



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Cristina Bartelle Lorenzini

**Mecanismos envolvidos na inibição da quimiotaxia de neutrófilos humanos
pela alfa-1-glicoproteína ácida**

FLORIANÓPOLIS

2019

Cristina Bartelle Lorenzini

Mecanismos envolvidos na inibição da quimiotaxia de neutrófilos humanos
pela alfa-1-glicoproteína ácida

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

Florianópolis

2019

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

Lorenzini, Cristina
Mecanismos envolvidos na inibição da quimiotaxia
de neutrófilos humanos pela alfa-1-glicoproteína
ácida / Cristina Lorenzini ; orientador, Fernando
Spiller, 2019.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Quimiotaxia, fMLP,
neutrófilos. 3. Receptores inibitórios, Siglec. 4.
Proteína de fase aguda, AGP. I. Spiller, Fernando.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Cristina Bartelle Lorenzini

**Mecanismos envolvidos na inibição da quimiotaxia de neutrófilos humanos
pela alfa-1-glicoproteína ácida**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Gustavo Batista Menezes
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.(a) Dr.(a) Cristina Beatriz Casabuena Bonorino
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Fernando Spiller
Orientador

Florianópolis, 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial ao meu pai Cezar, por todo incentivo e apoio incondicional, e por fazerem da sua felicidade a minha.

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, mas principalmente por contribuir 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.

Agradeço também, ao professor Fernando Cunha que me recebeu em seu laboratório na USP/Ribeirão Preto, e ao seu aluno David Cólón que me ajudou com experimentos cruciais para a realização desse trabalho.

Ao professor Klaus Ley que de forma muito atenciosa me orientou durante meu doutorado sanduíche no La Jolla Institute for Immunology, assim como os membros do seu laboratório que me receberam de braços abertos e com os quais aprendi coisas que levarei para a vida.

Agradeço a todos os professores que contribuíram com o empréstimo de reagentes e ferramentas para que esse trabalho fosse concluído, em especial aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia e do Laboratório do óxido nítrico. Da mesma forma, agradeço aos professores do departamento de Farmacologia que de uma maneira ou outra fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento.

Aos professores Gustavo Menezes, Cristina Bonorino, Daniel Fernandes, Flávio Amaral e Alfeu Zanotto que gentilmente se dispuseram a avaliar este trabalho. Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório presentes nessa fase final, mas também aos que hoje não se encontram mais no laboratório, mas que durante esses anos deixaram de ser colegas e passaram a ser grandes amigos. Agradeço a cada um de vocês pelas críticas, discussões e ajudas nos experimentos. Agradeço também por todas as conversas de bar, aniversários, congressos.....enfim, essa caminhada se tornou muito mais leve na presença de vocês. O que o LiDI juntou o mundo não separa!

Agradeço em especial àqueles que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Adara, Filho, Daniel Mendes, Matheus e claro a Flávia, a quem agradeço por todo carinho e dedicação. À todos o meu muito obrigada de coração. À Renata Fleith a quem agradeço pelo apoio fundamental, principalmente nessa fase final do trabalho. Obrigada pelo

carinho sincero e amizade verdadeira.

Às minhas duas pequenas Made e Chica que estiveram ao meu lado durante todas as etapas desse processo e que enchem de amor e transformam os meus dias.

À minha mãe e ao meu pai, pelo exemplo de integridade e dedicação, pelo apoio, pelas palavras de conforto, pelo 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!

ABSTRACT

Neutrophil recruitment has a central role in host response and resolution of inflammation, but if uncontrolled it can lead to severe tissue damage. Due to its harmful effects, neutrophil migration must be tightly regulated to prevent an exacerbated infiltration. The acute phase protein Alpha-1-acid glycoprotein (AGP) has been shown to inhibit some steps of the neutrophil migration process, such as rolling and adhesion *in vivo*, and chemotaxis *in vitro*. However, the specific mechanism by which AGP inhibits the neutrophil migration to the focus of infection has not been fully elucidated yet. Since AGP activity is related to its carbohydrate portion, and the loss of its sialic acid residues implicates its capacity to modulate the immune system, we hypothesized that Siglec (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins)-5 or -9 activation by AGP inhibits the mechanisms related to human neutrophil chemotaxis. Siglecs are a family of inhibitory receptors expressed on neutrophils that bind to sialic acid to down regulate the inflammatory response. In this context, the role of AGP sialylation on human neutrophils activated by fMLP was evaluated after 40 minutes of incubation with protein ranging from 0.1 to 1 mg/ml. In order to evaluate whether AGP sialic acid residues influence on the inhibitory effect, a desialylated AGP (dAGP) (AGP treated with neuraminidase that cleaves sialic acid in α -2,3 - α -2,6- or α -2,8 conformation) was also used. Our results showed that AGP inhibits *in vitro* neutrophil chemotaxis and actin polymerization by a sialic acid-dependent mechanism. In addition, the inhibition of actin polymerization by AGP in response to fMLP was abrogated when neutrophils were incubated with an anti-Siglec-5, but not by an anti-Siglec-9, neutralizing antibody prior to AGP treatment. On the other hand, the neutrophil *E.coli* phagocytosis was not altered by the suppressive effect of AGP in actin polymerization. Siglec receptors are also involved in ROS production and integrin activation, therefore the effects of AGP on these neutrophil responses were also investigated. ROS production was shown to be inhibited by AGP and by its variant without sialic acid. Neutrophils treatment with AGP prior to fMLP stimulation also impaired the integrins activation conformational change and inhibited their inside-out pathway of activation. Taken together, our results demonstrated that AGP inhibits fMLP-mediated neutrophil chemotaxis by impairing actin polymerization and integrin activation. Moreover, the suppressive effect of AGP on actin polymerization relays on the interaction between the protein sialic acid residues and the neutrophil receptor Siglec-5.

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

RESUMO

A migração dos neutrófilos é fundamental para uma resposta inflamatória eficaz, no entanto quando desregulada pode levar a uma infiltração excessiva dessas células nos tecidos resultando em dano. A proteína de fase aguda alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) atua como um regulador da migração dos neutrófilos inibindo diferentes etapas nesse processo como o rolamento e adesão *in vivo* e quimiotaxia *in vitro*. No entanto, os mecanismos celulares pelo qual a AGP inibe a migração dos neutrófilos para os sítios inflamatórios ainda não foram completamente elucidados. Uma vez que muitas das atividades da AGP estão relacionadas a sua porção de carboidratos e a perda dos resíduos de ácido siálico compromete sua capacidade de modulação do sistema imune, nós levantamos a hipótese de que a AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos por meio da ativação de receptores Siglec (*sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*)-5 e/ou de Siglec-9. Siglecs são uma família de receptores inibitórios expressos em neutrófilos que se ligam a ácido siálico, e quando ativados regulam negativamente a resposta inflamatória. Nesse contexto, o impacto da glicosilação da AGP em neutrófilos humanos ativados pelo fMLP foi avaliado após 40 minutos de incubação das células com diferentes concentrações da proteína, variando de 0,1 a 1 mg/ml. Para avaliar se os resíduos de ácido siálico da AGP influenciam no efeito inibitório, a AGP desialilada (tratada com neuraminidase, enzima que cliva o ácido siálico na sua conformação α -2,3 - α -2,6- ou α -2,8) também foi utilizada. Nossos resultados demonstraram que, *in vitro*, a AGP inibe a quimiotaxia e a polimerização de actina de neutrófilos induzida por fMLP, por um mecanismo dependente de seus resíduos de ácido siálico. Além disso, a inibição da polimerização de actina em resposta ao fMLP foi suprimida quando os neutrófilos foram pré-incubados com anticorpos neutralizantes anti-Siglec-5, mas não com anti-Siglec-9. Entretanto, a AGP não inibe o processo de fagocitose induzido por *Escherichia coli*. Os efeitos da AGP sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de integrinas β 2 também foram investigadas. A produção de ROS pelos neutrófilos induzida pelo fMLP ou PMA foi inibida pela AGP sialilada e em concentrações mais elevadas também pela sua variante sem o ácido siálico. Ainda, o tratamento dessas células com AGP, previamente ao estímulo com fMLP, inibiu a mudança conformacional de ativação das integrinas β 2 pela via *inside-out* de ativação. Juntos, esses resultados demonstram que a AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos mediada por fMLP, ao prejudicar a polimerização de actina e ativação das integrinas. Além disso, o efeito supressor da AGP na polimerização de actina ocorre por meio da interação entre os resíduos de ácido siálico da proteína e o receptor Siglec-5 dos neutrófilos.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da cascata de migração de neutrófilos.....	17
Figura 2- Sinalização intracelular ativada durante o reconhecimento do gradiente quimioatrativo.....	23
Figura 3- Ativação de receptores Siglec e sua interação com o ligantes sialilados..	28
Figura 4- Desenho esquemático da estrutura de carboidratos da AGP e a representação do epítipo Sialyl Lewis X.....	35
Figura 5- Fenótipo das células isoladas com gradiente de Percoll®.....	42
Figura 6- Exemplo da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	44
Figura 7- AGP inibe a adesão e o rolamento dos neutrófilos sobre P-selectina FC in vitro.....	56
Figura 8- A AGP se liga à membrana dos neutrófilos de maneira independente de ácido siálico.....	58
Figura 9- AGP inibe a quimiotaxia dos neutrófilos de maneira parcialmente dependente de ácido siálico.....	60
Figura 10- A AGP pode ligar até quatro moléculas de Siglec-5.....	61
Figura 11- Demonstração da interação de Siglec-5 FC com AGP.....	63
Figura 12- AGP não modula a expressão dos receptores de fMLP (FPR1) na membrana de neutrófilos.....	65
Figura 13- A AGP não interfere na mobilização de cálcio induzida pelo fMLP.....	67
Figura 14- AGP inibe a polimerização de actina em neutrófilos estimulados com fMLP.....	69
Figura 15- AGP inibe a polimerização de actina em neutrófilos de forma dependente de ácido siálico.....	71
Figura 16- O tratamento de neutrófilos com o anticorpo neutralizante anti-Siglec-5 reverte a inibição da polimerização de actina induzida pela AGP.....	73
Figura 17- A inibição da polimerização de actina pela AGP não ocorre via Siglec-9.....	74
Figura 18- O tratamento dos neutrófilos com AGP não interfere na sua capacidade de fagocitose de E. coli.....	76
Figura 19- A AGP e a dAGP inibem a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo fMLP.....	78

Figura 20- O pré-tratamento dos neutrófilos com o anticorpo neutralizante anti-Siglec-5 ou -9 não interfere na inibição induzida pela AGP ou pela dAGP.	79
Figura 21- AGP inibe a produção de ROS em neutrófilos primados com LPS e estimulados com PMA.....	80
Figura 22- A AGP inibe a ativação de integrinas β2.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AGP	Alfa-1-glicoproteína ácida
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AM	<i>Acetoxymethyl</i>
AMP	Monofosfato de adenosina
APPs	Proteínas de fase aguda
BSA	Albumina bovina sérica
C5a	Quinto fragmento do complemento ativado
CCR2	<i>Chemokine receptor type 2</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
CXCR	<i>CXC chemokine Receptor</i>
CXCR2	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
DAG	diacilglicerol
dAGP	AGP desialilada
DHE	dihidroetídio
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	erro padrão médio
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FC	Fragmento Cristalizável do Anticorpo
FITC	fluoresceína
fMLP	<i>N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-pnenylalanine</i>
FPL	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FPR	formyl peptide receptors
FSC	<i>forward scatter</i>
GBS	Estreptococo do Grupo B
GDP	<i>disosfato de guanosine</i>
GDT	<i>trifosfato de guanosina</i>
GPCR	receptores acoplados à proteína G
GRK	<i>regulated via G protein-coupled receptor kinases</i>

HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
Hsp70	<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>
Hsp90	<i>90 kilodalton heat shock proteins</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenosa</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	<i>Immune globulin</i>
IgSF	<i>Imunoglobulin superfamily</i>
IIFNs	<i>Interferon do tipo I</i>
IL	<i>Interleucina</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<i>ITAM</i>	<i>tyrosine-based activation motifs</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<i>LAD 1</i>	<i>Leukocyte adhesion deficiency-1</i>
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LFA1	<i>lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	<i>lipopolissacarídeo</i>
LTB4	<i>leucotrieno B4</i>
<i>MAC 1</i>	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	<i>quinase ativadora da MAP quinase</i>
MUC-1	<i>Cancer-specific mucin-1</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD-1/PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1,</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PGN	<i>Peptidoglycan</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PILR	<i>Paired immunoglobulin-like receptor</i>

<i>PIP2</i>	<i>Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate</i>
<i>PIP3</i>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
<i>PKB</i>	<i>Protein kinase B</i>
<i>PKC</i>	<i>Protein kinase C</i>
<i>PLC</i>	<i>Phospholipase C</i>
<i>PMA</i>	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
<i>PSGL-1</i>	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten</i>
<i>RAC</i>	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>RPMI</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>SHIP</i>	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
<i>SHP 1</i>	<i>SH2-containing phosphatase 1</i>
<i>SHP 2</i>	<i>SH2-containing phosphatase 2</i>
<i>Siglecs</i>	<i>Sialic acid binding Ig-like lectins</i>
<i>SSC</i>	<i>Side scatter</i>
<i>SYK</i>	<i>Tyrosine-protein kinase</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-like receptor</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<i>TRIF</i>	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
<i>VCAM</i>	<i>Vascular cell adhesion molecules</i>
<i>VLA 4</i>	<i>Very Late Antigen-4</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	NEUTRÓFILOS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA	14
1.1.1	<i>O processo de migração dos neutrófilos</i>	<i>16</i>
1.1.2	<i>Sinalização intracelular induzida por fMLP.....</i>	<i>21</i>
1.2	LECTINAS DO TIPO I – SIGLECS (SIALIC ACID-BINDING IG SUPER-FAMILY LECTINS)	25
1.3	ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP).....	33
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	40
3.1.1	<i>Amostras de sangue humano e considerações éticas</i>	<i>40</i>
3.1.2	<i>Obtenção de neutrófilos a partir de sangue periférico humano.....</i>	<i>40</i>
3.1.3	<i>Análise fenotípica da população celular obtida na separação por gradiente de Percoll®</i> <i>41</i>	
3.2	CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.2.1	<i>Estratégia e análise dos dados obtidos por citometria de fluxo.....</i>	<i>43</i>
3.3	ROLAMENTO E ADESÃO	44
3.4	ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS	45
3.4.1	<i>Quantificação de endotoxina.....</i>	<i>46</i>
3.5	WESTERN BLOT.....	46
3.6	SDS PAGE COLORAÇÃO COM PRATA.....	47
3.7	ELISA (ENZYME – LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....	48
3.8	ESTUDO DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	48
3.8.1	<i>Citometria de fluxo.....</i>	<i>48</i>
3.8.2	<i>Quimioluminiscência</i>	<i>49</i>
3.9	POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA	50
3.9.1	<i>Imunofluorescência.....</i>	<i>50</i>
3.9.2	<i>Citometria de fluxo.....</i>	<i>51</i>
3.10	ENSAIO DE FAGOCITOSE	51
3.11	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	52
3.11.1	<i>Citometria de fluxo.....</i>	<i>52</i>
3.11.2	<i>Quimioluminescência – Luminol.....</i>	<i>53</i>
3.12	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE INTEGRINAS.....	53
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4	RESULTADOS.....	55

4.1	A AGP INIBE O ROLAMENTO DE NEUTRÓFILOS SOBRE O SUBSTRATO P-SELECTINA	55
4.2	A AGP INTERAGE COM A SUPERFÍCIE DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INDEPENDENTE DA PRESENÇA DE ÁCIDO SIÁLICO EM SUA ESTRUTURA	57
4.3	A AGP INIBE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELO FATOR QUIMIOTÁTICO FMLP	59
4.4	A AGP LIGA-SE AOS RECEPTORES SIGLEC -5	60
4.5	O TRATAMENTO DE NEUTRÓFILOS COM A AGP NÃO MODULA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE FMLP (FPR1)	64
4.6	A MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO DECORRENTE DO ESTÍMULO COM FMLP NÃO É INFLUENCIADA PELO TRATAMENTO COM AGP	66
4.7	NEUTRÓFILOS TRATADOS COM AGP POLIMERIZAM MENOS ACTINA QUANDO ESTIMULADOS COM FMLP	68
4.8	A CAPACIDADE DE FAGOCITOSE DOS NEUTRÓFILOS NÃO É AFETADA PELO TRATAMENTO COM AGP	75
4.9	O TRATAMENTO DE NEUTRÓFILOS COM AGP INIBE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) INDUZIDAS PELO ESTÍMULO COM FMLP	77
4.10	A AGP INIBE A VIA DE ATIVAÇÃO <i>INSIDE-OUT</i> DE INTEGRINAS B ₂	81
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO	101
	BIBLIOGRAFIA	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUTRÓFILOS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico inato frente a um estímulo nocivo, que ocorre de forma ordenada, culminando na eliminação do estímulo inicial, remoção das células necróticas do local e início do reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008).

