* (1:1000), que reconhecem preferencialmente ácido siálico na posição α -2,6, e a lectina *Aleuria aurantia* (1:1000), que reconhece a sequência Fuc(α 1,6)GlcNAc. Para isso foram feitos 2 géis de SDS-PAGE e a transferência para a membrana de nitrocelulose como descritos na seção 3.2. A membrana foi então bloqueada em solução contendo 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 10% de Tween 20 com pH 7,5, por 2h em temperatura ambiente. Após, cada membrana foi incubada com a sua respectiva lectina e diluída em solução de bloqueio por 1hora. Após esse período de incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes e incubada com o anticorpo secundário anti-biotina – HRP (1:2000 em tampão de bloqueio), por 1h em temperatura ambiente. A revelação foi realizada conforme item 3.2.

3.6.3 Dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinonínico (BCA)

A dosagem de proteína total foi feita através do método colorimétrico do ácido bicinonínico utilizando-se o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology™, USA), segundo as instruções do fabricante. De acordo com o mesmo, esse ensaio apresenta sensibilidade de detecção de 5 a 250 μ g/ml de proteína total. Para isso, em uma placa de 96 poços foram pipetados 20 μ L da amostra em teste ou do padrão (solução de albumina sérica bovina - BSA) nos respectivos poços. Em seguida foram adicionados 180 μ L de uma mistura composta por 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B, homogeneizado e incubado por 30 minutos a 37°C. Após esse período, a temperatura foi estabilizada mantendo-se a placa em temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi feita em leitora de placa no filtro de 550 nm. O

resultado referente às concentrações das amostras foi calculado com base na densidade óptica obtida com a curva padrão de BSA.

3.7 Marcação da AGP com *Alexa Fluor 488*

A marcação da AGP com a molécula fluorescente Alexa Fluor 488 foi feita através do uso do *kit* Molecular Probes Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit (Invitrogen, USA). O protocolo experimental foi realizado seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, foi feita uma solução contendo 1 µg da proteína diluída em 500 µl de PBS, à qual foi adicionado 50 µl de bicarbonato de sódio 1M, previamente preparado. Após homogeneizada, essa solução foi transferida para um *vial* contendo uma barra magnética e o corante reativo. Esse *vial* foi homogeneizado por inversão e colocado sobre um agitador magnético protegido da luz, onde permaneceu por 1h a temperatura ambiente. Completada essa 1h, o *vial* foi incubado *overnight* a uma temperatura de 4°C sob agitação. No dia seguinte, a solução foi purificada através da eluição em uma coluna de resina disponível no *kit*. A eluição foi realizada com a ajuda do tampão de eluição, para a visualização das bandas formadas, foi utilizado uma lâmpada UV portátil. Durante o processo, ocorreu a formação de duas bandas, uma referente a proteína marcada e a outra referente ao resíduo do corante. A primeira banda a eluir corresponde à proteína foi devidamente coletada em tubo contendo 2 mM de azida de sódio. A determinação da concentração da proteína marcada foi feita através do método de Bradford.

3.8 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

As dosagens de proteínas feitas no método descrito em 3.6 foram realizadas utilizando o reagente QuickStart™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Brasil). O ensaio escolhido foi o microensaio realizado em placa de 96 poços, de acordo com as especificações do fabricante. Para isso, foi feita uma curva padrão utilizando albumina na concentração de 2 mg/ml. Em seguida, 150 µl de cada ponto da curva, e de cada amostra foram adicionados a poços independentes da placa, seguido de 150 µl do reagente diluído (1x). A solução foi homogeneizada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. A leitura da coloração obtida foi feita

em uma multileitora de placa (Multileitora Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 595 nm.

3.9 Citometria de Fluxo

Para os resultados obtidos através de citometria de fluxo de maneira geral, as células quando não isoladas foram lisadas com tampão apropriado na proporção de 1mL de sangue para 5ml de tampão de lise. Para a troca de meio, as células foram submetidas à centrifugação com rotação de 450 g, 4°C por 5 minutos. O *pellet* formado foi então lavado através da adição de 1mL de PBS 1X e centrifugado como citado anteriormente. Após esse processo, as células foram bloqueadas com 50 µl de tampão de bloqueio, composto por tampão de FACS e soro do tipo AB humano ou, quando necessário, composto pelo Human BD Fc Block™ (CD 16/CD 32, clone 2.4G2 BD Biosciences, USA) por 20 minutos a 4°C. Ao término desse período, as células foram então incubadas com o anticorpo específico para o ensaio por 40 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Para retirada do excesso de anticorpo, as células foram lavadas com 1 ml de tampão de FACS. Em seguida, essas células foram ressuspensas em 200 µl desse mesmo tampão e analisadas em equipamento BD FACSVerse™ com três lasers (BD FACSVerse™, BD Biosciences, USA). Quando a análise não pôde ser feita em sequência, as células foram fixadas em 200 µl de paraformaldeído tamponado 3% e analisadas no dia seguinte. A análise dos resultados foi feita por meio do software Flowjo 7.5.5® (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

3.10 Soluções

3.10.1 Tampão fosfato em salina (PBS) 10 X

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck, Darmstadt, GER)	80 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck, Darmstadt, GER).....	2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , Merck, Darmstadt GER)....	11,5 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , Merck, Darmstadt, GER).....	20 g
Água Mili-Q q.s.p.....	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em frascos estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

3.10.2 Tampão fosfato em salina (PBS) 1 X

PBS 10 X 100 mL
 Água deionizada q.s.p..... 1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em frascos estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

3.10.3 Tampão de ácido acético

Ácido acético 1M..... 31,16 ml
 Acetato de sódio 1M..... 68,84 ml
 Água Mili-Q q.s.p..... 1 L

O pH foi ajustado para 5.0 com NaOH ou HCl

3.10.4 Solução de Hank's (HBSS)

Cloreto de potássio..... 2,0 g
 Fosfato de potássio monobásico..... 0,3 g
 Cloreto de sódio..... 40,0 g
 Fosfato de sódio monobásico..... 0,45 g
 D-Glicose..... 5,0 g

3.10.5 Tampão de lise

Cloreto de amônio (NH₄Cl, Merck, Rio de Janeiro, BR)..... 8,04 g
 EDTA (Merck, Rio de Janeiro, BR)..... 0,36 g
 Bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Vetec, Rio de Janeiro, BR)..... 0,64 g
 Água Mili-Q q.s.p..... 1 L

3.10.6 Meio RPMI

Meio RPMI-1640 (Gibco, USA)..... 10,4 g
 HEPES (Merck, Darmstadt, GER)..... 2,38 g
 NaHCO₃ (Vetec, Rio de Janeiro, BR)..... 2,20 g
 Água Mili-Q q.s.p..... 1 L

3.10.7 Meio RPMI + 0,01% de BSA

Meio RPMI-1640 (Gibco,USA).....	100 mL
BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,EUA).....	0,01 g

3.10.8 Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico n° 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.

Panótico n° 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%.

Panótico n° 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

3.10.9 Tampão de FACS

PBS 1X.....	990 ml
BSA.....	10 ml

3.10.10 Tampão para anexina

Hepes (pH7.4).....	0.1 M
NaCl.....	1.4 M
CaCl ₂	25 mM
Água Mili-Q q.s.p.	50 ml

3.10.11 Solução de lavagem para Western Blot (Tris Buffer Saline – TBS)

Tris-base.....	20 mM
NaCl.....	500 mM
Água Mili-Q q.s.p.....	1 L

Após, o pH da solução foi ajustado para 7,6 com NaOH ou HCl.

3.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados, assim como a representação gráfica dos mesmos, foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism™ software 6.0 (La Jolla, CA). Como os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variância, a análise utilizada foi ANOVA de uma via seguida do pós-teste Bonferroni's Multiple Comparison Test. Os resultados foram expressos como média ± erro

padrão e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Caracterização da população isolada por gradiente de Percoll

Os ensaios realizados neste estudo utilizaram neutrófilos isolados do sangue periférico humano através de um gradiente de Percoll[®]. Para assegurar que as amostras utilizadas não estejam contaminadas com outro tipo de células, que não neutrófilos, é necessário que seja feito um controle do fenótipo dessa população. Assim, com o objetivo de avaliar o perfil fenotípico da população de células utilizada nos ensaios, foi feita a caracterização dessas células por citometria de fluxo. Para isso, após passarem pelo processo de separação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD11b (MAC1) e anti-CD66b (CEACAM8), ambos marcadores de superfície presentes em neutrófilos. As células foram analisadas e verificou-se que aproximadamente 96% do total apresentaram fluorescência positiva para ambos os marcadores, como mostra a figura 1. Cruzando as variáveis: tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC), no gráfico representado nessa figura, pode-se observar essas características da população duplo positiva, complementando as evidências de que a maior parte da população celular utilizada nos ensaios é constituída por células com fenótipo de neutrófilos.

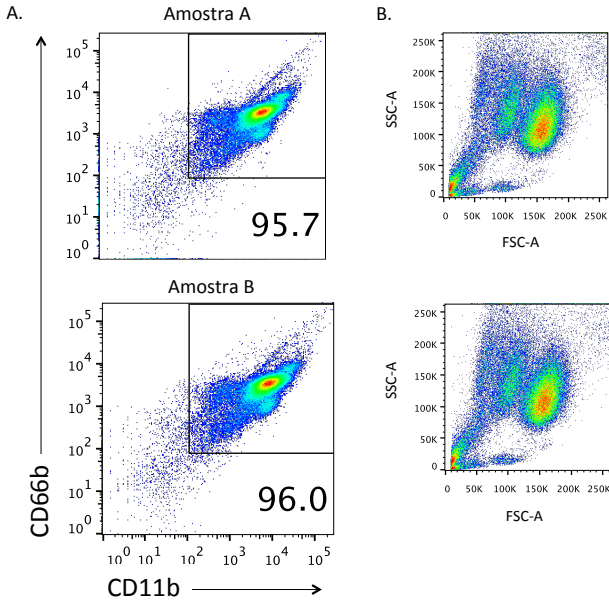


Figura 1. Fenótipo das células isoladas com gradiente de Percoll. (A) Células isoladas do sangue periférico humano por gradiente de densidade (Percoll[®]) foram marcadas com os anticorpos anti-CD11b-FITC e anti-CD66-PE e analisadas em citômetro de fluxo. Os gráficos de pontos representam a porcentagem do número de eventos, em um total de 50.000 eventos adquiridos de duas amostras independentes (amostra A e amostra B). **(B)** Características de tamanho (FSC-A) e granulocidade (SSC-A) da população duplo positiva representada na figura A.