Ela ocorre por meio da ativação de mediadores inflamatórios e células efectoras. Alguns mediadores promovem a ativação de diferentes populações de células e com isso a liberação de novos mediadores inflamatórios, difundindo e coordenando a resposta (MEDZHITOV, 2008). Normalmente essa resposta é autolimitante e atenuada quando o estímulo inicial é eliminado. No entanto, quando não controlada contribui para a progressão da doença, levando ao desenvolvimento de inflamações crônicas e doenças autoimunes (CIEPIELA e colab., 2015; THIEBLEMONT e colab., 2016).

A progressão da resposta inflamatória está relacionada com a infiltração de diferentes populações de leucócitos no tecido inflamado, o que acontece de forma sequencial. A infiltração dessas células no local é tempo dependente e geralmente, como em um processo inflamatório ocasionado por infecções bacterianas, os neutrófilos são a primeira população de células a migrarem até o foco da inflamação (KAUFMANN, 2008; KUMAR e SHARMA, 2010; MEDZHITOV, 2010; NATHAN, 2006)

Os neutrófilos, por seu potencial destrutivo, estão normalmente restritos à circulação sanguínea e sofrem constante apoptose espontânea. Em condições fisiológicas, os neutrófilos são encontrados no sangue, na medula óssea, no fígado, no baço e em maior quantidade nos pulmões (SIBILLE e MARCHANDISE, 1993). São continuamente produzidos na medula óssea que serve também como um reservatório, de onde essas células, quando necessário, podem ser rapidamente recrutadas e mobilizadas em grande número (SADIK e colab., 2011). Após a sua proliferação na medula, essas células passam por uma diferenciação progressiva e os neutrófilos maduros são então liberados na corrente sanguínea formando o conjunto de células mais abundantes entre os leucócitos circulantes, pois constituem 60-70% da série leucocitária em humanos. São as chamadas células polimorfonucleadas e a sua estimativa de sobrevivência média em humanos *in vivo* é de oito a doze horas (desde que não sejam estimulados) (SHI, 2001). Após esse período, eles entram em apoptose e seus restos celulares são removidos por macrófagos num processo conhecido como eferocitose.

Durante a inflamação, o aumento dos mediadores inflamatórios circulantes, em especial as quimiocinas, colaboram para que os neutrófilos sejam recrutados da corrente sanguínea para o foco inflamatório, onde acumulam-se (NATHAN, 2006; ROSALES, 2018). A infiltração dessas células no foco da inflamação é essencial para a imunidade inata no combate de agentes infecciosos, antígenos nocivos e células neoplásicas. Os neutrófilos também são recrutados em resposta ao dano celular decorrente de lesões, toxinas e distúrbios metabólicos (PITTMAN e KUBES, 2013).

Ao chegar no local da inflamação, são eficientes para conter e erradicar os patógenos invasores tais como bactérias e fungos. Para isso os neutrófilos ativados utilizam diferentes mecanismos de defesa para conter e eliminar o patógeno e manter a integridade do organismo. Dentre esses mecanismos estão a fagocitose, a degranulação e a liberação de tramas extracelulares denominadas de NETS (do inglês *neutrophil extracellular traps*) (BRINKMANN e colab., 2004; NAUSEEF e BORREGAARD, 2014; PHILLIPSON e KUBES, 2011). A ativação desses mecanismos de defesa culmina com a liberação de enzimas proteolíticas e agentes bactericidas decorrentes da degranulação e também, conteúdos nucleares, proteínas e enzimas, como a lactoferrina e a mieloperoxidase e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) (BRINKMANN e colab., 2004; NAUSEEF e BORREGAARD, 2014; PHILLIPSON e KUBES, 2011).

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 e colab., 2010; KOBAYASHI e DELEO, 2009; LEKSTROM-HIMES e GALLIN, 2000; RABSON e colab., 1978; SCHMIDT e colab., 2013).

Após o estímulo ter sido eliminado, a resposta inflamatória precisa ser controlada para evitar o dano tecidual. Essa última etapa é chamada de fase de resolução que é quando ocorre a liberação de mediadores endógenos anti-inflamatórios para restabelecer o ambiente tecidual fisiológico (BUCKLEY e colab., 2013; SERHAN, 2010). Nessa fase, o recrutamento e acúmulo de neutrófilos cessa e os que permanecem no local entram em apoptose ou retornam para os vasos ou para a linfa (SERHAN e SAVILL, 2005). Fisiologicamente a inflamação aguda é seguida da fase de resolução, no entanto se os mecanismos envolvidos nesse controle falharem, a resposta inflamatória é continuada (MCDONALD e colab., 2010; VIOLA e SOEHNLEIN, 2015; WEATHINGTON e colab., 2006).

Em função do seu vasto arsenal de moléculas citotóxicas não seria surpreendente que os neutrófilos estivessem diretamente associados com as patologias decorrentes do dano tecidual

e também com o trauma associado a doenças inflamatórias. Assim, a infiltração em excesso dessas células no tecido é um dos eventos que mais contribui para a disfunção, o dano tecidual e a prorrogação da resposta inflamatória (MCDONALD e colab., 2010; WEATHINGTON e colab., 2006). As moléculas citotóxicas liberadas pelos neutrófilos, em especial as enzimas proteolíticas e a liberação de espécies reativas de oxigênio, não discriminam entre as células do hospedeiro e o agente causador da inflamação, contribuindo assim para a morte celular e a perda da função (SEGAL, 2005). Sua atividade sobre o tecido leva a clivagem da matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*), o que estimula as células do sistema imune levando ao recrutamento de mais neutrófilos e alimentando um feedback de destruição tecidual (WEATHINGTON e colab., 2006). Danos causados pelo acúmulo dessas células ocorrem desde os leitos capilares, onde elas são ativadas e acumulam-se no endotélio vascular, causando oclusão do lúmen, o que impede o aporte de sangue resultando em hipóxia tecidual (ANDRADES e colab., 2011; BROWN e colab., 2006; KESHARI e colab., 2012; MILLS e colab., 2000).

Vários estudos têm demonstrando a diversidade de função dessas células, situando-as como peças importantes no desenvolvimento de doenças crônicas como artrite reumatoide, arteriosclerose e, em especial, de doenças que envolvem o trato respiratório como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma (BARNES, 2007; NÉMETH e MÓCSAI, 2012; SADIK e colab., 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 pela infecção e sua forma mais grave está associada com a disfunção tecidual e a falência de múltiplos órgãos. A ativação sistêmica excessiva e inapropriada dos neutrófilos, em resposta às condições inflamatórias geradas durante a sepse e o choque séptico, permite a infiltração dessas células em órgãos distantes de onde esteja ocorrendo a inflamação, contribuindo ainda mais para a lesão tecidual e a piora do quadro clínico (BROWN e colab., 2006; EPSTEIN e WEISS, 1989).

1.1.1 O processo de migração dos neutrófilos

Para que os neutrófilos cheguem até o local adequado, uma série de eventos mediados por fatores quimiotáticos acontecem de forma sequencial, recrutando essas células e permitindo seu acúmulo no foco da inflamação. O processo de migração é dividido em quatro etapas: a de captura, a de rolamento, a de adesão e a de transmigração, todas elas guiadas e direcionadas pela quimiotaxia (Figura 1) (LEY e colab., 2007).

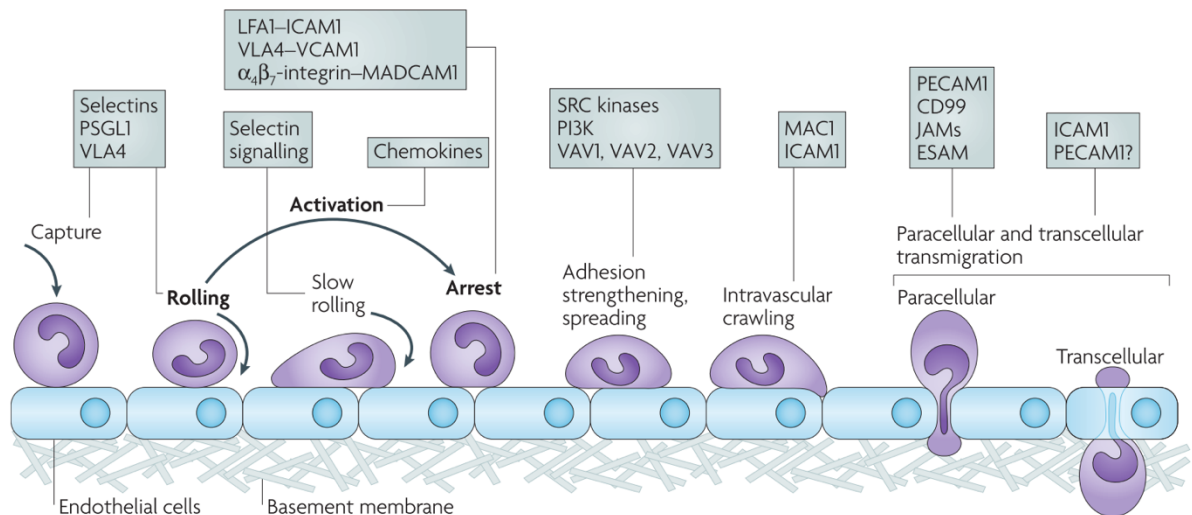


Figura 1- Etapas da cascata de migração de neutrófilos. Captura, rolamento, adesão e transmigração e suas etapas intermediárias. Participação das moléculas de adesão, selectinas e integrinas, e dos mediadores quimiotáticos. Retirado de (LEY e colab., 2007).

Mediadores inflamatórios como o TNF (do inglês *tumor necrosis factor*), a interleucina IL-1 β , a histamina e os leucotrienos são produzidos por células residentes e ativam as células endoteliais. O endotélio também pode ser ativado diretamente pelo patógeno, através do reconhecimento por receptores do tipo PRR (do inglês *Pattern recognition receptor*), ou ainda por produtos intracelulares resultantes do dano tecidual. O endotélio ativado aumenta a permeabilidade vascular, facilitando a passagem dos leucócitos para dentro do tecido, também aumenta rapidamente a expressão de moléculas de adesão (E-selectinas e ICAM-1) previamente produzidas e armazenadas (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; SPRINGER, 1994).

A vasodilatação diminui a velocidade do fluxo sanguíneo, o que facilita a interação dos leucócitos presentes no centro dos vasos com a parede do endotélio vascular, dando início à fase de captura (HUTTENLOCHER, A e colab., 1995; PHILLIPSON e KUBES, 2011). Diante dos estímulos inflamatórios, os neutrófilos são ativados e sofrem modificações na expressão de duas principais classes de moléculas de adesão: as selectinas e as integrinas (ZARBOCK e LEY, 2009).

As etapas iniciais da migração são mediadas por uma ligação rápida e reversível entre as selectinas e seus ligantes. São três os tipos de selectinas: duas expressas pelas células do endotélio, as P-selectinas e as E-selectinas; e o terceiro tipo, as L-selectinas expressas pelos

leucócitos. Essas selectinas interagem com ligantes glicosilados expressos tanto nos leucócitos quanto no endotélio, como por exemplo a PSGL1 (do inglês *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; MCEVER e CUMMINGS, 1997; SPRINGER, 1994). Em geral, as selectinas estão localizadas nas extremidades das vilosidades da membrana das células e, após a captura, a força que o fluxo sanguíneo exerce sobre a parede do endotélio, chamada de *sheer stress*, faz com que essas ligações (selectina-ligante), de baixa afinidade, sejam constantemente desfeitas e refeitas iniciando a fase de rolamento. Esse processo permite que as células deslizem ao longo do endotélio vascular, reduzindo a velocidade com que elas percorrem o vaso, caracterizando a etapa de rolamento (BEGANDT e colab., 2017; LAWRENCE e colab., 1997; RAMACHANDRAN e colab., 2004; SUNDD e colab., 2012, 2013).

A etapa de rolamento facilita a interação do neutrófilo com as quimiocinas depositadas na superfície do endotélio. Conforme as células rolam e se aproximam do foco inflamatório, o padrão de expressão de moléculas de adesão muda e as integrinas assumem esse processo. De maneira mais detalhada, quando os leucócitos entram em contato com as quimiocinas depositadas na superfície do endotélio, as L-selectinas são clivadas através da ação de enzimas e a célula passa a expressar moléculas de alta afinidade conhecidas como integrinas LFA1 e MAC1. Ao mesmo tempo, as células endoteliais aumentam a expressão de ligantes para essas integrinas (ICAM1 e VCAM1).

O rolamento desacelera a célula e está associado a uma ativação parcial das integrinas. Durante esse processo, a ativação de receptores quimiotáticos, adjacentes a essas integrinas, ativa uma via intracelular que induz a formação de clusters e uma mudança na conformação dessas moléculas de adesão ativando-as em uma reação chamada de sinalização *inside-out* (de dentro para fora) (ABRAM e LOWELL, 2009; LARSON e SPRINGER, 1990; SAMPATH e colab., 1998)

A afinidade da integrina por seu ligante depende dessa sinalização *inside-out*, que induz uma mudança na sua conformação, passando de fechadas (dobradas) de baixa afinidade para um estado semiestendido (afinidade intermediária), até um estado aberto (estendido) de alta afinidade que leva à abertura do sítio de ligação (ARNAOUT e colab., 2005). A sinalização intracelular que leva à ativação de integrinas a partir da ativação de um receptor quimiotático ainda não está completamente elucidada, no entanto se sabe que ela é dependente de duas moléculas talin-1 e kinlin-3 que conectam as integrinas com os filamentos de F-actina e as proteínas que se ligam a eles. Ativadas, as integrinas apresentam uma maior afinidade por seus ligantes e estabelecem uma adesão firme entre a célula e o endotélio. Essa interação é estável,

o que permite a aderência firme à parede do vaso na etapa da migração denominada de adesão (ABRAM e LOWELL, 2009; JUNG e colab., 1998).

Aderidos, os neutrófilos estão prontos para iniciar a etapa final do processo de transmigração. A transmigração dos leucócitos pode acontecer através de duas rotas. Normalmente, as células rastejam sob o endotélio vascular à procura de um local adequado para transmigração por entre as células epiteliais (rota paracelular), no entanto uma minoria pode realizar a transmigração através da via transcelular, onde a célula epitelial envolve o neutrófilo através de projeções semelhantes à microvilosidades, formando uma espécie de cúpula (LEY e colab., 2007; FENG e colab., 1998; PHILLIPSON e colab., 2006). Nessa etapa, os leucócitos atravessam a barreira de células endoteliais com a ajuda das integrinas LFA-1 e MAC-1, VLA4, VCAM1 e da molécula PECAM1 (do inglês *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), que é expressa tanto nos leucócitos quanto nas junções intracelulares das células endoteliais. Depois de passar pelo revestimento endotelial, os neutrófilos atravessam a membrana basal. Para isso, eles liberam enzimas proteolíticas, tais como a elastase, que permitem a quebra do colágeno, facilitando a migração (HÄGER e colab., 2010; JANEWAY, 2001; WILLIAMS, Marcie R e colab., 2011).

Após ultrapassadas essas barreiras, os neutrófilos chegam ao tecido extravascular onde são guiados até o foco da inflamação por um gradiente de moléculas quimioatrativas (BORREGAARD, 2010; MCDONALD e KUBES, 2011). Os agentes quimiotáticos produzidos no sítio da inflamação ligam-se a proteoglicanos na matriz extracelular, formando um gradiente crescente de mediadores responsável por guiar e direcionar as células imunes (BORREGAARD, 2010; LEY e colab., 2007; MCDONALD e KUBES, 2011). Essa quimiotaxia é responsável por recrutar uma grande quantidade de neutrófilos ainda nos estágios iniciais da resposta inflamatória (JANEWAY, 2001; WILLIAMS, Marcie R e colab., 2011). Nela, cada neutrófilo individualmente sente o gradiente quimiotático, polariza e migra em direção a esse atrativo (JANEWAY, 2001; WILLIAMS, Marcie R e colab., 2011).

Receptores quimioatrativos além de direcionar a migração e induzirem a polimerização de actina, eles ativam integrinas, que mudam sua conformação aumentando a aderência das células ao substrato (MENARD e SNYDERMAN, 1993). A locomoção dos leucócitos pela matriz extravascular depende do contato contínuo da célula com o substrato formado pelas integrinas da família β -2, expressas na sua porção (LAUFFENBURGER e HORWITZ, 1996; LOIKE e colab., 1999; MÓCSAI e colab., 2015). Pacientes com deficiência genética em uma das subunidades dessa integrina (LAD-I) apresentam neutrófilos incapazes de migrar ou de fazerem a quimiotaxia (CROWLEY e colab., 1980).