4.2 O tratamento de neutrófilos com Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) não altera a viabilidade celular

A fim de avaliar se a AGP estaria induzindo morte celular e consequentemente influenciando no número de células viáveis capazes de migrar, os neutrófilos foram incubados com AGP ou com o ácido siálico em sua forma livre *N-acetylneuraminic acid*, (Neu5AC), e a viabilidade celular analisada por citometria de fluxo através da marcação com Iodeto de Propideo (PI) e Anexina V. A marcação com anexina

permite avaliar as células apoptóticas, e marcação com PI os casos de morte celular por necrose e células em estágio final de apoptose.

Neutrófilos isolados do sangue periférico humano foram incubados com 3 μ M, 6 μ M ou 10 μ M de AGP ou Neu5Ac em meio RPMI (0,01% de albumina) a 37°C por um período de 3 a 12h. Como demonstra a figura 2, a incubação com AGP ou Neu5Ac não modificou a porcentagem de células positivas para PI e/ou anexina, quando comparado ao controle sem tratamento. Sendo assim, verificou-se que a AGP não modifica a viabilidade celular dos neutrófilos. Dessa forma, as diferenças observadas nos ensaios de quimiotaxia não podem ser atribuídas a uma diminuição no número de células viáveis.

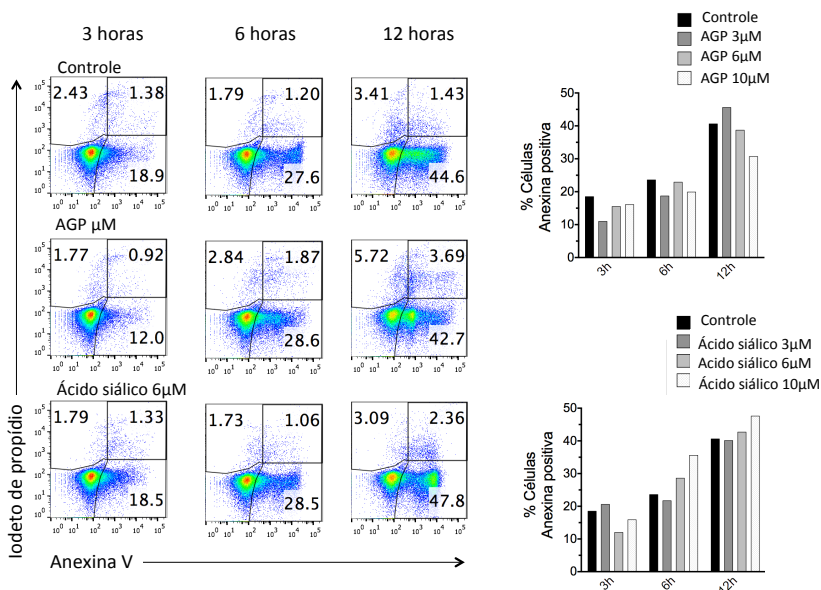


Figura 2. Avaliação da viabilidade celular em decorrência do tratamento com AGP ou Neu5Ac. Avaliação cinética de morte celular de neutrófilos (1×10^6) incubados a 37°C com diferentes concentrações da proteína AGP ou de ácido siálico (Neu5Ac). **(A)** Dot-plots representam a porcentagem do número de eventos positivos para os marcadores iodeto de propídio (PI) e Anexina V de células tratadas com 6 μ M (250 μ g/ml) de AGP, ou 6 μ M de ácido siálico (Neu5Ac). **(B)** Porcentagem de células positivas para o marcador Anexina V, tratadas

com AGP ou ácido siálico (Neu5Ac), nas concentrações de 3 μ M, 6 μ M ou 10 μ M, nos diferentes tempos de 3h, 6h ou 12h. Para a análise foram adquiridos um total de 50.000 eventos.

4.3 Avaliação da presença de contaminantes nas amostras de AGP comercial.

Para averiguar se haviam contaminantes na AGP comercial (Sigma-Aldrich) capazes de influenciar os resultados obtidos, foi realizada a dosagem de endotoxina para determinar a presença de LPS e utilizado um gel de SDS –PAGE para avaliar a presença de para avaliar a presença de outros contaminantes protéicos.

4.3.1 As concentrações de endotoxina presentes na amostra não interferiram na resposta inibitória da AGP sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Segundo a literatura, altas concentrações de LPS (10 μ g/ml), um tipo de endotoxina, são capazes de inibir a resposta quimiotática de neutrófilos (ARRAES et al., 2006). Para determinar a concentração desse contaminante nas amostras de AGP utilizadas nos ensaios, foi dosada a quantidade de endotoxina. O método utilizado foi a dosagem por LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), utilizando o *Kit Chromogenic Endotoxin Quantitation* (Pierce). Como resultado, obteve-se a leitura de 0,691 EU/ml, que equivale a 0,069 ng/ml de endotoxina, concentração considerada baixa pela literatura e incapaz de inibir a quimiotaxia da célula.

Sendo assim, para confirmar a influência desse contaminante nos ensaios de quimiotaxia, foi necessário determinar através de uma curva dose-resposta quais concentrações seriam capazes de interferir nos resultados obtidos. Diferentemente do que reporta a literatura, o ensaio de quimiotaxia em Câmara de Boyden apresentou um aumento na resposta quimiotática dos neutrófilos, quando esses foram previamente tratados com LPS nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ g/ml (figura 3) . Como os ensaios demonstraram uma influência positiva de LPS e os níveis de endotoxina encontrados foram baixos, a inibição da quimiotaxia pela AGP provavelmente não é induzida pela presença de LPS na amostra (ARRAES et al., 2006).

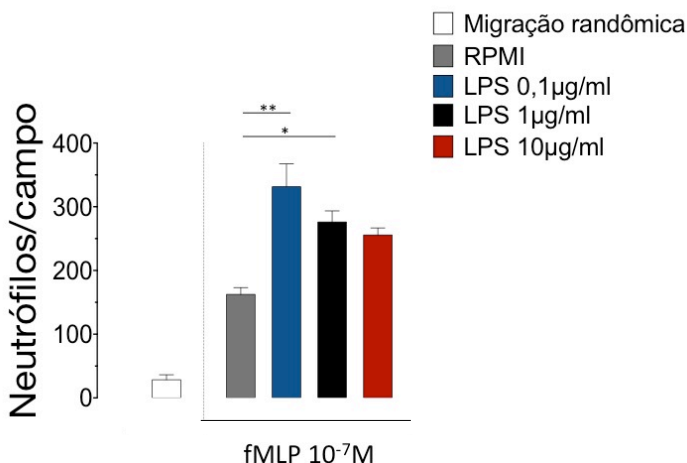


Figura 3. O tratamento com LPS induz uma resposta quimiotática em neutrófilos *in vitro*. Resposta da célula ao ensaio de quimiotaxia em Câmara de Boyden utilizando o fator quimiotático fMLP $10^{-7}M$. Neutrófilos submetidos ao ensaio foram previamente incubadas por 1h a $37^{\circ}C$ com diferentes concentrações de LPS (0,1 , 1 e 10 $\mu g/ml$). Os resultados foram expressos como média \pm EPM de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$ e **para $p < 0,01$; ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

4.3.2 Avaliação da presença de proteínas com peso molecular distinto da AGP.

Ainda avaliando as amostras de AGP utilizadas, procurou-se identificar a presença de possíveis contaminantes. Assim, a verificação da presença da AGP foi feita através de um *Western blot* (figura 4A), contendo diferentes concentrações da proteína e utilizando o anticorpo anti-AGP humana. A presença de contaminantes foi verificada através da coloração com prata de um gel espelho (SDS-PAGE) (figura 4B). O gel revelou bandas correspondentes ao peso molecular da proteína. Por ser glicosilada, verificou-se também outras bandas difusas, característica comum a esse tipo de proteína. Em razão de sua glicosilação não ser Homogênea e de sua porção de carboidrato interagir de maneira não

uniforme com o SDS, o perfil de migração apresenta-se desigual, levando ao aparecimento dessas bandas difusas. Dessa forma, levando em conta esses resultados, a presença de contaminantes protéicos foi então descartada.

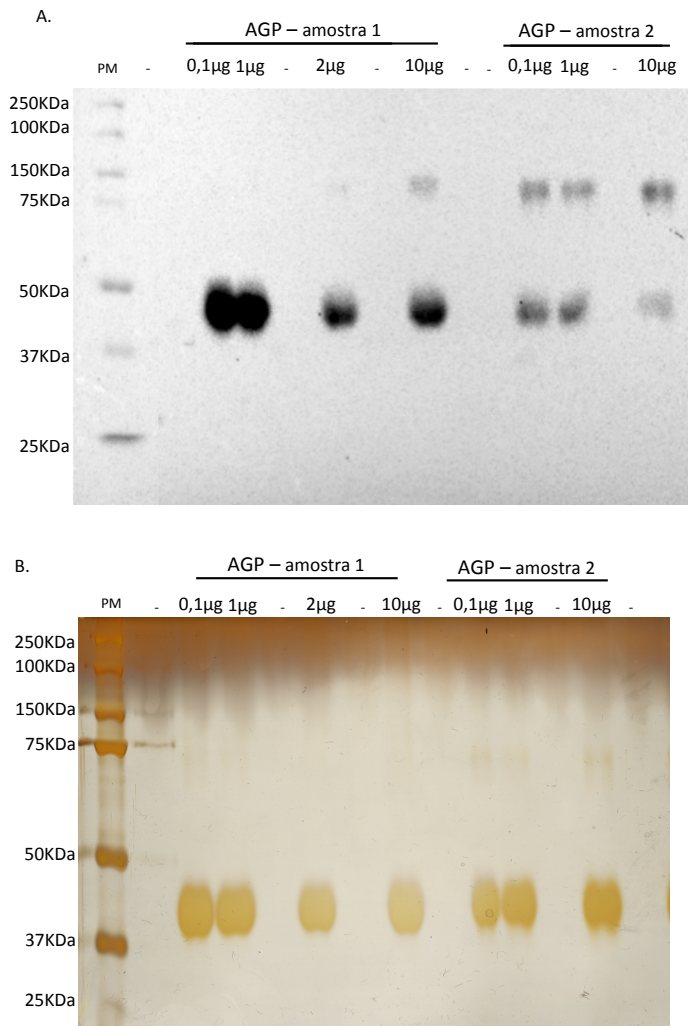


Figura 4. Caracterização da AGP comercial e confirmação da ausência de contaminantes.

(A) *western blot*, utilizando anticorpo anti-hAGP para confirmação da presença de AGP nas amostras utilizadas. (B) Gel de SDS-PAGE, das diferentes concentrações de AGP, corado com nitrato de prata.

4.4 A AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo fator quimiotático fMLP.

Com o objetivo de investigar se as concentrações da AGP reportadas na literatura seriam capazes de inibir a quimiotaxia de neutrófilos, foi realizado o ensaio quimiotático *in vitro* em Câmara de Boyden (LAINÉ et al., 1990; MESTRINER et al., 2007). Para otimizar os experimentos, utilizou-se a concentração de 250 µg/ml de AGP (figura 5). Antes de serem submetidos ao ensaio, os neutrófilos isolados foram incubados com a proteína por 1h a 37°C. Como controles, foram utilizados neutrófilos incubados sem a proteína ou com 100 ng/ml de LPS. Como fator quimiotático, foi utilizado fMLP (10^{-7} M) e para a migração ao acaso (randômica), o meio RPMI contendo 0,01% de albumina bovina (BSA).

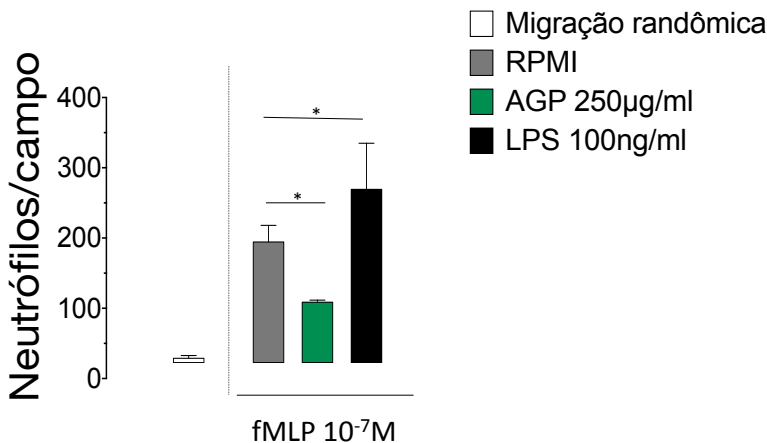


Figura 5. AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos isolados do sangue periférico foram incubados por 1h a 37°C em meio de cultura (RPMI), ou em meio contendo AGP (250 µg/ml) ou LPS (100 ng/ml). Após, os neutrófilos foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia em Câmara de Boyden, estimulados pelo fator quimiotático fMLP (10^{-7} M). Os resultados foram expressos como média ± EPM de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$ e **para $p < 0,01$; ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

4.5 Ácido siálico inibe a resposta quimiotática de neutrófilos ao fMLP

Uma das características da AGP é a presença de ácido siálico. Levando em conta que 12% do número total de monossacarídeos da proteína são de ácido siálico (*N-acetylneuraminic acid*, -Neu5Ac), e que esse carboidrato está envolvido na ativação de alguns receptores inibitórios, considerou-se pertinente avaliar seu envolvimento na inibição da quimiotaxia induzida pela AGP (IMRE et al., 2005; TREUHEIT; COSTELLOTT; HALSALL, 1992).

Para investigar essa possibilidade, foi realizado o teste, de quimiotaxia em Câmara de Boyden, utilizando o ácido siálico solúvel Neu5AC na concentração de 6 μ M, molaridade equivalente a 250 μ g/ml de AGP. Assim, neutrófilos humanos foram incubados por 1h a 37°C, com 6 μ M de Neu5AC ou de AGP, e posteriormente foi realizado o ensaio de quimiotaxia.

Como mostra a figura 6, o tratamento das células com 6 μ M de ácido siálico resultou na inibição da migração dos neutrófilos em direção ao fator quimiotático. Essa inibição foi similar à induzida pela mesma concentração da proteína AGP. Sendo assim, o ácido siálico em sua forma solúvel também foi capaz de interferir na resposta quimiotática dos neutrófilos em direção ao fMLP.

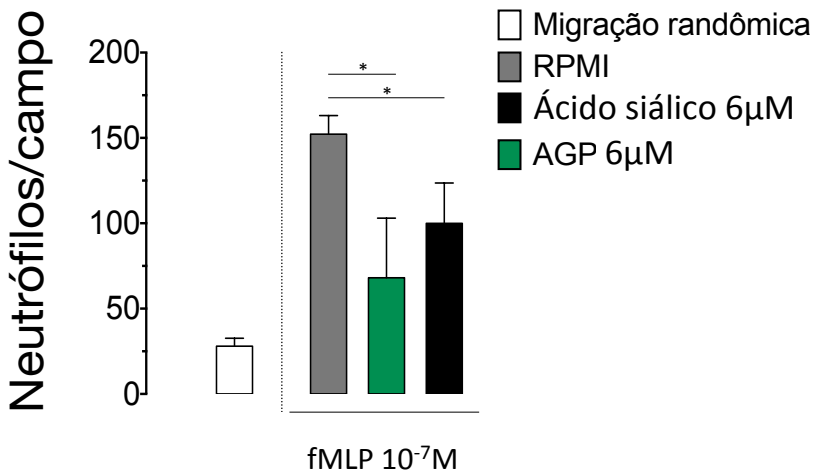


Figura 6. O ácido siálico inibe a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos isolados do sangue periférico foram incubados por 1h a 37°C em meio de cultura (RPMI), ou em meio contendo 6 µM de AGP ou de ácido siálico (Neu5Ac). Neutrófilos, após tratamento, foram submetidos a um ensaio de quimiotaxia em Câmara de Boyden, estimulados pelo fator quimiotático fMLP (10^{-7} M). Os resultados foram expressos como média ± EPM de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$; ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

4.6 AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos de maneira dependente de ácido siálico.

Observando que o Neu5Ac inibiu a quimiotaxia dos neutrófilos com a mesma eficácia da inibição induzida pela AGP, investigou-se o efeito da AGP sem seus resíduos de ácido siálico (desialilada) sobre a quimiotaxia dessas células.

4.6.1 Produção da proteína desialilada

Para obtenção da proteína sem o ácido siálico, incubou-se a AGP com 100 mU de neuraminidase (12h, 37°C). A neuraminidase cliva os resíduos de ácido siálico preferencialmente nas posições: α -2-3 > α -2-6 ; α -2-8. Após a incubação com sialidase, a amostra foi submetida à

uma cromatografia de exclusão por tamanho que gerou o cromatograma da figura 7A. Para confirmar a presença da AGP, as frações 1A5, 1A6 e 1A7 foram testadas por *Western blot*, utilizando um anticorpo anti-hAGP, como mostra a figura 7B. As proteínas presentes nessas frações foram denominadas de dAGP. Nessa mesma figura pode-se ainda observar que o peso molecular das proteínas presentes nessas frações é menor do que o peso da AGP não submetida ao processo de retirada do carboidrato, passando de 43kDa para 40KDa. Como controle, outra amostra da AGP da qual não foi retirado os resíduos de ácido siálico, foi submetida às mesmas etapas do processo, porém sem a presença da neuraminidase. Essa foi denominada de AGP nativa.

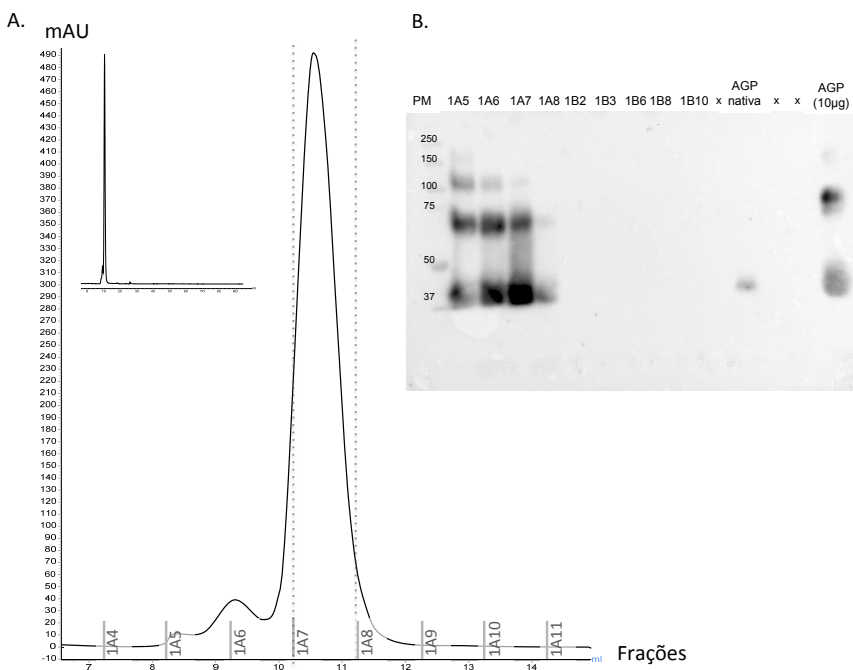


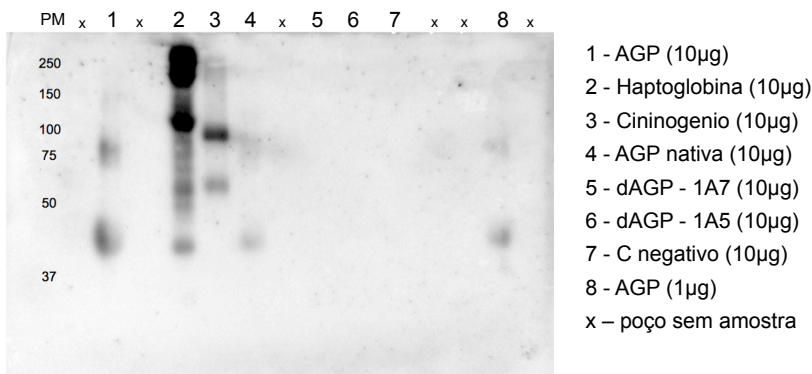
Figura 7. Purificação por exclusão de tamanho em FPLC da AGP desialilada, após tratamento com neuraminidase. (A) Cromatograma representando os picos obtidos e as frações 1A5, 1A6 e 1A7 coletadas, correspondentes à AGP desialilada (dAGP). **(B)** Confirmação por *western blot* da presença de AGP nas frações coletadas. Como controle

positivo foi utilizada a proteína com seus resíduos de ácido siálico íntegros: AGP nativa e 10 µg de AGP comercial.