Os neutrófilos são atraídos por uma série de quimiocinas, como a IL-8, e por outras moléculas quimioatrativas, incluindo fragmentos da cascata do complemento (C5a, C3a), mediadores lipídicos (LTB₄, PAF), mediadores exógenos produzidos pela degradação do patógeno como o N formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e também liberados pelas mitocôndrias no caso de dano celular (CARP, 1982; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; MCDONALD e colab., 2010).

No ambiente inflamatório, uma rede distinta de sinais quimiotáticos é formada direcionando diferentes subtipos celulares até o sítio inflamatório. As longas distâncias que os neutrófilos devem percorrer até chegarem no foco da inflamação requerem que essas células imunes consigam distinguir a direção de qual quimiocina seguir e, conseqüentemente, de qual sinal quimiotático ela deve se afastar.

O estudo de Heit e colaboradores demonstrou que existe prevalência de um gradiente quimiotático sobre o outro, formando uma hierarquia entre as diferentes moléculas quimioatrativas que guiam os neutrófilos. As moléculas que se originam nos primeiros estágios da resposta inflamatória, como o fMLP ou o componente da cascata do complemento C5a foram denominadas de mediadores de alvo final, enquanto que as liberadas nos estágios intermediários, como as moléculas IL-8 e LTB₄, são denominadas de mediadores intermediários. Esse estudo demonstrou que quando expostas ao mesmo tempo, aos dois mediadores quimiotáticos (IL-8 e fMLP), existe uma “preferência” das células em seguir os mediadores finais ao invés dos estímulos intermediários (HEIT e colab., 2002).

Os neutrófilos são capazes de detectar pequenas mudanças na concentração do quimioatrativo no microambiente inflamatório e direcionar sua resposta (SONG e colab., 2006). Independente do atrativo, as células têm que sentir o gradiente, traduzir e transformar essas informações em respostas que irão ativar seu citoesqueleto, polarizar a célula e finalmente impulsioná-la para frente. A ligação do quimioatrativo ao seu receptor ativa uma cascata de sinalização intracelular que comanda todas essas etapas (JIN e colab., 2000; NISHIO e colab., 2007). A cascata de transdução do sinal intracelular em geral é composta por uma rede complexa de proteínas e segundos mensageiros responsáveis por amplificar a resposta do receptor e traduzi-las em ações celulares que, juntas, dão suporte a uma resposta inflamatória eficiente, precisa e coordenada.

1.1.2 Sinalização intracelular induzida por fMLP

Os receptores FPR reconhecem e ligam o fMLP. São mantidos em grande número em vesículas secretórias dos quais são mobilizados rapidamente após a ativação da célula. Os receptores que pertencem a essa classe são: o FPR1, FPR2 e FPR3. O fMLP liga-se a todos eles, mas com uma maior afinidade ao FPR1. O FPR2 tem baixa afinidade pelo fMLP, e o FPR3 ainda pouco compreendido, não é expresso em neutrófilos e é relativamente insensível ao fMLP (CHEN, Keqiang e colab., 2017; DORWARD e colab., 2015).

Além de induzir o movimento celular, a ativação de um mesmo receptor quimiotático pode induzir diferentes vias de sinalização que resultam em funções variadas da célula. Essas funções podem estar envolvidas tanto com a propagação da resposta imune (liberação de quimiocinas e citocinas), quanto com a ativação do seus mecanismos de defesa tais quais degranulação, fagocitose e produção de ROS (PETRI e SANZ, 2018).

Os receptores FPR1, assim como a grande maioria dos quimioatrativos sinalizam por meio da ligação a receptores acoplados à proteína G_i ou G_q (GPCR do inglês *G Protein Coupled Receptor*), expressos na superfície do neutrófilo. Geralmente a ativação desse receptor é transitória em virtude da dessensibilização e endocitose. A dessensibilização ocorre através da ativação de β arrestinas que ao mesmo tempo favorecem a dissociação das duas subunidades da proteína G (subunidade α e $\beta\gamma$) e também marcam esse receptor para a endocitose. A dessensibilização apropriada do GPCR é fundamental para o reconhecimento do gradiente e para a polarização da célula, responsáveis por manter a direção da migração (ALI, Hydar e colab., 1999; BEDNAR e colab., 2014; CHEN, Keqiang e colab., 2017).

Sua cascata de sinalização ocorre em uma janela de no máximo dois a três minutos, em que as proteínas intracelulares se redistribuem de maneira a polarizar a célula e iniciar o movimento migratório. Tendo em vista que a distribuição do FPR1 pela membrana celular durante a quimiotaxia não é polarizada, o que de fato polariza a célula é a organização, a conformação e a disposição espacial e temporal das proteínas intracelulares.

No caso dos GPCRs, a ligação do quimioatrativo ao seu receptor específico estabiliza-o em sua conformação ativa, o que favorece a troca de GDP por GTP e com isso a dissociação das subunidades da proteína G em α e $\beta\gamma$. Cada uma das subunidades livres difunde-se localmente pela membrana e sinaliza de forma independente. Comum a quase todas as células, quando a subunidade α dissocia, ela se liga a adenilato ciclase, no caso das G inibitórias ($G\alpha_i$), inibindo sua atividade e a produção de AMP cíclico. No entanto, a ativação da maioria das vias

envolvidas na polarização, ativação do citoesqueleto e quimiotaxia ocorre através da sinalização induzida pela subunidade $G\beta\gamma$ (JIN e colab., 2000; NISHIO e colab., 2007). Essa polarização celular é dependente da produção de uma série de segundos mensageiros que se acumulam em locais específicos do citoplasma.

Os neutrófilos quando polarizados apresentam duas estruturas bem definidas em suas extremidades. A porção frontal é chamada de *leading edge* e é onde são formados os pseudópodes (Figura 2). Os pseudópodes são protusões na membrana frontal da célula formados pela polimerização de filamentos de F-actina que direcionam a célula para frente. A porção posterior é chamada de uropod e, assim como nas porções laterais da célula, é onde ocorre a interação actina-miosina que, ao contrair impulsiona a célula para frente. A polarização da porção frontal é estabilizada quando a subunidade $\beta\gamma$ concentra-se nessa região da célula, ativando a PI3K (do inglês *Phosphatidylinositol 3-kinase*), que é a enzima responsável pela fosforilação de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), transformando-o em PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). A PI3K age como a principal reguladora do rearranjo do citoesqueleto e estresse oxidativo. O PIP3 acumula-se na porção frontal da célula e ativa a cinase B, PKB (do inglês *protein kinase B*), também conhecida como AKT (do inglês *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) (FERGUSON e colab., 2007; FUNAMOTO e colab., 2002; LI, Zhong e colab., 2000; NISHIO e colab., 2007).

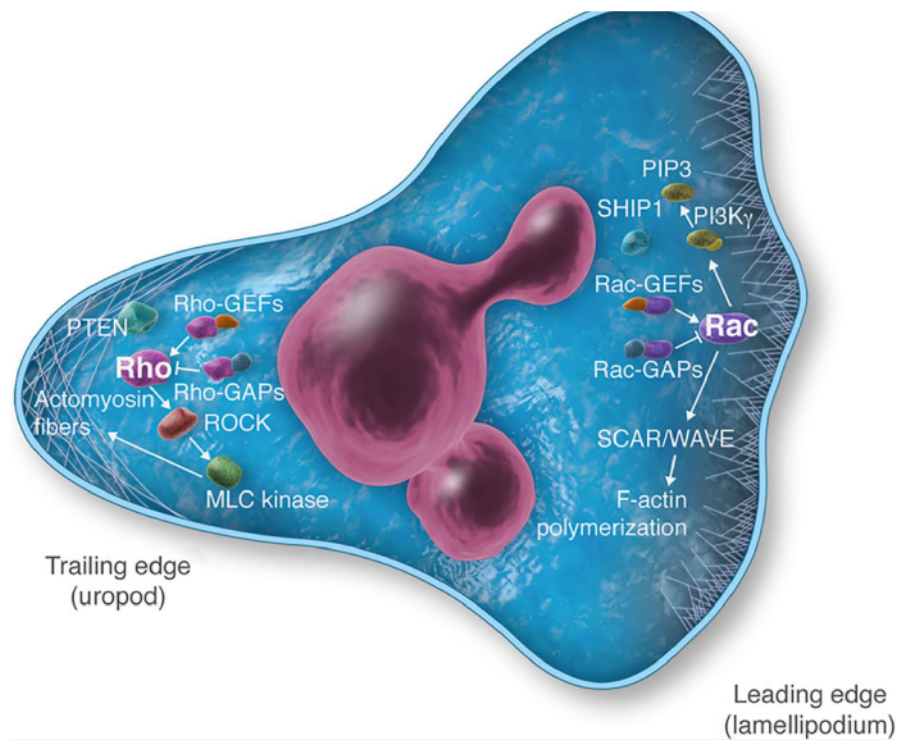


Figura 2- Sinalização intracelular ativada durante o reconhecimento do gradiente quimioatrativo. Distribuição das proteínas envolvidas na cascata de sinalização ativada por receptores quimiotáticos no leading edge e no uropod após polarização da célula. Retirado de (MOCSAI e colab., 2015).

A formação e acúmulo de PIP3 e a dissociação da proteína G também levam à ativação da proteína Rac GEFs que estimula a Rac GTPase e conduz o complexo SCAR/WAVE a iniciar a formação dos núcleos de F-actina (*actin nucleation*) (CAMPELLONE e WELCH, 2010). Dentro da família da Rac GTPase a Rac2 tem papel dominante, e entre as Rac GEF foi demonstrado que a DOCK2 participa ativamente. A deficiência de outra GTPase, a Cdc42, também está implicada na geração de PIP3 na *leading edge* e sua ausência também interfere na quimiotaxia (LI, Zhong e colab., 2003).

Ao mesmo tempo no uropod, a sinalização através de PIP3 e Rac é contrabalançada e controlada pela ação de fosfatases e da Rho GTPase. As fosfatases PTEN (do inglês *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*) e SHIP-1, responsáveis pela conversão do PIP3 em PIP2, se acumulam na região posterior da célula, limitando o seu movimento em direção ao quimioatrativo. Além disso, estudos indicam que a SHIP1 participa de forma mais ativa que a PTEN na defosforilação do PIP3. Neutrófilos murinos deficientes em

SHIP1 apresentaram um maior movimento quimiotático *in vivo* e *in vitro*, enquanto os neutrófilos deficientes em PTEN migram normalmente (MONDAL e colab., 2012).

Paralelamente, a subunidade G $\beta\gamma$ também ativa a fosfolipase C (PLC). Sua ativação induz a produção de IP3 e DAG a partir de PIP2 que induzem a liberação de cálcio intracelular, principalmente do retículo endoplasmático. Esses eventos, juntamente com a ativação da proteína cinase C (PKC) são essenciais para a degranulação, fagocitose e para a produção de superóxidos através da ativação da NADPH oxidase (O'FLAHERTY e colab., 1990). Ainda que, assim como a fagocitose e a degranulação, a quimiotaxia seja dependente da polimerização de actina, achados descrevem que a polimerização de F-actina, especificamente durante a migração, é independente da liberação de cálcio intracelular e da ativação da PLC (FRANCIS e HEINRICH, 2018).

Diversos trabalhos relatam que na ausência de PI3K, os neutrófilos conseguem migrar frente ao fMLP, em uma polarização independente do acúmulo de PIP3. 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, sugerindo que possam existir outras cascatas de sinalização envolvidas na quimiotaxia dessas células (ANDREW e INSALL, 2007; CHODNIEWICZ e ZHELEV, 2003; FUNAMOTO e colab., 2002; HIRSCH e colab., 2000).

Estudos têm demonstrando que a principal via de sinalização a ser ativada depende diretamente do tipo de fator quimiotático envolvido (ELKS e colab., 2011; HEIT e colab., 2002). Atrativos de alvo final, como o fMLP, sinalizam preferencialmente através de uma via independente de PI3K/AKT – a via do p38 (BILLADEAU, 2008; HEIT e colab., 2008). Aparentemente, uma via não compete com a outra, e a ativação da via de p38 estaria mais envolvida em priorizar a direção de determinado quimioatrativo do que na capacidade da migração em si. Sugere-se que a via p38 quando predominante inibe a via principal PI3k através da realocização de PTEN e consequente inibição da formação de PIP3, mesmo na presença de mediadores intermediários. Quando as células são tratadas com um inibidor da p38, elas apresentam uma falha na realocização dessa fosfatase e com isso a célula não consegue mais discriminar entre as diferentes classes de atrativos, migrando em direção ao quimioatrativo que ela encontrar primeiro. Em um ambiente inflamatório complexo, a ativação da PTEN funcionaria como um discriminador, priorizando a resposta a diferentes sinais quimioatrativos e impedindo que os neutrófilos se locomovessem em resposta a quimioatrativos intermediários (HEIT e colab., 2008).

Além da dessensibilização homóloga do receptor e interrupção do sinal intracelular, o controle de ativação dessas vias ocorre através da ação de receptores inibitórios. A ativação de receptores inibitórios na resposta inflamatória, bem como a presença das proteínas e lipídeos anti-inflamatórios são responsáveis por conter e manter sob controle a resposta celular e seus efeitos colaterais. A interação de receptores inibitórios com seus ligantes desencadeia uma série de eventos intracelulares que interferem na sinalização que está sendo ativada, impedindo seus efeitos finais e assim regulando a ativação das células imunes. Até onde se sabe, são poucos os receptores inibitórios expressos pelos neutrófilos, dentre eles os melhores caracterizados são os Siglecs (do inglês *Sialic acid-binding Ig super-family lectins*).

1.2 LECTINAS DO TIPO I – SIGLECS (SIALIC ACID-BINDING IG SUPER-FAMILY LECTINS)

Os Siglec são receptores transmembranares descritos recentemente em humanos que pertencem à família das lectinas do tipo I (MACAULEY e colab., 2014).

As lectinas do tipo I são membros da superfamília das imunoglobulinas IgSF (do inglês *immunoglobulin superfamily*) a qual abrange proteínas que sejam capazes de reconhecer carboidratos através de um domínio do tipo imunoglobulina (*Ig-like*) (VARKI e ANGATA, 2006a). Estão envolvidas em diversas funções biológicas, como na interação célula-célula, no tráfego de proteínas e no sistema imunológico através do reconhecimento de patógenos, processamento de antígenos, ativação imunológica e imunossupressão.

Atualmente, são conhecidos 16 tipos de Siglecs em humanos, os quais são subdivididos em dois subtipos classificados de acordo com sua sequência de aminoácidos e com suas características bioquímicas (BERG JM, TYMOCZKO JL, 2002; VARKI e colab., 2009).

Os membros do primeiro grupo mantiveram sua estrutura conservada durante a evolução, sendo ele constituído pelas Siglecs -1, -2, -4, e -15 (e suas moléculas correspondentes em camundongos). O segundo grupo surgiu da pressão seletiva decorrente da necessidade de adaptação frente a microrganismos invasores (CAO e CROCKER, 2011; CROCKER e ZHANG, 2002). Os membros do segundo grupo apresentam sua estrutura em constante evolução e são identificadas como homólogas ao CD33 (CD33-related Siglecs) (ANGATA, Takashi e colab., 2004). Nos primatas esse grupo abrange o Siglec -3 (também conhecido como CD33) e os Siglecs -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13 -14 e -16. Dentre as CD33r existe uma variação em sequência e número entre as espécies animais. Para os roedores são descritos, até o momento, 9 tipos de Siglec, dentre esses 5 são homólogos ao CD33. Sua nomenclatura

diverge da humana e é representada por letras (Siglecs - E, F, G e H) visto a dificuldade de atribuir corretamente seus ortólogos em humanos (CROCKER e colab., 2007; ZHOU e colab., 2018). Para algumas desses Siglecs, como o Siglec-5 e o -7, até o momento não foi descrito nenhum homólogo em camundongos. Por mais que não seja possível identificar claramente os Siglecs CD33r ortólogos entre humanos e murinos, alguns receptores são reconhecidos como homólogos funcionais, como por exemplo Siglec-9 e Siglec-E.

Com exceção dos Siglecs-4/MAG (do inglês *Myelin associated glycoprotein*), que também são expressos por algumas células do sistema nervoso, a expressão dessa família de receptores transmembranares é praticamente restrita às células do sistema imunológico. Ainda, essas lectinas apresentam um padrão de expressão específico que depende do tipo celular. O Siglec-8, por exemplo, é predominantemente expresso em eosinófilos, enquanto que, o Siglec-9 está amplamente distribuído e presente em monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células B e células natural *killer* (BOCHNER, 2009; VARKI e ANGATA, 2006b; VON GUNTEN e BOCHNER, 2008) (GUPTA, 2012). Além disso, uma única célula pode expressar mais de um Siglec, como é o caso dos neutrófilos onde os Siglecs do tipo -5 e -9 são os mais expressos em sua superfície, porém eles também expressam a Siglec -14 (ANGATA, T e VARKI, 2000; ANGATA, Takashi e colab., 2006; CONNOLLY e colab., 2002; CORNISH e colab., 1998; ERICKSON-MILLER e FREEMAN e HOPSON e D'ALESSIO e colab., 2003; ZHANG e colab., 2000).

A resposta inflamatória induz uma regulação transcricional dos Siglecs alterando o padrão de expressão dessas moléculas. Em neutrófilos estimulados com TNF- α , LPS ou fMLP foi observado um aumento considerável na expressão de Siglec-5 e -9. Porém, em neutrófilos estimulados com IL-1 β , IL-3, IL-4 e IFN- γ , não foram observadas mudanças na expressão desses receptores, sugerindo que a sua modulação pode estar relacionada com o ambiente inflamatório em que essa célula se encontra (ERICKSON-MILLER e FREEMAN e HOPSON e D'ALESSIO e colab., 2003; ZENG e colab., 2017). Apesar de aparentemente redundantes, devido à sua alta similaridade, não existem evidências de uma redundância significativa com relação à sua função. Aparentemente cada Siglec reconhece um perfil específico de ácido siálico ao qual se liga. As lectinas em geral reconhecem e se ligam a carboidratos que pertencem a uma cadeia e estão ligados a uma matriz que pode ser lipídica ou proteica (VARKI e colab., 2009). Todas as lectinas são caracterizadas por possuírem um ou mais domínios específicos responsáveis pelo reconhecimento e ligação de um determinado tipo de carboidrato. No caso das Siglecs, essas reconhecem glicoconjugados contendo o ácido siálico

e constituem a maior família de moléculas presentes em vertebrados capazes de reconhecer esse tipo de carboidrato (SCHAUER, 2009).

O ácido siálico é um monossacarídeo de nove carbonos com carga negativa que normalmente se localiza na porção terminal do glicoconjugado e pode estar ancorado à superfície da célula, ou solúvel no meio extracelular. (BRINKMAN-VAN DER LINDEN e VARKI, 2000) Sua ligação com o carboidrato subjacente ocorre através de ligações glicosídicas $\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,8$ as quais determinam sua conformação (ZHOU e colab., 2018). Cada Siglec reconhece o ácido siálico em posições diversas e específicas. Cada Siglec apresenta uma seletividade de ligação ao ácido siálico. A Siglec-5, por exemplo, liga com afinidade semelhante com o ácido siálico tanto na posição $\alpha 2,3$ quanto na posição $\alpha 2,6$, porém a interação é mais fraca com o ácido siálico na posição $\alpha 2,8$ (BLIXT e colab., 2003; ZHURAVLEVA e colab., 2008).

A interação desse receptor 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 ligação em *cis* (carboidrato e Siglec na mesma célula) pode mascarar o sítio de ligação dessa lectina, dificultando que as ligações do tipo *trans* aconteçam (Figura 3) (CROCKER e VARKI, 2001a).

Estudos indicam que a maior parte das Siglecs presentes em células em seu estado não ativado apresenta-se mascarada pelas ligações *cis* (PAULSON e colab., 2012). Dessa forma, para que ocorra a ligação *trans* entre os receptores Siglecs com seus ligantes é necessária a quebra da ligação *cis*, e isso ocorre de diferentes formas.

A primeira consiste em uma mudança que interfere na interação do ácido siálico, presente na posição *cis*, com as Siglecs expondo seu sítio de ligação e assim facilitando a interação desse receptor com outros ligantes sialilados (Figura 3B) (CROCKER, 2005; HELD e MARIUZZA, 2011; RAZI e VARKI, 1999). Essa exposição pode ocorrer com uma mudança no padrão de glicosilação da membrana celular através da ativação da célula por estímulos específicos, ou pela ação de sialidases, também conhecidas por neuraminidases, que são enzimas que clivam o ácido siálico. A outra forma ocorre quando a interação *cis* é deslocada pela presença de uma alta densidade de carboidratos sialilados presente em glicoproteínas ou glicolipídeos ou ácido siálico de alta afinidade presentes na célula adjacente (CROCKER e colab., 2007; CROCKER e VARKI, 2001b; CROSS e WRIGHT, 1991; GUTHRIDGE e colab., 1994; RAZI e VARKI, 1999).

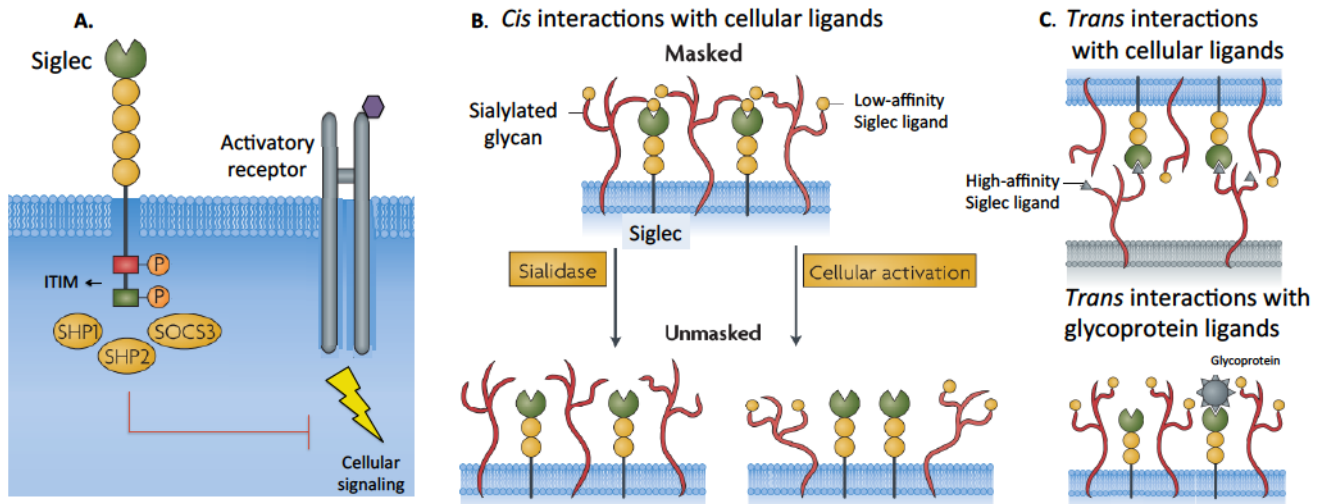


Figura 3- Ativação de receptores Siglec e sua interação com o ligantes sialilados. (A) Demonstração da ativação a via intracelular inibitória ativada pelas Siglecs. **(B)** Interação das Siglecs com o ácido siálico presente na mesma membrana em que são expressos em uma ligação cis, ou o em trans onde o ligante sialilado encontra-se em células adjacentes ou mesmo em patógenos. Adaptado de (CROCKER e colab., 2007).

A interação entre as Siglecs e o ácido siálico ocorre através do domínio extracelular amino-terminal *V-set immunoglobulin* que se localiza na extremidade do receptor, seguido por um domínio *C-set immunoglobulin like* e uma porção transmembranar ligada a um domínio intracelular inibitório.

Esse domínio inibitório denominado de ITIM (do inglês *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) está presente na maioria das Siglecs, atuando como regulador da homeostase do sistema imune (CROCKER e colab., 2007; PILLAI e colab., 2012). Quando ativado, o domínio ITIM recruta fosfatases do tipo *Src homology 2 domain containing protein tyrosine* (SHP-1 e 2) que podem interferir diretamente na cascata de sinalização induzida por outro receptor, provocando sua inibição (AVRIL e colab., 2004).

De forma contrária, 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 (do inglês *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 cinases da família das SYK (do inglês *Spleen tyrosine kinase*). Essas, por sua vez, estão envolvidas tanto com a inibição quanto com a ativação celular (AVRIL e

colab., 2004; SHIN e colab., 2010; VARKI e ANGATA, 2006a; WILLIAMS, Alan F. e BARCLAY, 1988).

Por meio de suas vias de sinalização intracelular inibitórias, os receptores com domínios ITIM funcionam como correceptores endocíticos capazes de controlar a ativação das células mantendo a sua homeostase, tanto em situações fisiológicas quanto durante a resposta inflamatória excessiva. Estudos demonstraram que a maioria dos Siglecs tem um papel em controlar a resposta imunológica inata e adaptativa, modular as interações celulares, o seu crescimento e sua sobrevivência, inibindo a proliferação ou induzindo apoptose (CARLIN e colab., 2009; GUNTEN e colab., 2005). A indução de morte celular reduz o número de neutrófilos no local, o que sugere que as Siglecs possam ser importantes no controle do acúmulo celular, um dos fatores responsáveis pelo dano tecidual.

Fazendo uso dessa natureza reguladora das Siglecs em manter a homeostase, alguns patógenos e também células cancerígenas evadem o sistema imune. Foi demonstrando que os tumores podem remodelar a sua glicoestrutura, favorecendo um ambiente imunossupressivo mediado pelas Siglecs. Achados recentes mostraram que a proteína glicosilada MUC-1 (do inglês *cancer-specific mucin-1*) interage com Siglec-9 e induz os macrófagos a polarizar para o fenótipo *tumor-associated macrophage-like phenotypes* que em células cancerígenas são conhecidos por sua habilidade de modular a expressão de PD-1/PD-L1 (do inglês *Programmed death-ligand 1*), resultando numa supressão da atividade das células T e conseqüentemente do *clearance* do tumor (BEATSON e colab., 2016).

Para modular as funções das células através do reconhecimento por Siglecs, alguns patógenos como, por exemplo, vírus envelopados, bactérias e parasitas revestem sua estrutura com ácido siálico para mimetizar as moléculas do hospedeiro. Por mais que muitas bactérias não produzam ácido siálico, alguns patógenos evoluíram a habilidade de produzir esse carboidrato por eles mesmos ou de se apropriarem dele do organismo do hospedeiro por meio da ação de transialidases. A ideia é que esses patógenos ao se revestirem com esse carboidrato sejam reconhecidos pelo organismo como próprios, contribuindo assim para um aumento na sua patogenicidade e sobrevivência no organismo (CARLIN e colab., 2007; CHANG e colab., 2014; NIZET e colab., 2009).

Além disso, o reconhecimento seletivo de resíduos de ácido siálico presentes na cápsula polissacarídica de *Streptococcus* do grupo B (GBS, do inglês *Group B Streptococcus*) pelos Siglecs-E de neutrófilos, suprime a ação microbicida da célula, diminuindo a produção de NETs e espécies reativas de oxigênio (CARLIN e colab., 2009). Em modelos de infecção intranasal por essa bactéria, camundongos Siglec-E^{-/-} apresentaram um perfil inflamatório mais

exacerbado, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias e um aumento da fagocitose. Em modelos sistêmicos de infecção por GBS, a diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 também foi observada, o que leva o organismo do hospedeiro a uma resposta inflamatória mais exacerbada. De fato, a ausência de Siglec-E acelerou a mortalidade desses animais, o que foi atribuído a um aumento excessivo de citocinas pró-inflamatórias no meio (CHANG e colab., 2014).

A manutenção do estado inativo dos neutrófilos na corrente sanguínea, recentemente foi atribuída à ativação de Siglec-9. O estudo demonstrou que a glicoforina A presente na estrutura das hemácias liga-se ao receptor Siglec-9 e mantém os neutrófilos em seu estado de repouso. Observações *ex vivo* e *in vitro* demonstraram que a retirada dos neutrófilos de uma solução contendo hemácias é suficiente para induzir um estado ativo dessas células. A comparação na produção de ROS entre amostras de neutrófilos isolados e amostras de sangue total demonstrou uma maior produção dessas espécies reativas nas amostras que não continham eritrócitos, sem suprimir a eficiência de *killing* dessas células. O *killing* foi prejudicado, contudo não foi completamente suprimido (LIZCANO e colab., 2017).

Diversos estudos têm sugerido que as Siglecs são responsáveis por conter a resposta imune excessiva, ativada por receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *toll-like receptors*). Em resposta à ativação de TLR4 por LPS ou TLR2 por PGN, o aumento da expressão de Siglec-5 e Siglec-9 em linhagem celular de macrófagos (RAW264.7) mostrou ser capaz de inibir a produção de TNF- α e aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (ANDO e colab., 2008). Estudos recentes, demonstraram que a ativação desses receptores inibe a via de sinalização de TLR mediada por TRIF, resultando na diminuição da produção de interferon do tipo I (IFN-I) (ANDO e colab., 2008; BOYD e colab., 2009; PAULSON e colab., 2012). Por outro lado, o reconhecimento de PAMPs e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos Celulares) por TLR induz a expressão de neuraminidases as quais removem as ligações *cis* que o ácido siálico faz com as Siglec. A eliminação dessa interação desativa o Siglec favorecendo uma resposta imune mais potente frente a uma endotoxemia (CHEN, Guo-Yun e BROWN e WU e KHEDRI e YU e CHEN e VAN DE VLEKKERT e colab., 2014).

Segundo Varki et al 2015 (SCHWARZ e colab., 2015), a expansão do número de Siglecs no genoma humano ao longo da evolução, indica que os Siglecs da família CD33r vêm coevoluindo com o aumento da sobrevida em mamíferos. O autor defende a ideia de que essas Siglecs contêm o dano tecidual, e assim promovem a longevidade. Em estudos de sobrevivência em camundongos, animais deficientes para Siglec-E apresentaram sinais de envelhecimento acelerado e uma redução significativa na sobrevida em relação aos camundongos selvagens.

Nesses animais Siglec-E^{-/-} foi detectado um aumento do dano oxidativo celular a nível sistêmico uma vez que seus neutrófilos estavam mais inclinados a produzir estresse oxidativo quando estimulados, pois secretavam mais ROS por célula (SCHWARZ e colab., 2015).

Nessa mesma linha, um outro estudo demonstrou que a Siglec-G interage com CD24 e regula negativamente a resposta imune induzida por proteínas liberadas durante o dano celular, mas não interfere na resposta desse receptor iniciada por patógenos (CHEN, Guo-Yun e colab., 2009, 2011). O trabalho propôs que o eixo CD24-Siglec-G (murinos) ou Siglec-10 (humanos) seria uma das maneiras de a célula discriminar entre a ativação induzida por PAMPs ou por DAMPs. Isso ocorreria porque esse eixo seria capaz de suprimir seletivamente, quando necessário, a resposta aos DAMPs e regulando uma possível ativação celular excessiva, causando mais danos. Foi proposto que os DAMPs como Hsp70, Hsp90 ou HMGB1, ao se ligarem no CD24 e no Siglec-G formam um complexo que aproxima os receptores. A presença de carboidratos sialilados na estrutura de CD24 ativa a Siglec-G que, por intermédio da proteína tirosina fosfatase SHP1, suprime a via ativada por esse DAMP. A disfunção dessa via está associada à etiologia de doenças autoimunes (CHEN, Guo-Yun e colab., 2009).

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 e colab., 2009; GUNTEN e colab., 2005). A indução de morte celular reduz o número de neutrófilos no local, o que 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. Além disso, Spence e colaboradores demonstraram, em modelos murinos de sepse, um aumento nas taxas de sobrevivência quando esses animais foram tratados com nanopartículas revestidas com ácido siálico, agonista de Siglec-E (SPENCE e colab., 2015). Em ensaios utilizando monócitos e macrófagos humanos *in vitro* ou em um modelo de lesão pulmonar, essas partículas bloquearam a produção de mediadores inflamatórios induzidos pelo LPS e aumentaram a oligomerização desse receptor em macrófagos, facilitando sua ativação.

Outro trabalho avaliou a relação entre os Siglecs e a migração de neutrófilos e demonstrou que a Siglec-E regula de forma seletiva o recrutamento dos neutrófilos para o pulmão, interferindo na adesão dos neutrófilos com o endotélio dos capilares pulmonares. Utilizando um modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos, o estudo demonstrou que os neutrófilos de animais Siglec-E^{-/-} migravam mais para o tecido pulmonar de forma dependente de integrinas β 2. O influxo exagerado dessas células foi revertido com a adição de anticorpos de bloqueio contra as integrinas- β 2 demonstrando a relação entre Siglecs e inibição

da ativação de integrinas (MCMILLAN e colab., 2013). Nesse mesmo estudo, a via de sinalização *outside-in* ativada por integrinas $\beta 2$ apresentava um perfil de fosforilação das proteínas cinases SYK e p38 MAPK mais elevado nos neutrófilos de animais nocautes do que nos animais selvagens. *In vitro*, no ensaio de adesão, foi observada a colocalização desses Siglecs com o ponto de interação da célula com o fibrinogênio, via integrina MAC-1. Além disso, os neutrófilos que aderiram expressavam mais Siglec-E e o tratamento prévio do fibrinogênio com uma sialidase intensificou a sinalização da integrina via p38 MPAK em neutrófilos selvagens, mas não nos nocautes.

Paradoxalmente, esse mesmo estudo mostrou que tanto *in vivo* quanto *in vitro* a ativação de Siglec-E promove a produção de espécies reativas de oxigênio, induzidas pela ativação das integrinas- $\beta 2$, em neutrófilos. Isso indica que a sinalização *outside-in* mediada por MAC-1 pode ser modulada em ambas as direções, positiva e negativa (MCMILLAN e colab., 2013).