4.6.2 Confirmação da ausência de ácido siálico

Procurando determinar o grau de desialilação (ausência desse carboidrato) da proteína obtida com o processo de neuraminidase, as frações 1A5 e 1A7 foram testadas. Uma análise por *Western Blot* foi realizada utilizando a lectina biotilada *Sambucus nigra*, que reconhece preferencialmente ácido siálico na posição α -2,6. Como controles positivos foram utilizadas as proteínas haptoglobina e cininogênio de alto peso molecular, além da AGP em sua forma nativa. Como controle negativo utilizou-se uma proteína recombinante expressa em *E.coli* (arginina quinase) que não apresenta carboidrato em sua estrutura. A figura 8A mostra que não foi possível detectar nenhuma banda correspondente à AGP desialilada, nas frações 1A7 e 1A5. Isso permite dizer que a retirada do ácido siálico nas posições α -2,6 foi eficaz. Para caracterizar que foi feita apenas a retirada do ácido siálico e que os outros carboidratos da proteína não foram afetados, foi feito um *Western Blot*, utilizando a lectina biotilada *Aleuria aurantia*, que reconhece o carboidrato fucose (figura 8B). Esses resultados sugerem que a neuraminidase retirou os ácidos siálicos da AGP e o processo de isolamento da proteína desialilada foi eficiente. Dessa forma, a proteína obtida resultou em uma amostra adequada para o uso experimental.

A.



B.

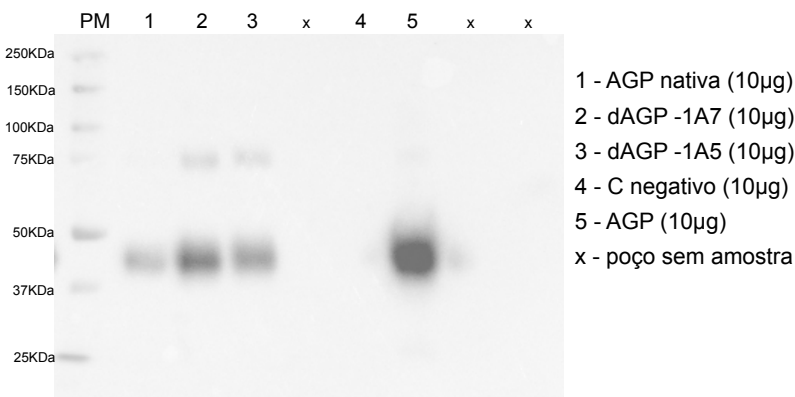


Figura 8. Confirmação da remoção do ácido siálico da AGP e avaliação da presença de outros carboidratos. Análise das frações coletadas (1A5 e 1A7) por *western blot* em (A), utilizando a lectina *Sambucus nigra*, que reconhece ácido siálico na posição α -2,6, e, em (B), utilizando a lectina *Aleuria aurantia*, que reconhece fucose na posição α -1,2. Como controle positivo foi utilizado 10 μ g de AGP comercial de haptoglobina e de cininogênio de alto peso molecular, e como controle negativo foram utilizados 10 μ g da proteína

recombinante arginina quinase, a qual não apresenta carboidratos em sua estrutura.

4.6.3 Avaliação da quimiotaxia

Estudos já publicados demonstraram a importância do ácido siálico na inibição de atividades celulares como, por exemplo, a inibição da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (BENNETT; SCHMID, 1980; BORIES et al., 1990; GUNNARSSON et al., 2010; PUKHALSKY et al., 1998; VASSON et al., 1994). Sendo assim, após a obtenção da proteína desialilada, a atividade quimiotática da célula foi avaliada através do ensaio de quimiotaxia. Para esse ensaio, os neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram tratados com 100 $\mu\text{g/ml}$ de AGP nativa ou AGP desialilada (dAGP). A AGP nativa com os resíduos de ácido siálico foi utilizada como controle positivo. Como mostra a figura 9, a desialilação da AGP (dAGP) foi capaz de reverter significativamente a resposta quimiotática inibitória induzida pela AGP. A reversão obtida com a retirada do carboidrato foi de aproximadamente 30% quando compara-se com a AGP nativa.

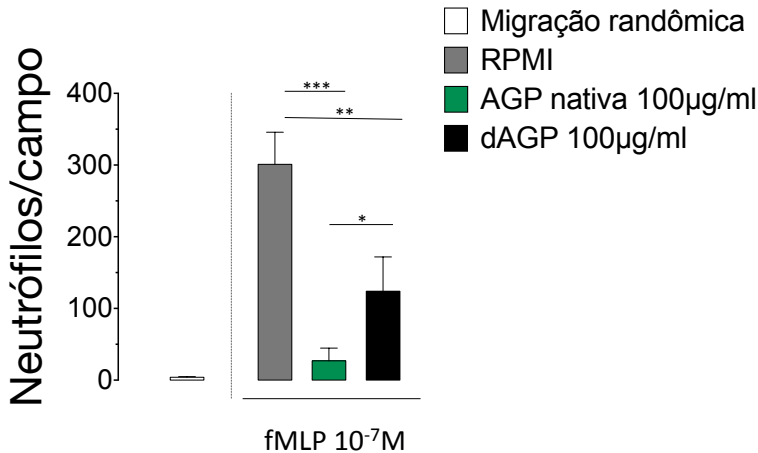


Figura 9. AGP inibe a quimiotaxia dos neutrófilos humanos de maneira parcialmente dependente de ácido siálico. Neutrófilos purificados do sangue periférico foram incubados por 1 h a 37°C com

RPMI, AGP (100 µg/ml) ou AGP desialilada (dAGP 100 µg/ml) e estimulados por fMLP (10⁻⁷ M) em Câmara de Boyden. A AGP desialilada foi obtida após incubação da proteína com a neuraminidase do *Clostridium perfringens* (100mU/mg de proteína) overnight a 37°C. Os resultados foram expressos como média ± EPM de medidas em triplicata. *para p<0,05, **para p<0,01 e ***para p<0,001; ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni.

4.7 A AGP interage com neutrófilos de maneira dependente da sua concentração.

Os resultados observados anteriormente, nos quais a proteína mostrou ser capaz de inibir a quimiotaxia da célula, sugerem que esteja ocorrendo uma interação entre a AGP e a superfície dos neutrófilos. Diversos são os trabalhos que mostraram a influência da AGP sobre a atividade dessa célula. O trabalho de Gunnarsson e colaboradores demonstra que a ligação dessa proteína aos neutrófilos é capaz de induzir uma resposta intracelular (GUNNARSSON et al., 2010). Investigando a possibilidade dessa interação, marcamos a proteína AGP com um fluorocromo Alexa Fluor 488 para que fosse possível realizar essa análise através de citometria de fluxo (conforme descrito em materiais e métodos). A proteína marcada, foi incubada por uma hora a 4°C para que essa interação fosse estabelecida. Para determinar a melhor concentração a ser utilizada nos experimentos futuros, diferentes concentrações da proteína foram utilizadas nesse ensaio. Como mostra a figura 10, a ligação entre a AGP marcada e o neutrófilo ocorreu de maneira dependente da concentração de proteína.

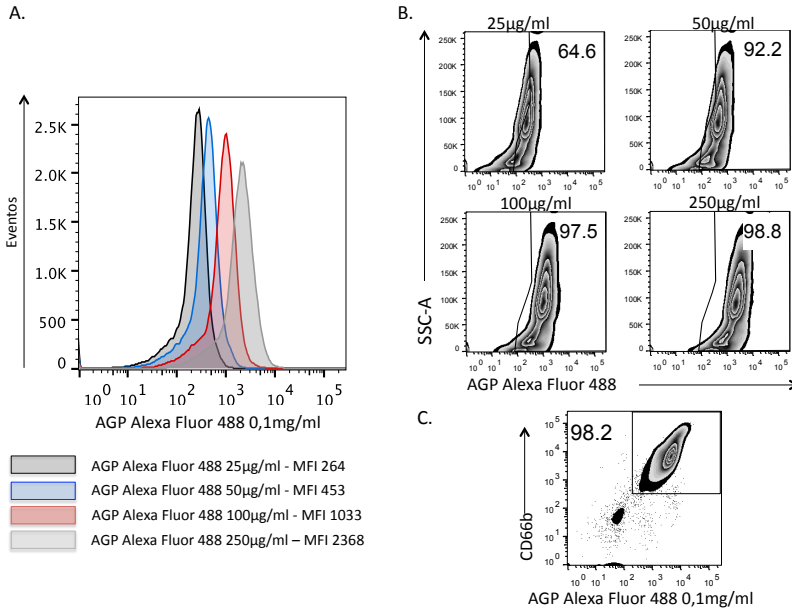


Figura 10. AGP liga-se à superfície de neutrófilos. (A) Histograma representando as diferentes concentrações da AGP marcada com a molécula fluorescente Alexa Fluor 488 (25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml e 250 µg/ml). (B) *Dot plots* da população de células marcadas com diferentes concentrações da AGP-Alexa Fluor 488. (C) *Dot plots* da população de células marcadas com anti-CD66b e AGP-Alexa Fluor 488. Neutrófilos isolados por gradiente de Percoll foram incubados com a proteína marcada por 30 minutos a 4°C, lavadas, e em seguida foi feita a análise por citometria de fluxo. Para a análise foram adquiridos 50.000 eventos.

4.8 O tratamento de neutrófilos com AGP não interfere na ligação dos anticorpos fluorescentes anti-Siglec-5 ou 9.

Estabelecida a interação entre AGP e neutrófilos, procurou-se investigar se essa interação estaria ocorrendo através da ligação a receptores celulares do tipo Siglec 5 e/ou 9. Assim, fez-se um ensaio de citometria para o qual foram utilizados anticorpos fluorescentes anti-hSiglec-5-FITC ou anti-hSiglec-9-PE. Para realizar esse ensaio, os

neutrófilos isolados foram incubados com diferentes concentrações (0,1; 0,3 e 1,0 mg/ml) da AGP por 1h a 4°C e, em seguida, as células foram lavadas e expostas ao anticorpo anti-hSiglec-5 ou 9 (0,5 µg/ml, 1h a 4°C). A seguir, procedeu-se à análise por citometria de fluxo. O resultado obtido não revelou nenhuma diferença na média da intensidade de fluorescência entre as células tratadas com a AGP e as não tratadas (figura 11). A diminuição da intensidade de fluorescência por conta da menor ligação dos anticorpos anti-hSiglec-5 ou 9 poderia indicar que a AGP ocupa o mesmo sítio de ligação desses anticorpos.

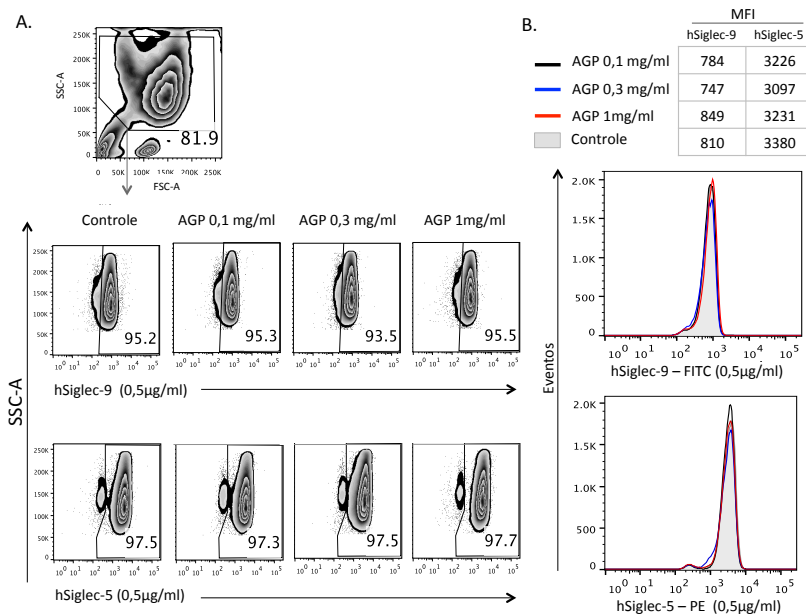


Figura 11. O tratamento com AGP não foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência de neutrófilos marcados com anti-Siglec-5 ou -9. Neutrófilos foram tratados com AGP (0,1; 0,3 e 1,0 mg/ml) por 1h e marcados com os anticorpos anti-hSiglec-5 ou 9 (0,5 µg/ml) a 4°C. **(A)** Estratégia de *gating* utilizada para análise das fluorescências. *Dot plots* representando a porcentagem de células positivas para anti-hSiglec-9 e hSiglec-5 nos diferentes tratamentos com AGP. **(B)** Média de intensidade de fluorescência (MFI) e histogramas sobrepostos das fluorescências em x, pelo número de eventos em y, dos neutrófilos marcados com anti-Siglec-9 e 5 sem tratamento (controle),

ou tratados com as diferentes concentrações da proteína. Para a análise foram adquiridos 50.000 eventos.

4.9 O tratamento com anticorpos neutralizantes anti-hSiglec-5 ou 9 não foi capaz de deslocar a ligação da AGP Alexa Fluor 488 dos neutrófilos.

Ainda procurando avaliar a interação entre AGP e Siglecs e confirmar os resultados obtidos anteriormente, utilizou-se a AGP marcada com Alexa Fluor 488. Neutrófilos foram tratados com anticorpos neutralizantes hSiglec-5 ou hSiglec-9 nas concentrações de 10 µg/ml e 100 µg/ml por 30 minutos a 4°C. Em seguida essas células foram lavadas e incubadas com 100 µg/ml da proteína marcada (AGP Alexa Fluor 488) por 1h a 4°C. Para retirada do excesso da proteína, essas células foram novamente lavadas e então submetidas à análise por citometria de fluxo. Como nesse caso os anticorpos não produzem fluorescência, uma diminuição na intensidade de fluorescência da proteína poderia indicar que o anticorpo estaria ocupando o mesmo sítio de ligação que a AGP Alexa Fluor 488, impedindo essa de interagir com as Siglec-5 ou 9. No entanto, como mostra a figura 12, a redução na intensidade de fluorescência não pôde ser observada.

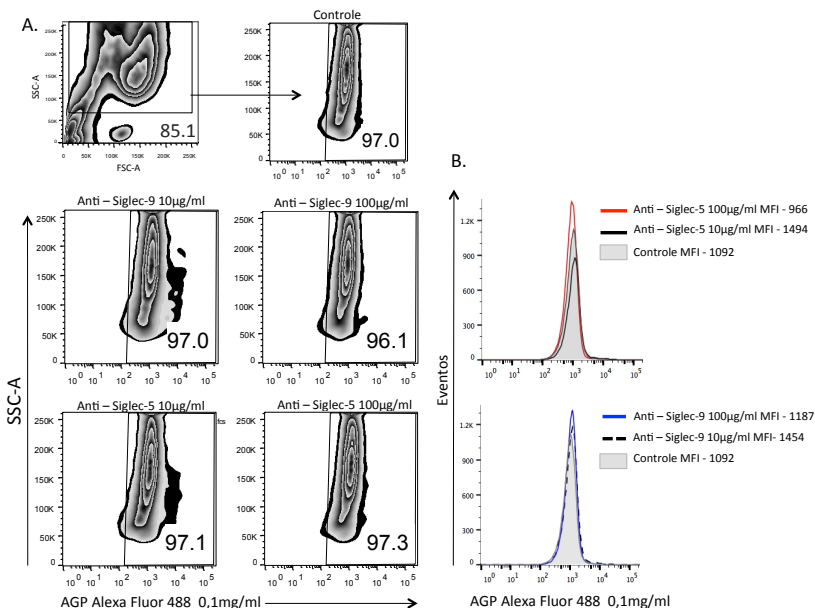


Figura 12. O tratamento com anti-Siglec-5 ou -9 neutralizantes não interfere na ligação entre a AGP marcada e os neutrófilos. Neutrófilos incubados por 30 minutos com diferentes concentrações dos anticorpos anti h-Siglec-5 ou 9 (10 e 100 µg/ml). Após esse período, as células foram lavadas e então tratadas com 100 µg/ml de AGP-Alexa Fluor 488 e incubados por 1h a 4°C. **(A)** Estratégia de *gating* utilizada para análise dos dot plots representados abaixo. Dot plots da porcentagem de células positivas para AGP-Alexa Fluor 488 nos diferentes tratamentos com os anticorpos hSiglec-5 e/ou 9. **(B)** Histogramas sobrepostos da intensidade de fluorescência, em x, pelo número de eventos, em y, da AGP-Alexa Fluor 488 nos diferentes tratamentos com os anticorpos hSiglec-5 e/ou 9. Para esse ensaio foram adquiridos 50.000 eventos, dos quais foi feita a média da intensidade de fluorescência (MFI).

5 Discussão

A chegada dos neutrófilos até o foco inicial da inflamação ocorre através de uma série de eventos sequenciais. Dentre esses eventos, a quimiotaxia desenvolve papel fundamental pois é responsável por guiar essas células até o local exato da inflamação. Embora sejam uma população celular fundamental para conter e eliminar o patógeno, seu acúmulo leva ao dano tecidual uma vez que essas células não são capazes de discriminar entre as células do hospedeiro e o agente causador da inflamação. Muitos dos processos inflamatórios geram danos teciduais localizados porém, quando a resposta se torna persistente e intensa o dano pode se estender culminando na falência do órgão. Uma ativação desregulada desses mecanismos celulares pode resultar na infiltração excessiva dos neutrófilos, e ainda estimulá-los a migrar em direção a órgãos distantes do foco inflamatório, por exemplo, o pulmão, no caso da sepse.

Dentro desse contexto, é fundamental a existência de mecanismos capazes de modular a resposta quimiotática do neutrófilo para reduzir ou restringir esse dano. Muitos dos receptores que desenvolvem esse papel inibitório apresentam em sua estrutura um domínio intracelular ITIM. Esse domínio, ao recrutar outras proteínas, é capaz de interferir na cascata de sinalização ativada por outros receptores, inibindo-a. Dentro dos diversos receptores que apresentam essas propriedades, uma das famílias que está bem caracterizada é a das lectinas do tipo Siglecs. As Siglecs, quando ativadas pelo ácido siálico presente em glicoproteínas e glicolípídeos, são um dos receptores que inibem a resposta imune celular através da ativação do domínio ITIM.

Em paralelo ao recrutamento dos neutrófilos até o foco da inflamação, a resposta inflamatória desencadeia uma série de outros eventos, tais como o aumento da produção de algumas proteínas secretadas pelo fígado, as chamadas proteínas de fase aguda. O interessante é que algumas dessas proteínas são capazes de interferir na resposta inflamatória atuando diretamente sobre células imunes, como os neutrófilos. Algumas dessas proteínas, como é o caso AGP, tiveram suas características imunomodulatórias descritas. A AGP demonstrou ser capaz de inibir a chegada dos neutrófilos até o foco da infecção, pois inibe não só as etapas de rolamento e adesão *in vivo* como também a quimiotaxia *in vitro* (LAINÉ et al., 1990; MESTRINER et al., 2007).

Uma vez que a AGP pode inibir a quimiotaxia da célula, aumentam as evidências de que essa proteína possa estar envolvida no

controle do recrutamento dos neutrófilos, através da ativação de receptores inibitórios. Receptores inibitórios seriam, então, capazes de interferir na cascata de sinalização ativada por receptores quimiotáticos que são essenciais para o direcionamento da célula. Sabendo que os mecanismos envolvidos nessa resposta inibitória ainda não foram esclarecidos, o objetivo deste trabalho foi verificar se o mecanismo pelo qual a AGP inibe a quimiotaxia dos neutrófilos está relacionado com a ligação de seus resíduos de ácido siálico a receptores inibitórios do tipo Siglec-5 ou 9. Esses receptores seriam responsáveis pela ativação de vias intracelulares inibitórias, modulando a resposta quimiotática da célula.

Diversos estudos demonstraram que a administração sistêmica de LPS é capaz de inibir a migração dos neutrófilos até o foco da inflamação (TAVARES-MURTA et al., 2001). Além do mais, o tratamento de neutrófilos *in vitro* com LPS é capaz de exercer uma influência negativa sobre a quimiotaxia da célula em direção ao fator quimiotático IL-8 (HEIT et al., 2002). Durante os ensaios realizados neste trabalho para determinar o nível de contaminação da AGP por LPS, foram encontradas baixas doses desse contaminante (0,069 ng/ml). Segundo a literatura, essa concentração não seria suficiente para inibir a quimiotaxia dos neutrófilos. Após injeção intraperitoneal de tioglicolato em camundongos, é necessário uma concentração de LPS acima de 1 µg/kg administradas i.v. para inibir a migração dessas célula *in vivo* (TAVARES-MURTA et al., 2001). Para inibir a quimiotaxia em resposta a IL-8 aproximadamente 10 µg/ml são necessários (ARRAES et al., 2006; SOUTO et al., 2011). Além disso, os resultados apresentados aqui demonstram que o LPS aumentou a resposta quimiotática dos neutrófilos ao fMPL de uma maneira concentração-dependente. Dessa forma, as quantidades de LPS encontradas nas amostras de AGP sugerem que o efeito inibitório induzido pela proteína não ocorre devido à presença de LPS nas amostras.