Ainda nesse sentido, um estudo recente demonstrou que a proteína sinalizadora de dano celular, a HSP70, também se liga tanto em Siglec-5 quanto em 14 e desencadeia duas respostas opostas na modulação do sistema imune. Utilizando uma linhagem celular de monócitos (THP-1) super expressando Siglec-14, que compartilha 99% de semelhança com a Siglec-5, diferindo dessa pela presença da molécula ITAM, o estímulo com HSP70 induziu a produção de TNF- α e IL-8. No entanto, quando as células THP1 transfectadas com um plasmídeo de expressão de Siglec-5, foram tratadas com a proteína HSP70, foi observada uma diminuição na produção de TNF- α e IL-8 induzida pelo estímulo com LPS (ALI, Syed Raza e colab., 2014; ANGATA, Takashi e colab., 2006; FONG e colab., 2015).

Outro estudo com a já citada GBS revelou que a proteína beta da GBS liga-se com a mesma afinidade tanto em quimeras de Siglec-5 FC quanto em Siglec-14 FC, mas promove efeitos opostos. A ativação de Siglec-5 em neutrófilos resultou em um maior tempo de sobrevivência da bactéria no meio, pois a ativação desses receptores prejudica a fagocitose, o estresse oxidativo e a liberação de NETs. Mais tarde com o descobrimento do seu *paired receptor* Siglec-14, descobriu-se que a ativação de Siglec-14 contrabalançava os efeitos de -5 promovendo um aumento da resposta inflamatória através da ativação da via p38 MAPK e AKT. Com a conclusão de outros estudos, verificou-se que os receptores Siglec-5 e Siglec-14 evoluíram como receptores pareados, em decorrência da pressão evolutiva dessas moléculas na resposta a patógenos que subvertem a resposta imune através da sinalização por Siglecs (ALI, Syed Raza e colab., 2014).

Essa ideia foi confirmada na pesquisa com neutrófilos de pacientes com DPOC. Essa pesquisa identificou, em alguns deles, um polimorfismo no alelo (*null allele*) do gene que

codifica o receptor Siglec-14. Pacientes com DPOC que são homozigotos para esse alelo de Siglec-14 apresentaram mais complicações da doença do que pacientes homozigotos para o alelo que codifica a Siglec-5, visto que essa última responderia pelo controle exacerbado da ativação da célula e conseqüentemente do dano tecidual pulmonar. Ao mesmo tempo que indivíduos que só expressam a -5 são mais suscetíveis à infecção por GBS (ANGATA, Takashi e colab., 2013).

Como descrito, os possíveis ligantes para as Siglecs são glicanos contendo ácido siálico presentes em glicoproteínas e glicolipídios. Para Siglecs pertencentes ao grupo de estrutura altamente conservado existem evidências concretas de ligantes sialilados específicos, porém existem poucos ligantes caracterizados. Os ligantes para as CD33r Siglecs, dos quais as Siglec-5 e 9 fazem parte, ainda não foram caracterizados.

Salvo os patógenos sialilados, os efeitos descritos anteriormente via Siglec-5/14 ocorreram independente de ácido siálico, ocorreram através da interação com o domínio proteico (B6N) do receptor (FONG e colab., 2015). Em 2007, Gunnarsson e colaboradores sugeriram um possível ligante endógeno para a Siglec-5 dependente de ácido siálico. Através de estudos de mobilização de cálcio intracelular, eles observaram uma interação dependente do ácido siálico com uma proteína chamada de alfa-1-glicoproteína ácida (GUNNARSSON e colab., 2007)

1.3 ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

Durante a resposta inflamatória, vários componentes endógenos, de atuação local e sistêmica são liberados e limitam a amplitude da resposta. Durante as fases iniciais da inflamação, em resposta à liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6, algumas proteínas são secretadas pelo fígado na corrente sanguínea (GAULDIE e colab., 1987). A incidência dessas citocinas sobre as células hepáticas aumenta ou diminui a produção e liberação de determinadas proteínas, chamadas de proteínas de fase aguda. (GABAY e KUSHNER, 1999; JANEWAY, 2001; GAULDIE e colab., 1987). São diversas as funções descritas dessas proteínas, no entanto algumas delas apresentam atividades imunossupressoras bem caracterizadas, como é o caso da AGP.

Sintetizada principalmente por hepatócitos, embora também por neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos, é uma das proteínas mais abundantes no plasma, representando 1% de todas as proteínas plasmáticas. Durante o processo inflamatório a sua concentração no plasma aumenta, atingindo valores que vão de 0,5 g/L em indivíduos saudáveis

até 3 g/L em condições inflamatórias, atingindo seu pico máximo após 48 horas do início da inflamação e perdurando por um período entre 120 e 144 horas (FOURNIER e colab., 2000).

Também conhecida como orosomucóide, a AGP foi isolada em 1950 por Karl Schmid e Richard J. Winzler. Sua estrutura consiste em uma cadeia única de 183 aminoácidos e duas variações da proteína, que se diferenciam em 22 aminoácidos. São detectadas no soro: AGP-1 (AGP-A) e AGP-2 (AGP-B/B'). Altamente glicosilada, apresenta um peso molecular entre 41-47 KDa, sendo 45% desse peso associado à presença de diferentes tipos de carboidratos, dos quais 12% são do tipo ácido siálico (SMITH e colab., 1950; TAMURA e colab., 1981). O ácido siálico encontra-se na porção terminal dessa cadeia de carboidratos comumente ligado à galactose nas posições α 2-3 ou α 2-6. A glicosilação ocorre através da ligação com o nitrogênio do aminoácido asparagina (*N-glycans*), localizado nas posições 15, 28, 54, 75 e 85 (SCHMID e colab., 1973; SCHÖNFELD e colab., 2008).

No processo de glicosilação, estruturas bi-, tri- e quaternárias de cadeias de oligossacarídeos podem ser incorporadas à proteína, o que contribui para sua diversidade estrutural. Essas combinações podem gerar até 10^5 glicofomas diferentes dessa proteína, porém apenas 12-20 glicofomas dessa proteína foram identificadas no soro (SHIYAN e BOVIN, 1997). As cadeias de carboidratos interferem diretamente na dinâmica estrutural da proteína e mudanças na glicosilação podem influenciar na conformação terciária da proteína e conseqüentemente seu sítio de interação com a célula (PUKHALSKY e colab., 1998; SHIYAN e BOVIN, 1997; CECILIANI e POCACQUA, 2007). Além disso, o processo inflamatório altera a composição estrutural e o rearranjo dos carboidratos da AGP, e o padrão de glicosilação formado está diretamente relacionado com a condição fisiopatológica do indivíduo. As modificações mais frequentes envolvem o ácido siálico e a fucose, resultando na formação de epítomos de Sialyl Lewis X (DE GRAAF e colab., 1993; HIGAI e colab., 2003; LEVANDER e colab., 2009; MACKIEWICZ e MACKIEWICZ, 1995; SHIYAN e BOVIN, 1997).

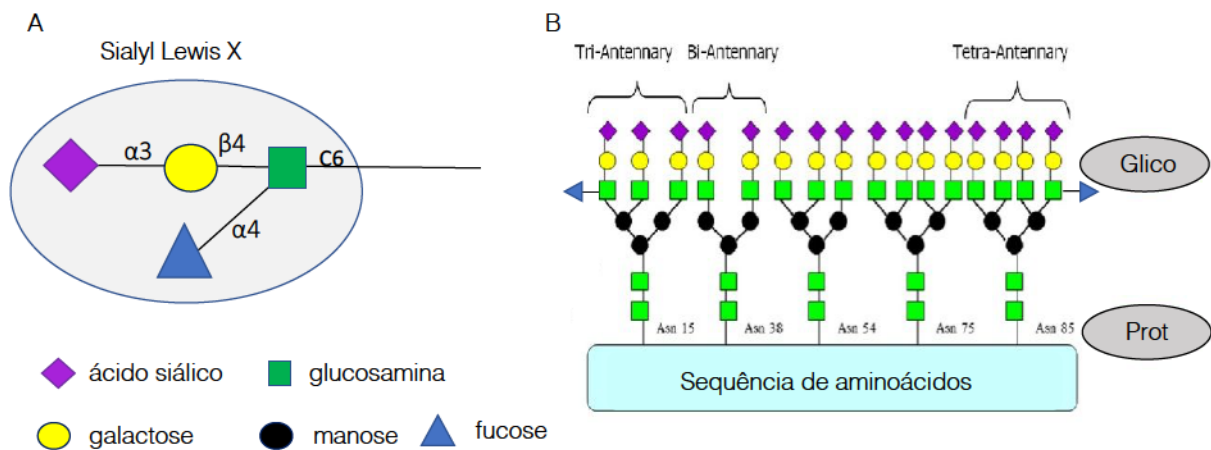


Figura 4- Desenho esquemático da estrutura de carboidratos da AGP e a representação do epítipo Sialyl Lewis X. (A) Epítipos de Sialyl Lewis X são formados pela estrutura presença dos carboidratos N-acetilgalactosamina, fucose, galactose e ácido siálico estruturados de forma específica: Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-)-R. (B) Padrão de glicosilação, mostrando as estruturas bi-, tri- e quaternárias da cadeias de oligossacarídeos que contribui para a formação de diferentes padrões de glicosilação. Adaptado de (SMITH e colab., 2012)

As funções da AGP mais descritas na literatura estão relacionadas com o fato de ela ligar-se a compostos exógenos, como as drogas básicas e neutras e a compostos endógenos, como hormônios e fatores de ativação plaquetária. No entanto, como membro da família das lipocalinas e da subfamília das imunocalinas, as quais apresentam características imunomodulatórias conhecidas, a maioria dos estudos apontam para um papel imunomodulatório e anti-inflamatório da AGP.

Já foram descritas algumas atividades da AGP capazes de influenciar a resposta do sistema imunológico. Ao interagir com a superfície de linfócitos, ela inibe a resposta proliferativa da célula induzida por fitohemaglutinina (CHIU e colab., 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-1 β e TNF e inibir a apoptose (BOUTTEN e colab., 1992; COSTELLO e colab., 1979; TILG e colab., 1993; CECILIANI e colab., 2007; VAN MOLLE e colab., 1997). Em hemácias a AGP induz uma mudança na conformação dessas células dependente da ativação da via Rho/Rho *Kinase* (GUNNARSSON e colab., 2009).

Em neutrófilos bovinos, ela induz a apoptose e inibe a exocitose espontânea de grânulos secundários. Seus efeitos sobre os mecanismos de defesa dos neutrófilos também foram observados em ensaios de fagocitose, no entanto seus resultados são controversos. Utilizando

neutrófilos bovinos, um estudo demonstrou que ela inibe a fagocitose e o *killing* de *Escherichia coli* opsonizada, mas não inibe a fagocitose de *Stafilococcus aureus* (LECCHI e colab., 2013) (RINALDI e colab., 2008). De maneira contrária, em humanos, ela inibe a fagocitose de *Stafilococcus aureus*, porém seu efeito foi atribuído a uma ligação com a bactéria impedindo a sua opsonização e não a uma influência direta sobre a célula (VAN OSS e colab., 1974). Outro estudo, ainda, demonstrou que uma variação da AGP com menos ácido siálico suprime a taxa de fagocitose em neutrófilos felinos, mas sua variável normal não (ROSSI e colab., 2013).

Com relação à modulação da produção de espécies reativas de oxigênio, a literatura é menos refutável quanto à sua capacidade em suprimir a geração de superóxido induzida por PMA e fMLP em neutrófilos humanos (MIRANDA-RIBERA e colab., 2010; STAKAUSKAS e colab., 2005). No entanto, as opiniões são divergentes quanto ao ROS produzido em decorrência ao estímulo com *zymosan* opsonizado (GUNNARSSON e colab., 2010; STAKAUSKAS e colab., 2005; VASSON, Marie Paule e colab., 1994).

Além disso, ela também gera uma inibição transitória da agregação de neutrófilos (COSTELLO e colab., 1984; DIRIENZO e colab., 1987). Neutrófilos estimulados com fMLP demonstraram 70% menos agregação quando incubados com 2 mg/ml de AGP. Essa inibição da agregação ocorre de forma concentração dependente, e diminui para 12% quando os resíduos de galactose são retirados de sua estrutura. Esse mesmo perfil inibitório também foi observado em células onde a agregação foi estimulada com PMA e *zymosan* opsonizados, no entanto a diferença observada entre a AGP íntegra e a AGP sem galactose foi menor (90-100% - AGP e 60-80% AGP sem galactose) (COSTELLO e colab., 1984).

O papel da AGP também foi evidenciado em ensaio de adesão induzida por LPS (agonista de TLR-4) ou por BLP (agonista de TLR-2) (LAINÉ e colab., 1990b). Nesse ensaio, os neutrófilos que foram tratados com 0,1 mg/ml de AGP aderiram menos ao substrato gelatinoso quando ativados com LPS. No entanto, não foi observada diferença quando essas células eram estimuladas com o BLP, indicando efeitos divergentes dependendo da via de sinalização iniciada. A via de ativação induzida por esses receptores também foi avaliada e a fosforilação das proteínas envolvidas, como p38, JNK e ERK, estava diminuída no grupo contendo AGP e estimulado com LPS, mas não no estimulado com BLP. De maneira oposta, esse mesmo trabalho mostrou que o tratamento com AGP sem a presença de estímulo aumentou o número de células aderidas por campo analisado assim como induziu a ativação da via das MAP cinases, aumentando a fosforilação de p38, JNK e ERK (SUMANTH e colab., 2019). Colaborando com esses resultados Komori et al também demonstraram um aumento da fosforilação de NF- κ B em

macrófagos incubadas com 0,05 mg/ml de AGP e uma diminuição na fosforilação de MEK1/2 e p38 quando as células eram posteriormente estimuladas com TNF (KOMORI e colab., 2012).

Em humanos, durante uma resposta inflamatória sistêmica, como a que ocorre na sepse, o aumento dessa proteína de fase aguda contribui para o prognóstico negativo da doença. No momento da internação, os pacientes que não sobreviveram à sepse apresentaram uma concentração mais elevada de AGP no soro, do que os pacientes que sobreviveram (HSIAO e colab., 2019). Ainda, Cunha e colaboradores (2007) encontraram altas concentrações de AGP no soro de pacientes com sepse ($1,58 \pm 0,2$ mg/ml em pacientes sépticos; $0,55 \pm 0,04$ mg/ml em indivíduos controle) e demonstraram, ainda, que tanto a proteína isolada dos pacientes sépticos quanto a amostra de proteína comercial, em administração intravenosa, contribuem para a inibição da migração dos neutrófilos em modelo de sepse CLP (do inglês *cecal ligation and puncture*). Por outro lado, um estudo relatou que pacientes sépticos com uma maior concentração dessa proteína no soro sobrevivem com mais frequência ao choque séptico em comparação com os pacientes com níveis séricos dentro da normalidade (XIAO e colab., 2015).

Assim como na sepse, os neutrófilos isolados de camundongos diabéticos migram menos até o foco da infecção. Os neutrófilos de animais com diabetes, quando submetidos a um modelo de sepse, apresentaram uma capacidade de rolamento, adesão e quimiotaxia reduzida em comparação com os animais sem diabetes. Essa diferença na migração foi correlacionada positivamente com uma concentração mais elevada de AGP no soro dos animais diabéticos nesse modelo. Ainda, a administração de 50 µg/camundongo de AGP trinta minutos antes da indução da sepse reduziu a expressão de CXCR2 e impediu a chegada dos neutrófilos ao local da inflamação em animais não diabéticos ou diabéticos tratados com insulina (SPILLER e colab., 2012).

Estudos de migração celular demonstram que a AGP inibe *in vivo* a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina de maneira dose-dependente. As análises por microscopia intravital demonstraram sua inibição sobre as etapas de rolamento e de adesão na microcirculação mesentérica de ratos tratados com a proteína i.v. trinta minutos antes da análise (MESTRINER e colab., 2007). Nesse estudo, o tratamento com um inibidor da iNOS ou o uso de animais iNOS^{-/-} aboliu o efeito inibitório da AGP. *In vitro* ela inibe a quimiotaxia de neutrófilos humanos induzida por fMLP e IL-8 sem afetar a migração randômica.

Os primeiros relatos das atividades imunomodulatórias da AGP sobre os neutrófilos datam mais de cinquenta anos, no entanto ainda pouco se sabe sobre o mecanismo de ação.

Mais precisamente, são poucas as evidências concretas de receptores nessas células capazes de reconhecer a proteína e induzir uma resposta intracelular.

Já se sabe que os carboidratos presentes na AGP são responsáveis por algumas das ações modulatórias da proteína. O ácido siálico, em especial, além de compor 12 % dos carboidratos da proteína, encontra-se na porção terminal da cadeia de carboidratos, o que facilita a sua ligação com receptores ou ligantes solúveis. Além disso, proteínas que passaram pelo processo de desialilação (retirada de ácido siálico), perderam sua ação inibitória sobre a agregação plaquetária estimulada por ADP (COSTELLO e colab., 1979). A participação do ácido siálico também foi demonstrada no estudo já citado de mobilização de cálcio intracelular. Nesse estudo a AGP induz um aumento imediato de cálcio citosólico em neutrófilos primados com o anticorpo anti L-selectina, esse aumento foi atribuído ao ácido siálico da sua estrutura e a sua ligação com Siglec-5 (GUNNARSSON e colab., 2007).

Sendo o ácido siálico o ligante natural para os receptores Siglecs, estudos sugerem que a interação entre essa proteína e os neutrófilos esteja ocorra por meio dessa lectina de membrana. 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, por meio da ativação de receptores inibitórios. Receptores inibitórios como as Siglecs, seriam, então, capazes de interferir na cascata de sinalização ativada por receptores quimiotáticos.

Juntando estas evidências, a hipótese do nosso trabalho é que a Alfa-1-glicoproteína ácida inibe a quimiotaxia dos neutrófilos através da ativação de receptores do tipo Siglec-5 e/ou 9.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos pelos quais a Alfa-1-glicoproteína ácida inibe a quimiotaxia de neutrófilos humanos e o envolvimento da ativação de Siglec-5 e/ou Siglec-9 nesse processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a influência do carboidrato ácido siálico da AGP na quimiotaxia dos neutrófilos.
- II. Determinar a interação entre a proteína AGP e Siglecs.
- III. Verificar os efeitos da AGP na mobilização de cálcio intracelular induzida por fMLP em neutrófilos.
- IV. Investigar a ação da AGP sobre a polimerização de actina em neutrófilos estimulados com fMLP.
- V. Investigar a participação do ácido siálico da AGP e o envolvimento das Siglec-5 e -9 na inibição da polimerização de actina.
- VI. Examinar o efeito da AGP sobre a capacidade de fagocitose de *E. coli* dos neutrófilos.
- VII. Avaliar a influência do ácido siálico da AGP na inibição da produção de ROS em neutrófilos estimulados com fMLP e PMA.
- VIII. Verificar quais seriam os efeitos da AGP sobre a ativação de integrinas em neutrófilos estimulados pelo fMLP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

3.1.1 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 desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE: 82815718.2.0000.0121). Os voluntários recrutados para doação de sangue foram alunos do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, aos quais foram informados os objetivos do estudo, metodologia utilizada e, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada a coleta. O sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo K₃EDTA (Labor Import, Brasil).

3.1.2 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:

Percoll[®] 72% - 7,2 ml de Percoll[®] + 2,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,8 ml de solução de Hanks 10x

Percoll[®] 63% - 6,3 ml de Percoll[®] + 3,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,7 ml de solução de Hanks 10x

Percoll[®] 54% - 5,4 ml de Percoll[®] + 4,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,6 ml de solução de Hanks 10x

Percoll[®] 45% - 4,5 ml de Percoll[®] + 5,0 ml de solução de Hanks 1x + 0,7 ml de solução de Hanks 10x

Na sequência, aproximadamente 10 ml de sangue venoso humano foram coletados em tubos a vácuo contendo K₃EDTA (Labor Import, 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 gravidade. Para isso, os tubos foram centrifugados (Centrifuga Eppendorf 300TM) por 30 minutos a uma rotação de 650 x g com 2 m/s^2 de aceleração e desaceleração, na temperatura de 22°C.

Após a centrifugação, ocorreu a formação de dois halos. O primeiro, localizado na parte superior do tubo onde se concentram as células mononucleadas; e o segundo, na parte inferior do tubo onde estão concentrados 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 15ml.

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 e colocada em repouso por 7 minutos. Finalizado esse período, as células foram centrifugadas por 7 minutos a uma velocidade de rotação de 450 x g sem aceleração e desaceleração (0 m/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 fração V (Sigma-Aldrich).

Para determinação do número e da porcentagem de neutrófilos e células contaminantes, a análise foi feita no contador hematológico ABX Micro 60 (Horiba ABX SAS, França). A contagem de células foi confirmada na Câmara de Neubauer na qual também foi avaliada sua viabilidade com auxílio do corante de exclusão azul de Tripán 1%. Somente as células viáveis foram consideradas e sua concentração ajustada (células/ml) conforme a necessidade de cada ensaio. Apenas as amostras com pureza acima de 85% de neutrófilos e viabilidade acima de 90% foram utilizadas.

3.1.3 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 3.2. Nesse ensaio, 1×10^6 células foram marcadas com os seguintes anticorpos humanos:

anti-CD11b (1:2000, clone G10F5 BD Biosciences) e anti-CD66b (1:2000, clone G10F5 BD Biosciences). Um total de 50.000 eventos foram adquiridos no equipamento FACSverse (BD FACSVerse™, BD Biosciences, USA).

O controle do fenótipo da população de neutrófilos isolados demonstrou que aproximadamente 96% do total apresentaram fluorescência positiva para ambos os marcadores, como mostra a figura 5. Cruzando as variáveis: tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC), no gráfico representado nessa figura, pode-se observar essas características da população duplo positiva. Uma vez estabelecido por citometria o fenótipo das células isoladas, para os experimentos subsequentes, a determinação do fenótipo das células foi feita utilizando o contador hematológico ABX® Micro 60 (Horiba ABX SAS, França), e somente amostras com mais de 90% de pureza foram utilizadas.

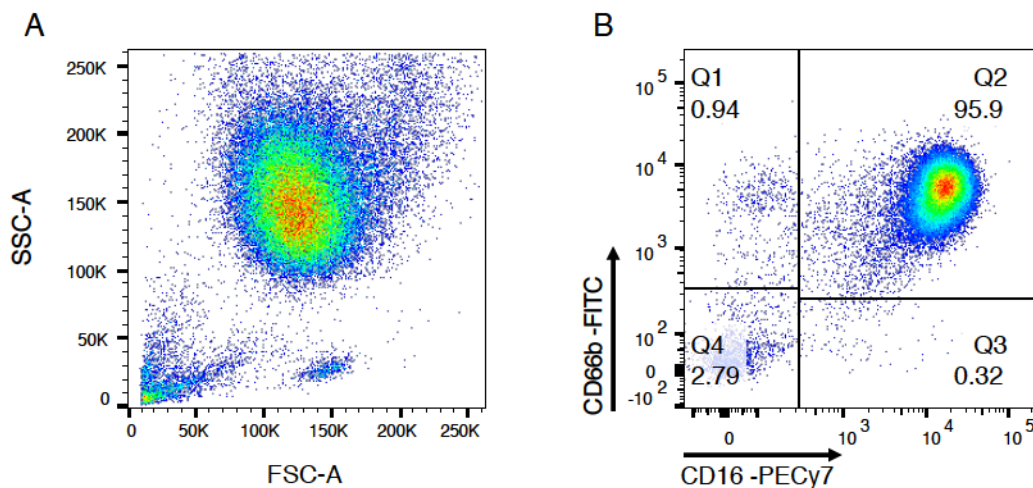


Figura 5- Fenótipo das células isoladas com gradiente de Percoll®. Células isoladas do sangue periférico humano por gradiente de densidade (Percoll®) foram marcadas com os anticorpos anti-CD11b - FITC e anti-CD66 - PE e analisadas em citômetro de fluxo. Os gráficos de pontos são representativos de 3 experimentos realizados em 6 amostras de doadores distintos. **(A)** Características de tamanho (SSC-A) e granulosidade (FSC-A) da população duplo positiva. **(B)** Porcentagem do número de eventos, em um total de 50.000 eventos adquiridos.

3.2 CITOMETRIA DE FLUXO

Para os resultados obtidos através de citometria de fluxo, como protocolo geral, os neutrófilos foram isolados conforme citado anteriormente e após o tratamento, para a troca de meio, as células foram submetidas à centrifugação com rotação de 450 x g, 4°C por 5 minutos.

O *pellet* formado foi então lavado através da adição de 1 mL de tampão FACS (PBS +1% albumina bovina) e novamente centrifugado (condições citadas anteriormente).

Para evitar ligação inespecífica (falso positivo), após esse processo, os receptores FcγR presentes nas células foram bloqueados com o reagente Human BD Fc Block™ (CD 16/CD 32, clone 2.4G2, BD Biosciences, USA) na diluição 1:100 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 FACS.

Em seguida, essas células foram ressuspensas em 200 µl desse mesmo tampão e analisadas em equipamento BD FACSVerser™ com três lasers (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.

Para os ensaios que analisaram o influxo de cálcio ou a ativação de integrinas, ao final do protocolo, as células foram ressuspensas em 200 µl de tampão DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline - 14040, Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) contendo cálcio e magnésio, e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA). Os dados adquiridos foram analisados em *software* Flowjo 10.4® (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

3.2.1 Estratégia e análise dos dados obtidos por citometria de fluxo

A análise dos dados obtidos por citometria partiu de uma mesma estratégia de *gate*. A dispersão lateral (SSC-A, *side scatter*) e frontal (FSC-A, *foward scatter*) de luz permitiu delimitar os eventos com base nas características de tamanho e granulosidade que correspondem aos granulócitos. Com isso, foram eliminadas possíveis células mortas localizadas no canto inferior esquerdo do gráfico. Na sequência, foram eliminadas as células duplas que passaram no equipamento, utilizando os parâmetros correspondentes ao FSC-H (H de altura) *versus* o FSC-A (A de área). O subgrupo formado foi então delimitado de modo que os eventos que ficassem fora de um ângulo de aproximadamente 45°, fossem excluídos. Os eventos duplos foram delimitados a partir da desproporção entre os parâmetros que localiza as células fora desse ângulo. Após, foram retiradas as células com autofluorescência. Para isso, foi escolhido um canal negativo, com comprimento de onda que não correspondesse a nenhum evento positivo referente aos fluorocromos utilizados. Em alguns experimentos, ainda, foram delimitadas apenas as células positivas para CD66b (marcador de granulócitos). Por fim, as

análises foram realizadas com o *software* Flowjo 10.4® (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA) de acordo com cada experimento, e a definição do gate para eventos positivos foi estabelecida de acordo com as células sem marcação.

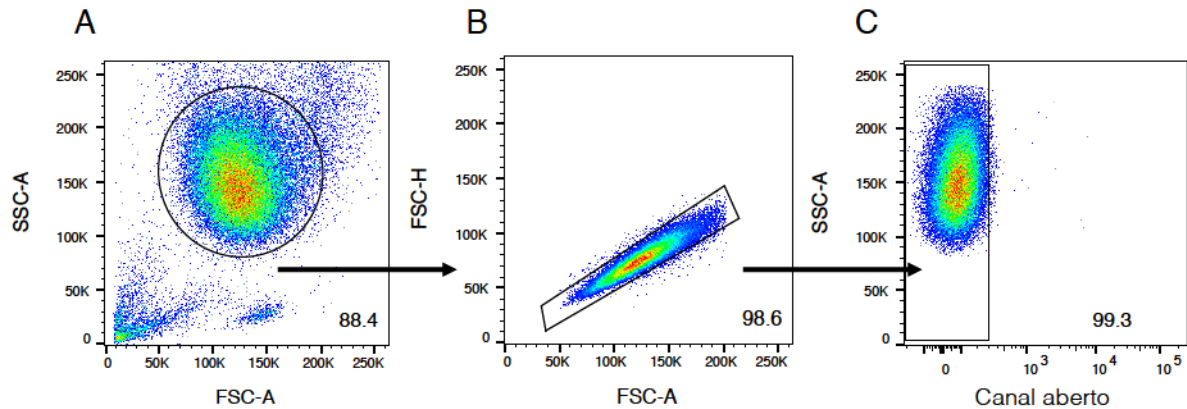


Figura 6- Exemplo da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo. (A) características de complexidade/granulosidade determinando a população de granulócitos, **(B)** exclusão de eventos duplos, **(C)** eliminação da eventos autofluorescentes.

3.3 ROLAMENTO E ADESÃO

Neutrófilos isolados (1×10^6 células/mL) foram tratados, ou não, com AGP 1mg/mL por 40 min em meio RPMI. Em seguida as células foram centrifugadas (400 xg 5 minutos, T.A.), ressuspensas em HBSS (sem cálcio e sem magnésio) submetidas ao ensaio de rolamento conforme previamente descrito (ABADIER e colab., 2015). Para tal, uma câmara microfluidica Ibidi μ -Slide® I Luer 0.2 (Ibidi, Martinsried, Germany) foi revestida com 50 μ l de hP-selectina FC 2 μ g/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) em PBS por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após, essa câmara foi lavada por duas vezes com 100 μ l de PBS (sem cálcio ou magnésio) para remover o excesso de hP-selectina FC. Essa câmara foi então bloqueada com caseína 1% (Blocker™ Casein in PBS - Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) por 30 min em temperatura ambiente. Seu excesso foi removido, após a incubação, com PBS 100 μ l por duas vezes. Depois de pronto esse dispositivo, foram conectados tubos de silicone à sua entrada e saída. Após a câmara ser revestida, os neutrófilos foram ressuspensos em 50 μ l de HBSS (sem cálcio e sem magnésio). O tubo de saída foi conectado a uma bomba de seringa (PHD 4400 Hpsi Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts) e todo o aparato foi montado sobre um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M® (Zeiss, Feldbach, Switzerland). As células foram então perfundidas pelo tubo de entrada. Para que as células

cobrissem a câmara toda, foi aplicado um fluxo de 1 dyn/cm^2 (0.1 Pa) por 1 min. Em seguida, iniciou-se a aquisição das imagens em campo claro com objetiva de 20x. Foi, então, aplicado sobre a amostra um *shear stress* de 3 dyn/cm^2 (0.3 Pa) e as imagens adquiridas por 5 minutos. As imagens foram analisadas no *software* FIJI 2.0 (NIH, Bethesda, Maryland, U.S.) e o número de células que rolaram ou aderiram foi quantificado rastreando as células manualmente durante 2 minutos a partir do início do shear stress de 3 dyn/cm^2 .

3.4 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 $5 \mu\text{m}$ 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 $26,8 \mu\text{l}$ do quimioatrativo fMLP (conforme especificações do fabricante) 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 fração V (Sigma-Aldrich). 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, $50 \mu\text{l}$ da suspensão de células previamente ajustadas para uma concentração de $1 \times 10^6 \text{ cél/ml}$ 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 CO_2 .

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 (Laborelin 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 min e 30 seg, 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.

3.4.1 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 (do inglês *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 0,5 mg/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.

3.5 WESTERN BLOT

De modo geral, para as análises feitas por *western blot* foi utilizado 1 µg das proteínas em estudo, as quais foram ressuspensas em tampão de corrida 1X e desnaturadas por 5 minutos a 95°C. Em seguida à desnaturação, as amostras foram aplicadas no gel SDS-PAGE (10%) e submetidas à eletroforese – 100v por 1h e 30min. Após a eletroforese, essas amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, New York, 2014) durante 2 horas, para isso foi utilizado o módulo de transferência molhado XCell II™ Blot Module 25V/100mA (Life Technologies Corporation, USA), conforme especificações do fabricante. Ao final da transferência, para análise de sua eficiência, a membrana foi corada com Ponceau

S por 15 minutos. A retirada do corante foi feita utilizando água destilada. A membrana foi, então, bloqueada em solução de bloqueio contendo 5 % de leite em pó desnatado e tampão de lavagem por 40 minutos sob agitação em temperatura ambiente.

Em seguida, conforme cada experimento, foram adicionados ou o anticorpo primário ou as quimera de Siglecs fusionadas à porção FC do anticorpo IgG-1 humano, todos diluídos em TBS com volume final de 2,5 ml. Para as Siglecs-FC foram utilizados 3 µg/ml e a concentração dos anticorpos variada conforme titulação específica pré determinada. A ligação ocorreu pela incubação overnight a 4°C, sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada por 5 minutos sob agitação em tampão de lavagem *Tris-buffered saline* (TBS) + 0,1% de Tween-20 por 5 vezes, sendo que as duas últimas lavagens foram feitas com TBS sem Twen-20. Para a detecção, seguida das lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico conjugado à enzima horseradish peroxidase (HRP) em titulação apropriada, pelo período de 1h e 30 minutos em temperatura ambiente. Para detecção das Siglecs-FC, foi utilizado o anticorpo anti-IgG1 humano -HRP na diluição de 1:5000 em TBS. Por fim, a membrana foi novamente lavada conforme descrito anteriormente e revelada, utilizando o substrato quimioluminescente ECL[®] (Promega Corporation, USA). As imagens foram então obtidas em foto documentador ChemiDoc[™] MP System (Bio-Rad, USA).

3.6 SDS PAGE COLORAÇÃO COM PRATA

Amostras contendo 1 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/80mA. 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 obtida usando o sistema Milli-Q[®] (Merck Group, Germany) e o gel mantido por 10 minutos sob agitação. Após esse período foram adicionados 200 ml 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.