A influência do LPS na inibição da quimiotaxia em resposta a fatores quimiotáticos intermediários como a IL-8, ocorre devido à diminuição de expressão do seu receptor CXCR2 (ALVES-FILHO et al., 2009; CUMMINGS et al., 1999; RIOS-SANTOS et al., 2007). Por outro lado, o *priming* de neutrófilos com LPS é capaz de induzir tanto o aumento na expressão de moléculas de superfície envolvidas na migração, como o CCR2 e o CD11b/CD18, quanto o aumento na expressão de receptores que reconhecem fMLP, facilitando, assim, a resposta quimiotática da célula (MANDAL; NOVOTNY; HAMILTON, 2005; SOUTO et al., 2011; ZHOU et al., 2005). Além disso, a ativação

de receptores do tipo TLR4 que reconhecem LPS, não compromete a maquinaria do citoesqueleto da célula. Muitos dos estudos realizados para averiguar a influência da ativação de receptores do tipo TLR na quimiotaxia, no entanto, não avaliaram o tempo de exposição ao agonista desses receptores, nem a influência dessa ativação na cinética de migração dos neutrófilos.

Os neutrófilos submetidos a diferentes gradientes de mediadores quimiotáticos, como os de alvo final (fMLP) e intermediários (IL-8), induzem uma redução na ativação da proteína intracelular Akt, deslocando a via de sinalização e levando a célula a migrar preferencialmente em direção a mediadores finais como o fMLP. Além disso, o LPS é capaz de inibir a ativação de Akt através da ativação da via p38 MAPK, prevenindo a migração em direção a mediadores intermediários e favorecendo a ativação da via induzida por receptores de fMLP (HEIT et al., 2002). Considerando que a via de sinalização ativada por receptores de fMLP é diversa daquela ativada por quimioquinas como IL-8, o aumento da resposta quimiotática pelo LPS pode estar ocorrendo devido a inibição da cascata intracelular PI3K/AKT que é induzida pela ativação de quimioquinas intermediárias, resultando em um aumento da migração em direção a fatores quimiotáticos de ponto final.

Durante a resposta inflamatória, ocorre um aumento considerável na concentração de proteínas de fase aguda, sendo que as concentrações de AGP podem chegar a valores de até 3 g/L (7,3 mM) (HIGAI et al., 2005). Proteínas de fase aguda apresentam em sua estrutura uma alta concentração de carboidrato, e seus padrões de glicosilação mudam durante os estágios da inflamação. A AGP apresenta em sua porção glicosilada um alto teor de ácido siálico e durante a inflamação apresenta diferentes padrões de glicosilação (DE GRAAF et al., 1993; HIGAI et al., 2003). Dessa forma, existe uma grande probabilidade de a proteína estar envolvida na ativação de receptores que reconheçam esse carboidrato. Neste estudo, observou-se que a proteína é capaz de modular a resposta quimiotática dos neutrófilos e que o ácido siálico presente na proteína também está envolvido.

De acordo com a literatura, o ácido siálico da AGP desenvolve um papel central na modulação de algumas atividades da célula. No entanto o envolvimento desse carboidrato na quimiotaxia de neutrófilos ainda não havia sido verificado. Durante o estudo, observou-se que o ácido siálico em sua forma livre também induziu uma redução na quimiotaxia dos neutrófilos, com a mesma eficácia que a induzida pela AGP. Observou-se também que essa redução não ocorreu em função da

diminuição do número de células viáveis, sugerindo que as células são capazes de responder a diferentes estímulos. Estudos vêm demonstrando que alguns carboidratos em sua forma livre, em concentrações na faixa de picomolar e micromolar, podem iniciar alguns processos biológicos (VARKI et al., 2009). A estrutura do ácido siálico solúvel apresenta-se na conformação necessária para reconhecimento das Siglecs-5 e 9. Porém quando comparada a outros ligantes, a taxa de afinidade com que isso ocorre é avaliada como moderada (“Functional Glycomics Gateway”, 2010). Essa interação, no entanto, pode ser intensificada quando esse receptor encontra-se em um ambiente de alta concentração do carboidrato ligante, pois passa a possibilitar interações multivalentes favorecendo a ativação desse receptor (VARKI et al., 2009).

Avaliando o envolvimento do ácido siálico nas atividades induzidas pela AGP, foi demonstrado que a retirada do ácido siálico reverte a atividade inibitória dessa proteína sobre algumas funções celulares (BENNETT; SCHMID, 1980; GUNNARSSON et al., 2010; LIU et al., 2014). Seguindo nessa linha, os resultados deste estudo corroboram com esses achados e demonstram a participação dos resíduos de ácido siálico da proteína na inibição da quimiotaxia da célula. A retirada do ácido siálico resultou na reversão da atividade inibitória em aproximadamente 30% em relação à induzida pela AGP nativa. A reversão dessa atividade demonstra que a AGP sem a porção residual desse carboidrato diminui a influência exercida pela proteína sobre a resposta quimiotática dos neutrófilos, sugerindo um envolvimento direto do ácido siálico nessa atividade inibitória. Levando em conta que a lectina de detecção do ácido siálico *Sambucus nigra* utilizada neste trabalho só reconhece esse carboidrato na posição α -2,6, não foi possível determinar se os ácidos siálicos presentes em outras conformações na AGP haviam sido retirados. O perfil de reversão observado, no qual a dAGP ainda foi capaz de induzir uma inibição parcial sobre essa resposta quimiotática, pode-se sugerir que o processo de retirada do carboidrato pela neuraminidase não foi eficaz em remover todos os ácidos siálicos presentes na proteína, uma vez que a preferência dessa enzima em clivar decresce na ordem: α -2-3 > α -2-6 ; α -2-8. Sabendo que Siglecs -5 e/ou 9 são capazes de reconhecer o ácido siálico tanto nas posições α -2,3 quanto nas posições α -2,6 e α -2,8, esse resultado permite inferir que os resíduos do carboidrato que permaneceram na AGP podem estar induzindo à inibição da quimiotaxia através da ativação dessas Siglecs, ou ainda pela ativação de outros receptores inibitórios, como os PILRa. Os receptores do tipo PILRa, que também são capazes de reconhecer diversos ligantes sialilados através

da interação com o ácido siálico, também podem estar sendo ativados (SUN et al., 2012). Esses receptores apresentam uma afinidade maior pelo ácido siálico do que as Siglecs, e neutrófilos tratados com fMLP apresentaram um aumento na expressão desse receptor. Além disso, eles também apresentam um domínio inibitório em sua estrutura e estudos recentes demonstraram que ele é capaz de regular a ativação de integrinas induzidas por fatores quimioatrativos (LU et al., 2014; WANG et al., 2013). Pode-se sugerir ainda que o mecanismo pelo qual a AGP desenvolve essa atividade inibitória seja parcialmente dependente de seus resíduos de ácido siálico e que a interação entre AGP e neutrófilo esteja apenas facilitando a ativação de outros receptores. A ligação da AGP ao neutrófilo pode estar ocorrendo através de uma interação carboidrato-carboidrato, resultando na mudança do padrão de glicosilação da membrana celular. Essa mudança pode facilitar a ativação de receptores através de uma ligação do tipo *cis*. Quando ativados, esses receptores seriam os responsáveis pela atividade inibitória induzida pela AGP.

A demonstração do envolvimento do ácido siálico na quimiotaxia dos neutrófilos levou à investigação de como a interação da AGP com essas células estaria ocorrendo. O perfil positivo de interação obtido neste estudo sugere que a atividade inibitória da AGP esteja ocorrendo através da sua interação com alguma proteína presente na superfície da célula. Observou-se que a AGP marcada com a molécula fluorescente Alexa Fluor 488 apresentou uma baixa afinidade de ligação aos neutrófilos, na faixa de milimolar. As interações entre os carboidratos e as proteínas que os reconhecem são normalmente muito específicas. Essa especificidade é definida por diversos fatores, entre eles a estrutura do carboidrato terminal e o tipo de ligação feita com o carboidrato abaixo. Sendo assim, pequenas mudanças no ligante são capazes de extinguir tal especificidade e por isso impedir a ligação com a lectina. Altamente específica, no entanto, essa interação é estabilizada através de ligações químicas fracas, resultando em uma constante de afinidade baixa, variando na faixa de micromolar a milimolar. Para estabelecer uma afinidade de relevância biológica, as proteínas que ligam carboidratos, de maneira geral, apresentam mais de um sítio de ligação e a capacidade de se associarem na membrana plasmática formando múltiplos (VARKI et al., 2009).

Pouco se sabe sobre os sítios de ligação da AGP, pelo menos dois sítios de ligação diferentes e com afinidades diferentes pela proteína já foram identificados (SHIYAN; BOVIN, 1997). A interação entre as proteínas circulantes e a célula na maioria das vezes ocorre através da

ligação a um receptor de membrana celular. Gunnarsson e colaboradores já haviam descrito anteriormente a ligação/interação entre a AGP e a Siglec-5 e sugerido que essa ligação seria capaz de induzir um aumento nas concentrações de cálcio intracelular. Nesse mesmo estudo, os autores ainda sugerem que essa resposta induzida pela AGP ocorra através da ativação de algum receptor, uma vez que as características do aumento do cálcio intracelular observadas são peculiares à ativação de receptores (GUNNARSSON et al., 2007, 2010). No entanto, a mobilização do cálcio intracelular só pôde ser observada quando os neutrófilos foram pré-tratados com um anticorpo anti-Lselectina, sugerindo que exista a necessidade de um pré-estímulo das células para que a AGP consiga ligar e induzir uma resposta eficaz.

Investigando a possibilidade de interação entre a AGP e as Siglecs, utilizando citometria de fluxo, não foi possível observar se essa interação entre AGP e Siglec-5 ou 9 estaria de fato ocorrendo. Verificou-se nos resultados que não foi detectada nenhuma redução na intensidade de fluorescência, tanto no experimento utilizando os anticorpos neutralizantes para Siglecs e a proteína marcada, quanto nos experimentos onde foram utilizados os anticorpos para Siglecs fluorescentes e a proteína não marcada. Ocorre que esse tipo de ensaio não permite avaliar o sítio específico onde esteja ocorrendo a ligação entre a AGP e o neutrófilo. Dessa forma, existe a possibilidade de que o epítipo ao qual os anticorpos estejam ligando-se à Siglec seja diverso dos epítipos de ligação utilizado pela AGP.