3.7 ELISA (*ENZYME – LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Para o ensaio de ELISA indireto a placa foi sensibilizada com 10 µg de AGP *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados cinco vezes com 200 µl de tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween- 20) usando uma lavadora de microplacas (DYNEX Ultrawash Plus). O bloqueio foi realizado com 200 µl de tampão de bloqueio (PBS com 2% de albumina) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas novamente e incubadas com as diferentes quimeras de Siglec-FC por 1h em temperatura ambiente. Após, foi adicionado aos poços o anticorpo de detecção anti-fração FC do IgG humano conjugado com a enzima horseradish peroxidase (HRP). As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas novamente. Finalmente, após a lavagem dos poços, foi adicionado 100 µl do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS, KPL) para a reação colorimétrica ocorrer. Após o desenvolvimento da cor, 15 µl da solução de parada contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) foram adicionados aos poços e a leitura foi realizada em leitora de placa de ELISA (Biotek) a 405 nm.

3.8 ESTUDO DE MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

As análises de cálcio foram feitas utilizando o indicador de cálcio Fluo-3, AM (Molecular Probes). O Fluo-3 é um composto que ao ligar-se a uma molécula de Ca²⁺ emite fluorescência no comprimento de onda de 506/526 nm. A presença do derivado do éster AM (acetoxymethyl) permite que a molécula entre na célula, e esterases presentes no meio intracelular clivam esse éster impedindo que a molécula volte para o meio extracelular.

3.8.1 Citometria de fluxo

Para a análise da mobilização de cálcio por citometria de fluxo os neutrófilos (0,5 x10⁶ células em 100 µl) foram incubados com AGP em meio RPMI por 40 minutos (37°C, 5% de CO₂). Após, essas células foram lavadas e ressuspensas em tampão HBSS (sem cálcio e sem

magnésio) contendo o Fluo-3AM[®] em concentração final de 4 μ M, e incubadas a 37°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 400 μ l de HBSS (sem cálcio e sem magnésio) e as células centrifugadas 300 xg por 5 minutos sem aceleração e desaceleração (0 m/s²). Logo após as células foram ressuspensas em 300 μ l de HBSS com cálcio e com magnésio e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto[®]. As amostras foram adquiridas na velocidade baixa por 1 minuto para aquisição dos valores da linha de base de fluorescência (amostra sem estímulo). Em seguida, as células foram estimuladas com fMLP 10⁻⁷M (concentração final) e instantaneamente após a adição do estímulo, os eventos foram adquiridos por mais 5 minutos. Os dados foram analisados de maneira cinética pelo software Flowjo 10.4[®] (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

3.8.2 Análise por luminescência - FlexStation 3

Para análise de cálcio, foram utilizadas 0,2 x10⁶ células por poço em um volume final de 200 μ l de HBSS sem cálcio. As células foram adicionadas a uma placa de 96 poços (Costar 3603; 96 well assay plate; blackplate, clear bottom) em quintuplicata. Em seguida, foram adicionados 2 μ l de Fluo-3AM em concentração final de 4 μ M e incubadas a 37°C por 40 minutos ao abrigo da luz. A partir disso, todos os próximos passos foram feitos protegidos da luz. Decorrido o período de incubação, as células foram lavadas com 1 ml de HBSS contendo cálcio e sem fenol e centrifugadas a 450 xg por 8 minutos em temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por 2 vezes. Durante o tempo de centrifugação 100 μ l dos estímulos fMLP 5 x10⁻⁷M ou Ionomicina 1 mM foram adicionados em placas translúcidas de 96 poços com fundo em U. A adição do estímulo na amostra é feita pelo próprio equipamento, assim sua concentração de estímulo na placa deve ser 5 vezes mais concentrada que a concentração final desejada, pois serão adicionados 50 μ l do estímulo a 200 μ l de células.

A leitura foi feita em FlexStation 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader[®] (Molecular Devices, LLC. San Jose, CA, USA) e os dados obtidos foram mensurados em unidades relativas de fluorescência que correspondem à quantidade de luz coletada pelo instrumento. Os resultados foram calculados subtraindo os valores para cada tempo obtido a partir de uma linha de base adquirida previamente à adição do estímulo.

3.9 POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA

A actina existe em dois estados: o monomérico globular chamado de actina-G e os filamentos poliméricos chamados de actina-F. A polimerização desses filamentos foi detectada, utilizando a toxina faloidina que se liga e estabiliza esses filamentos. Para verificar a polimerização de actina como protocolo geral, as células foram ressuspensas em uma concentração de 2×10^6 células/ml em 200 μ l de RPMI. O protocolo de tratamento das células utilizado variou conforme a necessidade de cada experimento, mas no geral as amostras foram incubadas com a AGP, dAGP ou somente meio por 40 minutos (37°C -5% CO_2). No caso das análises feitas com o anticorpo neutralizante, as células foram incubadas com anti-Siglec-5/14 (clone monoclonal 194128 ReD Systems) ou com anti-Siglec-9 (clone monoclonal 191214 ReD Systems) por 30 minutos a priori do tratamento com a AGP.

Após esse período, as células foram estimuladas com fMLP 10^{-7} M por 3 minutos e a resposta da célula foi imobilizada adicionado 200 μ l de PFA 3%. Após, as amostras foram tratadas conforme protocolo especificado para cada análise.

3.9.1 Imunofluorescência

Para as análises por imunofluorescência as células foram aderidas à lâmina com o auxílio de uma citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon, life Science International, England). Para isso, 100 μ l da suspensão de células, agora na concentração de 1×10^6 células/ml, foram adicionadas ao aparato montado e centrifugadas a 450 x g por 10 minutos. As amostras foram realizadas em triplicata.

Depois, as lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos (TA) e em seguida lavadas por 2 vezes com 100 μ l de PBS. As células foram então permeabilizadas com 100 μ l de Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) 0.2% por 5 minutos. O excesso de Triton X-100 0.2% foi aspirado e 50 μ l da Faloidina-Rodamina 1:300 (R415, Life Technologies) adicionado. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 40 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas por duas vezes com 100 μ l de PBS e após aspirado o excesso. Com a lâmina quase seca, foi adicionado 10 μ l da solução de montagem, contendo DAPI® (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAP, Life Technologies). A amostra foi, então, coberta com uma lamínula e selada.

As imagens foram adquiridas com o auxílio de um microscópio de fluorescência convencional (Olympus BX40 e câmera Olympus DP72) ou confocal (Zeiss LSM 800),

utilizando as objetivas de 40x ou de 63x , e analisadas com o auxílio do *software* FIJI 2.0 (Is Just ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, U.S.A).

3.9.2 Citometria de fluxo

Para as análises por citometria de fluxo, ao meio contendo PFA 3%, após 20 minutos de incubação (TA) as células foram lavadas com 1 ml de PBS, centrifugadas a 400 xg por 10 minutos. As células foram então permeabilizadas com 100 µl de Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) 0.2% por 5 minutos. Em seguida as células foram lavadas com 100 µl de tampão PBS e ressuspensas em 50 µl de Faloidina-Rodamina em tampão PBS contendo 0,1% de albumina bovina e incubadas por 40 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, essas células foram lavadas por 3 vezes com 1ml de tampão FACS e ressuspensas em 200 µl desse mesmo tampão. As amostras foram logo em seguida adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

3.10 ENSAIO DE FAGOCITOSE

A fagocitose foi avaliada utilizando o reagente pHrodo™ Red E. coli BioParticles™ Conjugate for Phagocytosis (P35361 Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA), e o protocolo foi adaptado para citometria de fluxo. Para tal, os neutrófilos isolados foram ajustados para uma concentração de $0,5 \times 10^6$ células em 90 µl de tampão (PBS + 20 µM HEPES + 0,1% BSA, pH 7.34), plaqueadas em placa de 96 poços com fundo em U (Falcon® 96-well Clear Round Bottom TC-treated Cell Culture Microplate, with Lid, Sterile) e tratadas, ou não, com AGP por 40 minutos (37°C, 5%CO₂).

Após o período, foi adicionado 10 µl da solução de pHrodo™ Red E. coli BioParticles™ de modo a atingir uma concentração final de 100 µg/ml. Essa solução foi previamente vortexada por 30 segundos e sonicada por 5 minutos. As amostras contendo as bactérias marcadas foram incubadas à 37°C, 5%CO₂ ou 4°C pelo tempo estipulado para cada experimento. Cada condição foi testada em triplicata e como controle da técnica foram estipulados os grupos conforme a tabela a baixo:

1	Negativo 4°C	90 µl de células	10µl de tampão
2	Negativo 37°C	90 µl de células	10µl de tampão
3	Positivo 4°C	90 µl de células	10µl de pHrodo™ Red E. coli BioParticles™
4	Positivo 37°C	90 µl de células	10µl de pHrodo™ Red E. coli BioParticles™

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram imediatamente submersas em gelo e centrifugadas a uma temperatura de 4 °C por 10 minutos e velocidade de 300 x g com aceleração e desaceleração zero. Ao fim da centrifugação, foi retirado o sobrenadante, as células ressuspensas em 200 µl de tampão (PBS + 20µM HEPES) e o processo repetido por mais duas vezes. Após essas lavagens, as amostras foram lavadas por mais duas vezes com 200 µl de tampão FACS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSVerse®. Os dados adquiridos foram analisados em *software* Flowjo 10.4® (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

3.11 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

3.11.1 Citometria de fluxo

A dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando sonda DHE® (Dihydroethidium; ThermoFisher, USA). Para isso, após o isolamento dos neutrófilos e o tratamento com AGP, dAGP, Siglec-5 ou Siglec-9, as células foram estimuladas, ou não, com fMLP 10⁻⁷ M por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 50 µM da sonda e as células foram incubadas em estufa (37°C, CO₂ 5%) por 15 minutos. Em seguida, elas foram lavadas com tampão PBS e fixadas com 2% de PFA.

Para os experimentos utilizando o PMA (do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), os leucócitos totais foram incubados por 5 minutos com a sonda antes da aplicação do estímulo (10 µM de PMA incubados por 10 minutos). Após, as células foram lavadas com tampão FACS e fixadas com PFA 2% e os eventos adquiridos em citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

3.11.2 Quimioluminescência – Luminol

Os neutrófilos ($0,1 \times 10^6$ células por poço) foram ressuspensos em solução de HBSS sem fenol, em um volume final de 250 μ L. Em seguida, essas células foram distribuídas em placa específica para leitura de quimioluminescência (placa preta de 96 poços brancos com fundo chato). Depois de plaqueadas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de AGP por 40 min em estufa (37°C , $5\%\text{CO}_2$). Após esse período foi adicionado 1 μ L da solução de luminol 125 mM (Sigma A8511) e as amostras analisadas em FlexStation 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader® (Molecular Devices, LLC. San Jose, CA).

Para determinar a fluorescência basal das células, foi feita a leitura em modo cinético de varredura durante 5 minutos ou até que o sinal se tornasse estável, sem grandes variações. Para estimular as células, foi adicionado o volume necessário de fMLP para uma concentração final de 10^{-7} M em 200 μ l e a placa foi lida por mais 30 minutos. O ensaio incluiu, como controle, 5 poços contendo os reagentes conforme tabela:

Controle	Estímulo	Solução
Branco	fMLP 10^{-7} M	HBSS + luminol
Controle negativo	fMLP 10^{-7} M	HBSS + células
Controle basal	-	HBSS + células + luminol
Controle positivo	PMA 4 μ M	HBSS + células + luminol

Os resultados obtidos foram mensurados em unidades relativas de fluorescência que correspondem à quantidade de luz coletada pelo instrumento.

3.12 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE INTEGRINAS

A ativação de integrinas induzida pelo fMLP (10^{-7} M) foi analisada em citômetro de fluxo em tempo real. Assim, 400 μ l da solução contendo $2,5 \times 10^6$ neutrófilos/ml em meio RPMI sem fenol foram incubados com 0,5 mg/ml de AGP por 40 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período, essa suspensão de células foi analisada em citômetro de fluxo BD FACSCanto®. Para tal, primeiramente foi estabelecida uma linha de base utilizando as células ainda sem marcação e adquirindo-as em velocidade baixa por 45 segundos. Em seguida, o tubo foi retirado da probe e a ele foi adicionado 2 μ l da mistura de anticorpos formada por 80 μ l de

mAb24-Alexa Fluor 488 (100 µg/ml) e 7 µl de mAb KIM127 - DyLight 550[®] (700 µg/ml) em PBS. Após a adição dos anticorpos, as células foram adquiridas por mais 3 minutos. Decorrido esse tempo, o tubo foi novamente retirado da *probe* e a ele adicionado o estímulo (fMLP 10⁻⁷ M concentração final). Os eventos foram então adquiridos por mais 11 minutos. Importante lembrar que a velocidade de aquisição das células permaneceu entre 100-200 eventos por segundo, e que o citômetro foi ajustado para que não ocorressem lavagens entre as etapas de aquisição.

Os dados obtidos foram analisados de maneira cinética, utilizando o *software* Flowjo 10.4[®] (Flow Cytometry Analysis Software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados, assim como a representação gráfica dos mesmos, foi realizada com o uso do programa GraphPad Prism[™] *software* 8.0 (La Jolla, CA, EUA). Para os resultados com 2 grupos, controle e tratados com AGP, foi aplicado o teste t de Student's, e para aqueles com mais de 2 grupos análise utilizada foi ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey Multiple Comparison Test. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (EPM), e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 A AGP INIBE O ROLAMENTO DE NEUTRÓFILOS SOBRE O SUBSTRATO P-SELECTINA

Uma das maneiras da AGP inibir a migração dos neutrófilos para o foco da inflamação é interferindo na etapa de rolamento. Essa influência imunomodulatória da proteína foi demonstrada em modelos *in vivo*, porém a complexidade desse ambiente não nos permite diferenciar sobre qual população celular a AGP estaria agindo (MESTRINER e colab., 2007). Além disso, sua ação inibitória durante a fase de rolamento não foi avaliada em células humanas. Então, para caracterizar o efeito da AGP sobre os neutrófilos humanos excluindo o efeito de outras células do sistema, em específico as endoteliais, foi estabelecido um protocolo de rolamento *in vitro*.

Para isso, os neutrófilos tratados com a AGP foram avaliados, por microscopia, quanto à sua capacidade de rolamento sobre P-selectina imobilizada, utilizando um dispositivo microfluídico sob um *shear stress* de 0.3 Pa. Os resultados demonstraram que a presença da AGP nas amostras impediu a adesão dos neutrófilos ao substrato e conseqüentemente o rolamento. As imagens analisadas mostraram que logo após a aplicação do fluxo de 0.3 Pa (3 dyn/cm²), poucas células aderiram e rolaram sobre a P-selectina no grupo tratado com a proteína (Figura 7A e B). Ainda, o número de células por campo decresceu no decorrer do tempo de rolamento (Figura 7C). A velocidade de rolamento das células tratadas capazes de rolar, entretanto, não diferiu da velocidade obtida para as células controle (Figura 7D e E).