O reconhecimento de ligantes de Siglecs pode ser ainda mais complicado. Segundo a literatura, esses receptores interagem com ligantes sialilados adjacentes, presentes na membrana da célula, através de uma ligação do tipo *cis*. A superfície da maioria das células de mamíferos é formada por uma alta concentração de glicoconjugados que contêm ácido siálico. Essa alta concentração de ácido siálico resulta no encobrimento dos sítios de ligação das Siglecs, mascarando-os e impedindo a interação do tipo *trans* com ligantes glicoconjugados presentes em células adjacentes ou moléculas solúveis. Consequentemente, para que se estabeleça uma maior afinidade de Siglecs por seus ligantes sialilados em posição de ligação *trans*, é necessário que as interações do tipo *cis* sejam eliminadas, liberando os seus sítios de ligação. Esse fenômeno é ativamente regulado *in vivo* através da ação de neuraminidases durante a resposta imune e inflamatória. Essas enzimas seriam responsáveis por clivar o ácido siálico presente na membrana celular, expondo as Siglecs aos seus ligantes. Além disso, a ativação celular também é capaz de eliminar esse

tipo de interação (RAZI; VARKI, 1999), o que poderia explicar a necessidade de ativação de L-selectina para liberação do sítio de ligação da AGP e consequente aumento de cálcio intracelular observado por Gunnarsson e colaboradores em 2007. Como os ensaios de citometria foram realizados a 4°C e os neutrófilos utilizados no ensaio não foram submetidos a nenhum tipo de *priming* específico, existe a possibilidade de que o sítio de ligação entre Siglec e AGP esteja encoberto por uma interação do tipo *cis*, diferentemente do que ocorre nos ensaios de quimiotaxia onde a exposição de neutrófilos ao fator quimiotático fMLP pode facilitar a ligação da AGP. Dessa forma, por não se observar a diminuição da intensidade de fluorescência nos ensaios de citometria, não se pode descartar a possibilidade de que a AGP esteja ligando a essas Siglecs. Como os resultados não permitem uma análise precisa dessa interação, estudos adicionais deverão ser feitos utilizando neutrófilos primados ou até mesmo tratados com neuraminidase no intuito de liberar o sítio de ligação entre AGP e Siglec. Além de determinar os mecanismos envolvidos nesse processo, pode-se questionar em quais situações ocorre esse fenômeno na célula e quais as consequências biológicas desse processo.

Analisados em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem a participação do ácido siálico na inibição da quimiotaxia dos neutrófilos. A hipótese da ativação de receptores inibitórios que reconhecem esse carboidrato não pôde ser descartada, uma vez que os resultados quanto a isso foram inconclusivos. Os mecanismos celulares envolvidos nas atividades da AGP permanecem desconhecidos. Sendo assim, investigações futuras são necessárias para se compreender quais as vias envolvidas nessa capacidade imunomodulatória dos resíduos de ácido siálico da AGP. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da ativação de receptores nas células do sistema imune, porém poucos são os estudos que focam na homeostase do sistema como forma de conter a ativação excessiva da célula. Assim, determinar o mecanismo preciso pelo qual esse carboidrato é capaz de inibir essa resposta quimiotática, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem não só ao controle de doenças inflamatórias, mas também ao controle da progressão do dano tecidual.

6 Conclusão

I. O ácido siálico livre é capaz de inibir a quimiotaxia dos neutrófilos de forma similar à AGP.

II. A retirada dos resíduos de ácido siálico reverteu a inibição da quimiotaxia induzida pela AGP, sugerindo que esse carboidrato está diretamente envolvido nesse processo inibitório.

7 Referências Bibliográficas

ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 339–362, 2009.

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. 1231–1242, jun. 2014.

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.

ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock**, v. 34, n. 1, p. 15–21, set. 2010.

ANDO, M. et al. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, n. 3, p. 878–883, 9 maio 2008.

ANDRADES, M. et al. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. **Journal of Surgical Research**, v. 167, n. 2, p. 307–313, 2011.

ANDREW, N.; INSALL, R. H. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. **Nature cell biology**, v. 9, n. 2, p. 193–200, 2007.

ANGATA, T. 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 of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13251–6, 7 set. 2004.

ANGATA, T. et al. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. **FASEB journal**, v. 20, n. 12, p. 1964–73, out. 2006.

ANGATA, T.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. I-type lectins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 294–316, 19 set. 2002.

ANGATA, T.; VARKI, A. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22127–35, 21 jul. 2000.

ARRAES, S. M. A et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906–13, 1 nov. 2006.

AVRIL, T. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6841–6849, 1 dez. 2004.

BAGGE, U.; AMUNDSON, B.; LAURITZEN, C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 108, n. 2, p. 159–163, 1980.

BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602–3610, 2002.

BENNETT, M.; SCHMID, K. Immunosuppression by human plasma alpha 1-acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 10, p. 6109–13, out. 1980.

BERG JM, TYMOCZKO JL, S. L. **Biochemistry**. 5th. ed. New York: W.H. Freeman, 2002.

BERLIN, C. et al. Alpha 4 Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling Under Physiologic Flow. **Cell**, v. 80, n. 3, p. 413–22, 10 mar. 1995.

BILLADEAU, D. D. PTEN gives neutrophils direction. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 716–8, jul. 2008.

BORIES, P. N. et al. Prevalence of tri- and tetraantennary glycans of human alpha 1-acid glycoprotein in release of macrophage inhibitor of interleukin-1 activity. **Inflammation**, v. 14, n. 3, p. 315–23, jun. 1990.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–70, 24 nov. 2010.

BOUTTEN, A. et al. Alpha 1-acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages. **European journal of immunology**, v. 22, n. 10, p. 2687–2695, 1992.

BOYD, C. R. et al. Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production. **Journal of immunology**, v. 183, n. 12, p. 7703–7709, 15 dez. 2009.

BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. M.; VARKI, A. New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8625–8632, 17 mar. 2000.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.

BROWN, K. A et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157–69, 8 jul. 2006.

CAO, H.; CROCKER, P. R. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? **Immunology**, v. 132, n. 1, p. 18–26, jan. 2011.

CARA, D. C. et al. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Chemokine-Induced Emigration and Chemotaxis In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6552–6558, 1 dez. 2001.

- CARLIN, A. F. et al. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1231–1237, fev. 2007.
- CARLIN, A. 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. 3333–6, 2 abr. 2009a.
- CARLIN, A. F. et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 8, p. 1691–9, 3 ago. 2009b.
- CARP, H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. **The Journal of experimental medicine**, v. 155, n. 1, p. 264–275, 1982.
- CHANG, Y. C. et al. Group B Streptococcus Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses In Vivo. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014.
- CHIU, K. M. et al. Interactions of alpha1-acid glycoprotein with the immune system. I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness. **Immunology**, v. 32, n. 6, p. 997–1005, jun. 1977.
- CHODNIEWICZ, D.; ZHELEV, D. V. Chemoattractant receptor-stimulated F-actin polymerization in the human neutrophil is signaled by 2 distinct pathways. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 1181–1184, 2003.
- CONNOLLY, N. P.; JONES, M.; WATT, S. M. Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoforms and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. **British journal of haematology**, v. 119, n. 1, p. 221–38, out. 2002.
- CORNISH, A L. et al. Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 2123–32, 15 set. 1998.
- COSTELLO, M. J.; FIEDEL, B. A.; GEWURZ, H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein. **Nature**, v. 281, n. 5733, p. 677–678, 25 out. 1979.

COSTELLO, M. J.; GEWURZ, H.; SIEGEL, J. N. Inhibition of neutrophil activation by alpha-1-acid glycoprotein. **Clinical and experimental immunology**, v. 55, n. 2, p. 465–472, fev. 1984.

CROCKER, P. R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. **Current opinion in structural biology**, v. 12, n. 5, p. 609–15, out. 2002.

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, abr. 2007.

CROCKER, P. R.; REDELINGHUYS, P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 6, p. 1467–71, dez. 2008.

CROCKER, P. R.; VARKI, A. Siglecs in the immune system. **Immunology**, v. 103, n. 2, p. 137–145, 2001a.

CROCKER, P. R.; VARKI, A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 337–342, jun. 2001b.

CROCKER, P. R.; ZHANG, J. New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics. **Biochemical Society symposium**, v. 94, n. 69, p. 83–94, jan. 2002.

CROSS, A. S.; WRIGHT, D. G. Mobilization of sialidase from intracellular stores to the surface of human neutrophils and its role in stimulated adhesion responses of these cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 2067–2076, dez. 1991.

CROWLEY, C. A. et al. An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein. **The New England journal of medicine**, v. 302, n. 21, p. 1163–1168, 1980.

CUMMINGS, C. J. et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **Journal of immunology**, v. 162, n. 4, p. 2341–2346, 1999.

DE GRAAF, T. W. et al. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 3, p. 657–666, 1993.

DING, Z. M. et al. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. **Journal of immunology**, v. 163, n. 9, p. 5029–5038, 1999.

DIRIENZO, W. et al. α 1-Acid glycoprotein (α 1-AGP) on the membrane of human lymphocytes: possible involvement in cellular activation. **Immunology Letters**, v. 15, n. 2, p. 167–170, jun. 1987.

ELEANOR LAWRENCE; JOANA MOLDOVAN (ED.). **Janeway's immunobiology**. 8th. ed. [s.l.] Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2011.

ELKS, P. M. et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 712–22, 21 jul. 2011.

ERICKSON-MILLER, C. L. et al. Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes. **Experimental hematology**, v. 31, n. 5, p. 382–8, maio 2003.

FENG, D. et al. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 6, p. 903–15, 16 mar. 1998.

FERGUSON, G. J. et al. PI(3)K γ has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. **Nature cell biology**, v. 9, n. 1, p. 86–91, jan. 2007.

FLOYD, H. et al. Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 861–866, 2000.

FOURNIER, T. et al. Inducible expression and regulation of the alpha 1-acid glycoprotein gene by alveolar macrophages: prostaglandin E2 and

cyclic AMP act as new positive stimuli. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 5, p. 2883–90, 1 set. 1999.

FUNAMOTO, S. et al. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. **Cell**, v. 109, n. 5, p. 611–23, 31 maio 2002.

Functional Glycomics Gateway. Disponível em:

<http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_5655#>.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England journal of medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 1999.

GAO, J. X.; ISSEKUTZ, A. C. Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. **Immunology**, v. 88, n. 3, p. 463–470, 1996.

GAULDIE, J. et al. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 20, p. 7251–7255, 1 out. 1987.

GUNNARSSON, P. et al. The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca²⁺ in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs). **The FASEB journal**, v. 21, n. 14, p. 4059–4069, dez. 2007.

GUNNARSSON, P. et al. Sialic acid residues play a pivotal role in α 1-acid glycoprotein (AGP)-induced generation of reactive oxygen species in chemotactic peptide pre-activated neutrophil granulocytes. **Inflammation Research**, v. 59, n. 2, p. 89–95, mar. 2010.

GUNTEN, S. VON et al. Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1423–31, 15 ago. 2005.

GUPTA, G. S. **Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications**. 1. ed. [s.l.] Springer Vienna, 2012.

GUTHRIDGE, J. M.; KAPLAN, A. M.; COHEN, D. A. Regulation of B cell:T cell interactions: potential involvement of an endogenous B cell sialidase. **Immunological investigations**, v. 23, n. 6-7, p. 393–411, 1994.

HEIT, B. et al. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. **The Journal of cell biology**, v. 159, n. 1, p. 91–102, 14 out. 2002.

HEIT, B. et al. PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 743–752, 2008.

HEUTINCK, K. M. et al. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1943–1955, 2010.

HIGAI, K. et al. Altered glycosylation of α 1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 117–125, mar. 2003.

HIGAI, K. et al. Glycosylation of site-specific glycans of alpha1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1725, n. 1, p. 128–35, 30 ago. 2005.

HIRSCH, E. et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1049–1053, 2000.

HOCHEPIED, T. et al. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 14, n. 1, p. 25–34, mar. 2003.

HUTTENLOCHER, A; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A F. Adhesion in cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 7, n. 5, p. 697–706, 1995.

IMRE, T. et al. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 40, n. 11, p. 1472–83, dez. 2005.

ISHII, T. et al. Neutrophil elastase contributes to acute lung injury induced by bilateral nephrectomy. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 4, p. 1665–1673, 2010.

JANEWAY, C. A. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th editio ed. New York: Garland Science, 2001.

JIN, T. et al. Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1034–1036, 2000.

KAUFMANN, S. H. E. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 705–712, 2008.

KESHARI, R. S. et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: A systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309–333, 2009.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, mar. 2013.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325–34, nov. 2010.

LAINÉ, E. et al. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–9, mar. 1990.

LANOUE, A. et al. Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? **European journal of immunology**, v. 32, n. 2, p. 348–55, fev. 2002.

- LARSSON, A.; HANSSON, L.-O. Plasma protein fractions in healthy blood donors quantitated by an automated multicapillary electrophoresis system. **Journal of chromatographic science**, v. 44, n. 8, p. 479–483, 2006.
- LAWRENCE, M. B. et al. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 717–727, 1997.
- LEKSTROM-HIMES, J. A.; GALLIN, J. I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 23, p. 1703–1714, 2000.
- LEVANDER, L. et al. Effects of α 1-acid glycoprotein fucosylation on its Ca²⁺ mobilizing capacity in neutrophils. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 5, p. 412–420, maio 2009.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–89, set. 2007.
- LI, Z. et al. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1046–1049, 2000.
- LIU, J. et al. An acute-phase protein as a regulator of sperm survival in the bovine oviduct: alpha 1-acid glycoprotein impairs neutrophil phagocytosis of sperm in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 5, p. 342–348, 2014.
- LOCK, K. 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, jan. 2004.
- LU, Q. et al. PILR α and PILR β have a siglec fold and provide the basis of binding to sialic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 22, p. 8221–6, 2014.
- MACKIEWICZ, A.; MACKIEWICZ, K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. **Glycoconjugate journal**, v. 12, n. 3, p. 241–247, 1995.

MAGESH, S. et al. High-affinity ligands of Siglec receptors and their therapeutic potentials. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 23, p. 3537–50, jan. 2011.

MANDAL, P.; NOVOTNY, M.; HAMILTON, T. A. Lipopolysaccharide induces formyl peptide receptor 1 gene expression in macrophages and neutrophils via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **Journal of immunology**, v. 175, n. 9, p. 6085–6091, 2005.

MARASCO, W. A. et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5430–5439, 1984.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 11, p. 1079–1088, 2011.

MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 11 Suppl, p. S97–103, 1 dez. 1997.

MCMILLAN, S. J. et al. Siglec-E is a negative regulator of acute pulmonary neutrophil inflammation and suppresses CD11b β 2-integrin-dependent signaling. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2084–94, 14 mar. 2013.

MESTRINER, F. L. A. C. et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19595–19600, 4 dez. 2007.

MONTRESOR, A. et al. JAK tyrosine kinases promote hierarchical activation of Rho and Rap modules of integrin activation. **The Journal of cell biology**, v. 203, n. 6, p. 1003–19, 2013.

MUNDAY, J. et al. Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. **The Biochemical journal**, v. 355, n. 2, p. 489–497, 2001.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–52, 2002.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–82, mar. 2006.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–11, 2014.

NESS, T. L. et al. CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis. **Journal of immunology**, v. 173, n. 11, p. 6938–6948, 2004.

NICK, J. A et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 5, p. 975–86, 1 mar. 1997.

NISHIO, M. et al. Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. **Nature cell biology**, v. 9, n. 1, p. 36–44, 2007.

ORR, S. J. et al. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1061–8, 1 fev. 2007.

PAULSON, J. C.; KAWASAKI, N. Sialidase inhibitors DAMPen sepsis. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 406–407, 2011.

PAULSON, J. C.; MACAULEY, M. S.; KAWASAKI, N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, n. 1, p. 37–48, abr. 2012.

PHILLIPSON, M. et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 12, p. 2569–75, 27 nov. 2006.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381–90, jan. 2011.

PILLAI, S. et al. Siglecs and Immune Regulation. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 3, p. 357–392, jan. 2012.

PUKHALSKY, A L. et al. Immunomodulating activities of a natural alpha1-acid glycoprotein and its carbohydrate chains attached to the protein-free polymer. **Mediators of inflammation**, v. 7, n. 2, p. 115–118, jan. 1998.

RABSON, A. R.; ANDERSON, R.; GLOVER, A. Defective neutrophil motility and recurrent infection. In vitro and in vivo effects of levamisole. **Clinical and experimental immunology**, v. 33, n. 1, p. 142–149, 1978.

RAMACHANDRAN, V. et al. Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 37, p. 13519–13524, 2004.

RAZI, N.; VARKI, A. 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.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 5, p. 490–7, 1 mar. 2007.

ROBERTSON, C. M. et al. Neutrophil Depletion Causes a Fatal Defect in Murine Pulmonary Staphylococcus aureus clearance. **Journal of Surgical Research**, v. 150, n. 2, p. 278–285, 2008.

ROGER, T.; CALANDRA, T. TLR2-mediated neutrophil depletion exacerbates bacterial sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 17, p. 6889–6890, 2009.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–60, out. 2011.

SATO, T. et al. Inhibition of Corynebacterium parvum-primed and lipopolysaccharide-induced hepatic necrosis in rats by selective depletion of

neutrophils using a monoclonal antibody. **Journal of leukocyte biology**, v. 53, p. 144–150, 1993.

SCHAUER, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 19, n. 5, p. 507–514, out. 2009.

SCHMIDT, S.; MOSER, M.; SPERANDIO, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. **Molecular immunology**, v. 55, n. 1, p. 49–58, ago. 2013.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, v. 23, n. 2, p. 197–223, jan. 2005.

SHI, J. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1226–1230, 15 ago. 2001.

SHIMONAKA, M. et al. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 2, p. 417–427, 2003.

SHIN, M. E. et al. Spatiotemporal organization, regulation, and functions of tractions during neutrophil chemotaxis. **Blood**, v. 116, n. 17, p. 3297–310, 28 out. 2010.

SHIYAN, S. D.; BOVIN, N. V. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha 1-acid glycoprotein. **Glycoconjugate journal**, v. 14, n. 5, p. 631–8, ago. 1997.

SIBILLE, Y.; MARCHANDISE, F. X. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. **The European respiratory journal**, v. 6, n. 10, p. 1529–43, nov. 1993.

SMITH, E. L. et al. Sedimentation, diffusion, and molecular weight of a mucoprotein from human plasma. **The Journal of biological chemistry**, v. 185, n. 2, p. 569–75, ago. 1950.

SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American Journal of**

Respiratory and Critical Care Medicine, v. 183, n. 2, p. 234–242, 15 jan. 2011.

SPILLER, F. et al. α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1584–91, jun. 2012.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301–314, 28 jan. 1994.

SUN, Y. et al. Evolutionarily conserved paired immunoglobulin-like receptor α (PILR α) domain mediates its interaction with diverse sialylated ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15837–15850, 4 maio 2012.

SUNDD, P. et al. “Slings” enable neutrophil rolling at high shear. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 399–403, 2012.

TAMURA, K. et al. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. **Cancer Research**, v. 41, n. 8, p. 3244–3252, 1981.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, v. 25, n. 4, p. 247–253, 2001.

TILG, H. et al. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 5, p. 1629–1636, 1993.

TREUHEIT, M. J.; COSTELLOTT, C. E.; HALSALL, H. B. Analysis of the five glycosylation sites of human AGP. **Biochemical Journal**, v. 283, n. 1, p. 105–112, 1992.

VAN OSS, C. J. et al. Phagocytosis-inhibiting properties of human serum alpha-1 acid glycoprotein. **Immunological communications**, v. 3, n. 4, p. 321–8, jan. 1974.

- VARKI, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. **FASEB journal**, v. 11, n. 4, p. 248–55, 1 mar. 1997.
- VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 2nd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- VARKI, A.; ANGATA, T. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. **Glycobiology**, v. 16, n. 1, p. 1R–27R, jan. 2006.
- VASSON, M. P. et al. Effects of alpha-1 acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 224, n. 1, p. 65–71, 14 jan. 1994.
- WANG, J. et al. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation. **Nature immunology**, v. 14, n. 1, p. 34–40, jan. 2013.
- WANG, L. et al. Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 518–30, 23 abr. 2010.
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England journal of medicine**, v. 320, n. 6, p. 365–376, 1989.
- WILLIAMS, A. F.; BARCLAY, A. N. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. **Annual review of immunology**, v. 6, p. 381–405, 1988.
- WILLIAMS, M. R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in immunology**, v. 32, n. 10, p. 461–9, out. 2011.
- YANG, K. H. et al. The main functions and structural modifications of tripeptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) as a chemotactic factor. **Pharmazie**, v. 63, n. 11, p. 779–783, 2008.
- ZHANG, J. Q. et al. Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood

leukocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22121–6, 21 jul. 2000.

ZHOU, X. et al. LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 288, n. 4, p. L655–L662, 2005.

ZU, Y. L. et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 4, p. 1982–1989, 1998.