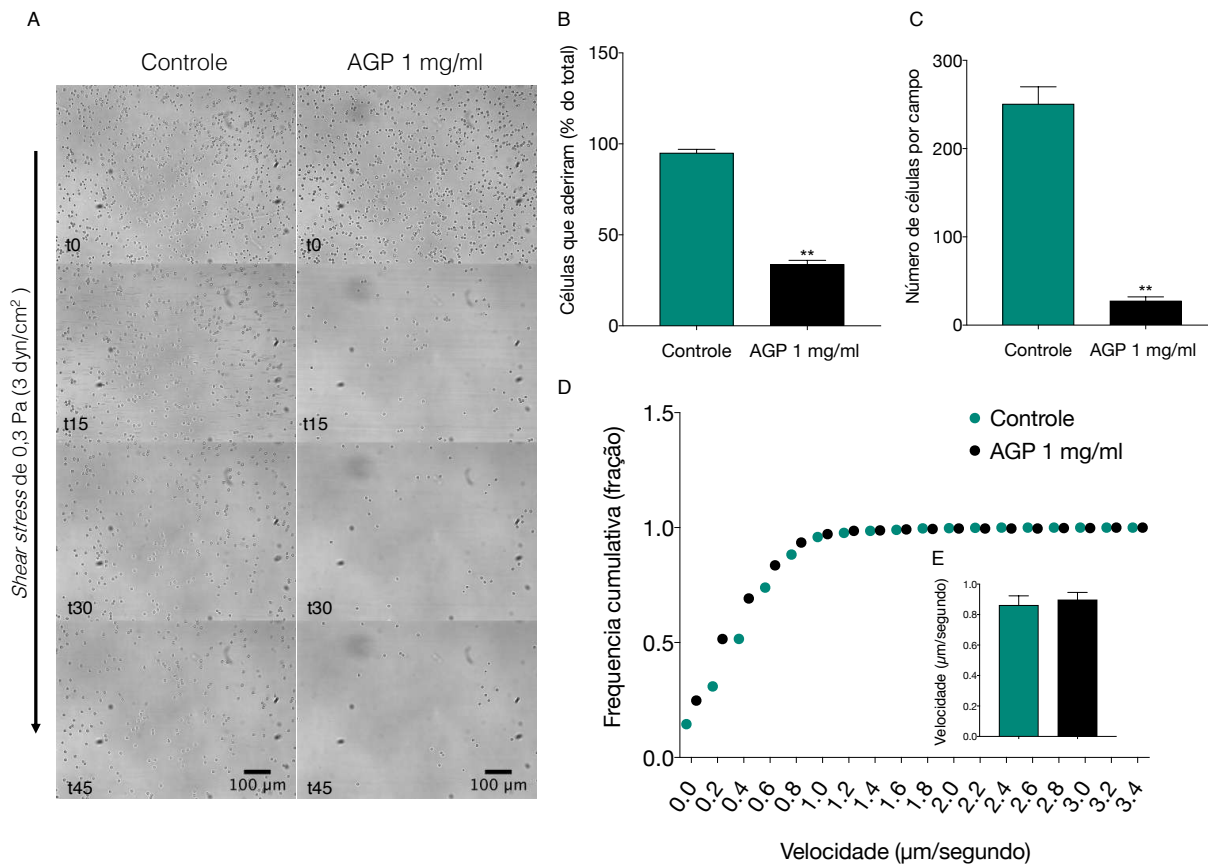


Figura 7- AGP inibe a adesão e o rolamento dos neutrófilos sobre P-selectina FC in vitro. (A) Exemplo da sequência de imagens representando o rolamento dos neutrófilos (1×10^6 cel/ml) tratados, ou não (controle), com 0,5mg/ml de AGP sobre um substrato composto por hP-selectina-FC imobilizada ($2 \mu\text{g/mL}$). O rolamento foi testado utilizando um sistema de perfusão microfluídico (*shear stress*: 0,3 Pa) e as imagens foram capturadas por microscopia em campo claro com objetiva de 10x e o tempo representado em segundos (B) Frequência cumulativa da velocidade de rolamento dos neutrófilos. (C) Média da velocidade de rolamento. (D) Número de células que aderiram ao substrato após aplicação do *shear stress* (porcentagem do total de células que rolaram). (E) Número de células rolando por campo. Cada ponto representa a média de 20 células analisadas. Dados representativos de 2 experimentos distintos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM **para $p < 0,01$ em relação ao controle; teste t de Student's.

4.2 A AGP INTERAGE COM A SUPERFÍCIE DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS INDEPENDENTE DA PRESENÇA DE ÁCIDO SIÁLICO EM SUA ESTRUTURA

Para demonstrar uma ação modulatória através de receptores de membrana inibitórios, como o sugerido em nossa hipótese, inicialmente é necessário caracterizar a interação entre a AGP e a superfície dos neutrófilos.

A possibilidade de interação foi avaliada em um ensaio de ligação (*binding*), por meio de análise em citometria de fluxo, utilizando a proteína AGP marcada com um fluorocromo Alexa Fluor 488. Como demonstrado na figura 8A quanto maior a quantidade de proteína disponível no meio, maior a intensidade de fluorescência da população de células CD66b⁺ analisada. A ligação da proteína com a membrana da célula ocorre, então, de maneira concentração dependente. Ainda, como os experimentos foram realizados a 4°C, pode-se descartar a hipótese de que o sinal observado seria decorrente da internalização da proteína pela célula.

Para complementar o estudo e descartar ligações inespecíficas, o experimento realizado anteriormente foi repetido como um ensaio de competição no qual foram utilizadas a AGP marcada com o fluoróforo e a AGP não marcada. Nesse ensaio, diferentes proporções dessas duas variações da proteína foram adicionadas concomitantemente e incubadas com a célula. Quando a concentração da proteína não marcada é aumentada, ocorre uma diminuição da intensidade de sinal emitido pela AGP-AF488 (Figura 8B). Esse deslocamento da fluorescência decorre da concentração de proteína não marcada adicionada ao meio e permite inferir que está ocorrendo uma competição pelo mesmo sítio de ligação na membrana da célula.

Dada a importância da cadeia de carboidrato dessa proteína, o próximo passo foi determinar o envolvimento do ácido siálico nessa interação AGP-neutrófilo. Para esse experimento, além da proteína marcada com AF488, foram utilizadas AGP e dAGP marcadas com o fluorocromo aloficocianina (APC do inglês *allophycocyanin*). Dado que o ácido siálico encontra-se na porção terminal da cadeia de carboidratos, sua localização favoreceria o seu contato com as células, tornando-o um candidato em potencial como sítio de ligação entre AGP e célula. Contudo, quando os neutrófilos foram incubados com a proteína sem o ácido siálico, a intensidade de fluorescência, que caracteriza a interação com a célula, não diferiu entre as duas variantes da AGP na maioria das concentrações utilizadas (Figura 8C e D). Isso demonstra que, apesar da interação da AGP com seu alvo ser concentração dependente, ela provavelmente não ocorre somente por meio do ácido siálico.

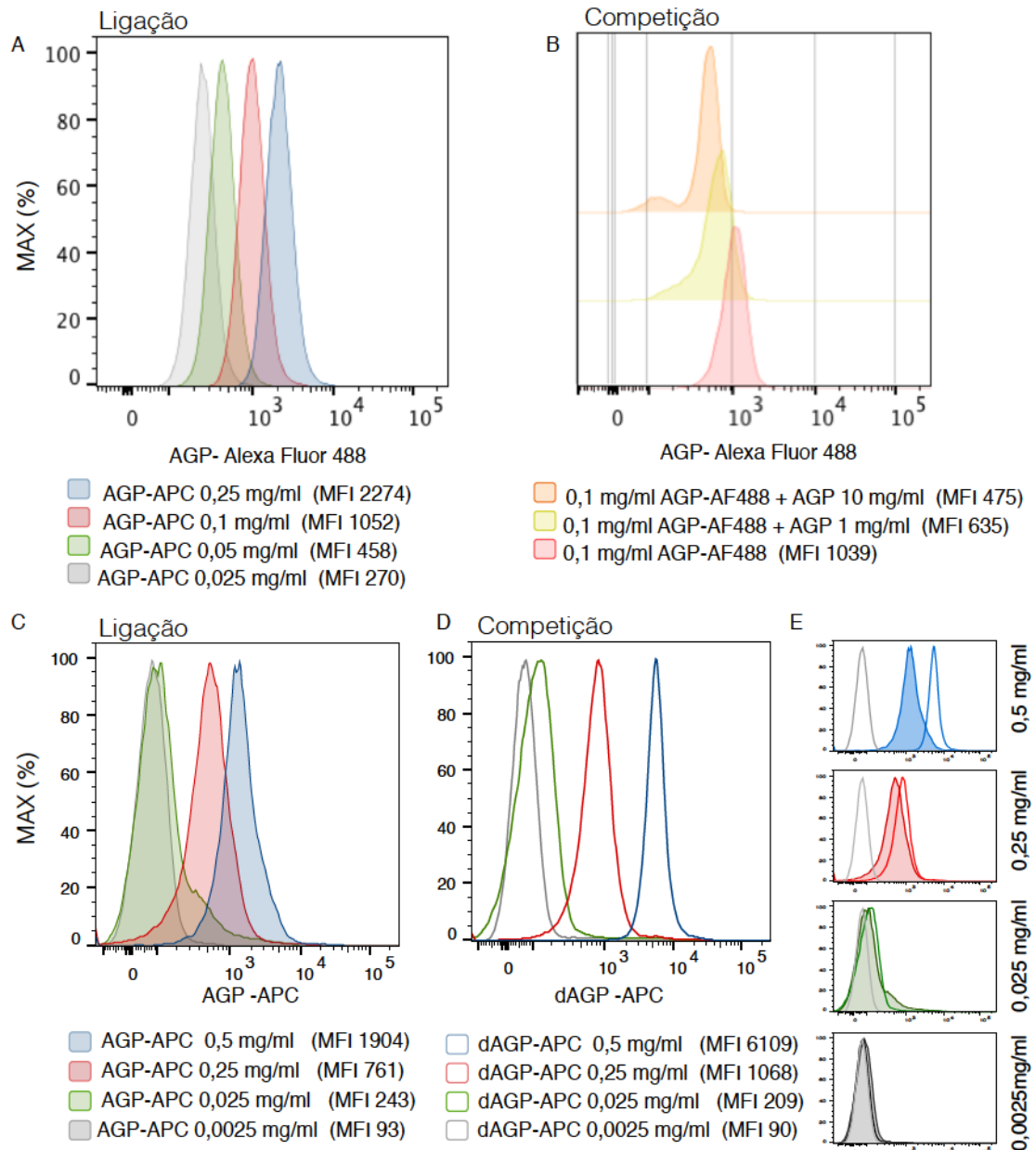


Figura 8- A AGP se liga à membrana dos neutrófilos de maneira independente de ácido siálico. Neutrófilos isolados (1×10^6 células/ml) foram incubados com as diferentes concentrações de AGP fluorescente por 40 minutos a 4°C . Os histogramas mostram a intensidade de fluorescência dada pela interação dos neutrófilos (CD66b+) com a AGP marcada com o fluorocromo Alexa Fluor 488 (AGP-AF488) ou com Alociocianina (AGP-APC). **(A)** Interação dos neutrófilos com diferentes concentrações da AGP-AF488 **(B)** Deslocamento da ligação da AGP-AF488 na presença de 0,1 mg/ml ou 10mg/ml de AGP sem marcação. **(C e D)** Ligação dos neutrófilos com diferentes concentrações da proteína AGP sialilada (AGP-APC) ou sem o ácido siálico (dAGP-APC). **(E)** Sobreposição dos histogramas de AGP (histograma fechado) e dAGP (histograma aberto) em diferentes diluições. MFI – média de intensidade de fluorescência (do inglês median fluorescence intensity). Para os experimentos foram adquiridos 50.000 eventos totais no citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

4.3 A AGP INIBE A QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELO FATOR QUIMIOTÁTICO FMLP

Estudos demonstraram os efeitos da AGP sobre as funções dos neutrófilos, entre eles a inibição da quimiotaxia induzida por fMLP, IL-8 e CXCL-2 em neutrófilos humanos e murinos (MATSUMOTO e colab., 2007; MESTRINER e colab., 2007; VASSON, M P e colab., 1994). Para confirmar os resultados publicados, os quais mostraram que a AGP inibe a resposta quimiotática da célula frente ao fMLP, foi realizado um ensaio *in vitro* em Câmara de Boyden conforme descrito em materiais e métodos. Nesse ensaio, os neutrófilos foram tratados com diferentes concentrações de AGP e, em seguida, o número de células que migraram em direção ao quimioatrativo foi avaliada. Os resultados da curva demonstraram que todas as concentrações testadas foram suficientes para inibir a quimiotaxia induzida pelo fMLP (10^{-7} M) (Figura 9A). Sendo assim, a concentração de AGP utilizada nos ensaios foi determinada de acordo com as necessidades de cada experimento.

Como já descrito, moléculas de AGP que passaram pelo processo de retirada do ácido siálico (desialilação), inibem de forma menos efetiva as funções dos neutrófilos relacionadas com seus mecanismos de defesa, como a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (BENNETT e SCHMID, 1980; GUNNARSSON e colab., 2010; VASSON, M P e colab., 1994). Contudo a participação desse carboidrato na quimiotaxia ainda não havia sido avaliada. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em 2015, revelaram que a retirada do ácido siálico reverte de maneira significativa a inibição da quimiotaxia ocasionada pela AGP (Figura 9B). Nesses estudos, os resíduos do ácido siálico da estrutura da AGP foram retirados, obtendo assim uma proteína desialilada que denominamos de dAGP (dados publicados em dissertação de mestrado, Lorenzini e Spiller 2015). Essa AGP desialilada foi produzida utilizando a enzima neuraminidase de *Clostridium perfringens* que cliva preferencialmente o ácido siálico que se encontra ligado à galactose nas posições: α -2-3 > α -2-6; α -2-8.

Os ensaios de quimiotaxia foram então avaliados como descrito anteriormente. Para otimizar o ensaio foram utilizados 0,1 mg/ml de dAGP ou AGP. Como mostraram os resultados, a reversão obtida com a retirada do ácido siálico foi de aproximadamente trinta por cento, quando se compara com a AGP sialilada, demonstrando que o mecanismo pelo qual a inibição ocorre é parcialmente dependente desse carboidrato.

As amostras de AGP utilizadas foram analisadas quanto à sua contaminação por LPS, utilizando o método de LAL, e a concentração dessa endotoxina encontrada foi inferior a 1 EU/ml (0,069 ng/ml). Ainda, análises prévias demonstraram que a AGP não altera a viabilidade

das células, pois não induz apoptose nem necrose (dados publicados em dissertação de mestrado, Lorenzini e Spiller 2015).

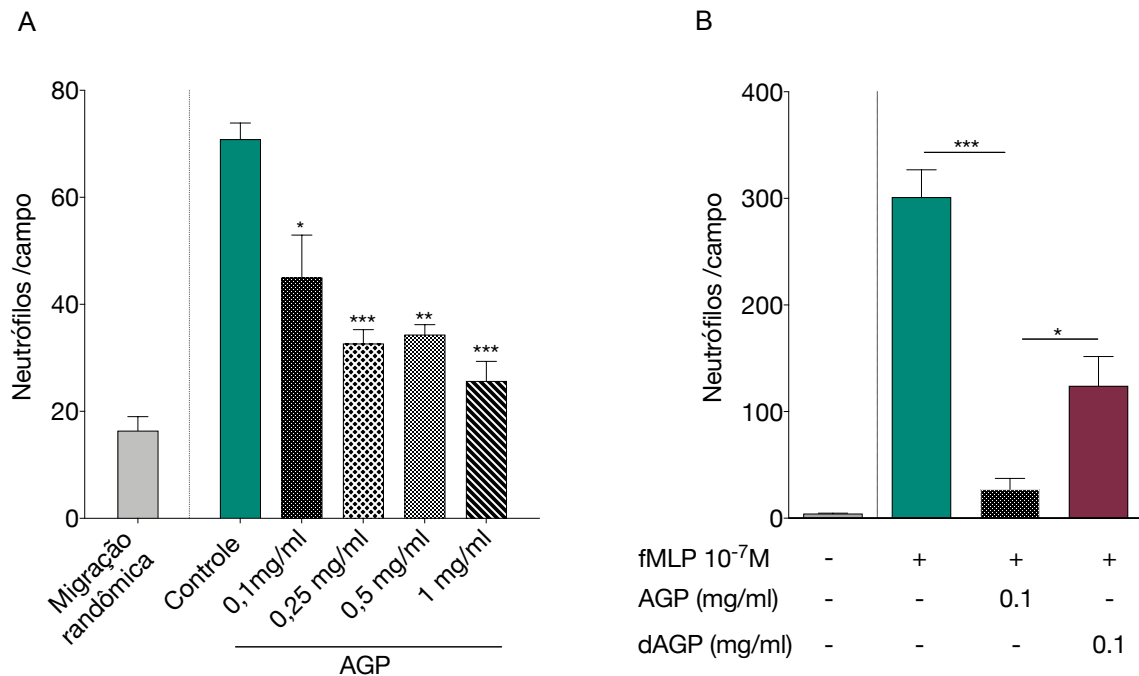


Figura 9- AGP inibe a quimiotaxia dos neutrófilos de maneira parcialmente dependente de ácido siálico. Neutrófilos purificados do sangue periférico foram incubados por 1 h a 37°C com AGP, AGP desialilada (dAGP) ou RPMI (controle) e estimulados por fMLP (10⁻⁷M) em Câmara de Boyden. Os resultados foram expressos como média ± EPM de medidas em triplicata. *para p<0,05, **para p<0,01 em relação ao controle, ***para p<0,001 em relação ao controle (fMLP); ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.4 A AGP LIGA-SE AOS RECEPTORES SIGLEC -5

Os resultados observados anteriormente mostraram a interação concentração-dependente da AGP com os neutrófilos e seu efeito inibitório sobre a quimiotaxia dessas células dependentes de ácido siálico. Em 2007, Gunnarsson e colaboradores (GUNNARSSON e colab., 2007) demonstraram que a AGP interage com Siglec-5. Dessa forma, no presente trabalho, foi decidido confirmar esses resultados e avaliar se o efeito inibitório da AGP sobre os neutrófilos é dependente de Siglec-5.

Para avaliar a ligação de AGP com Siglec-5, primeiramente foi realizada uma análise de bioinformática por *symmetry docking*, que avaliou a possibilidade de interação entre AGP e Siglec-5. Essa análise demonstrou que estruturalmente, por meio da interação com o ácido siálico, cada molécula de AGP seria capaz de acomodar até quatro moléculas do receptor Siglec-5 (Figura 10).

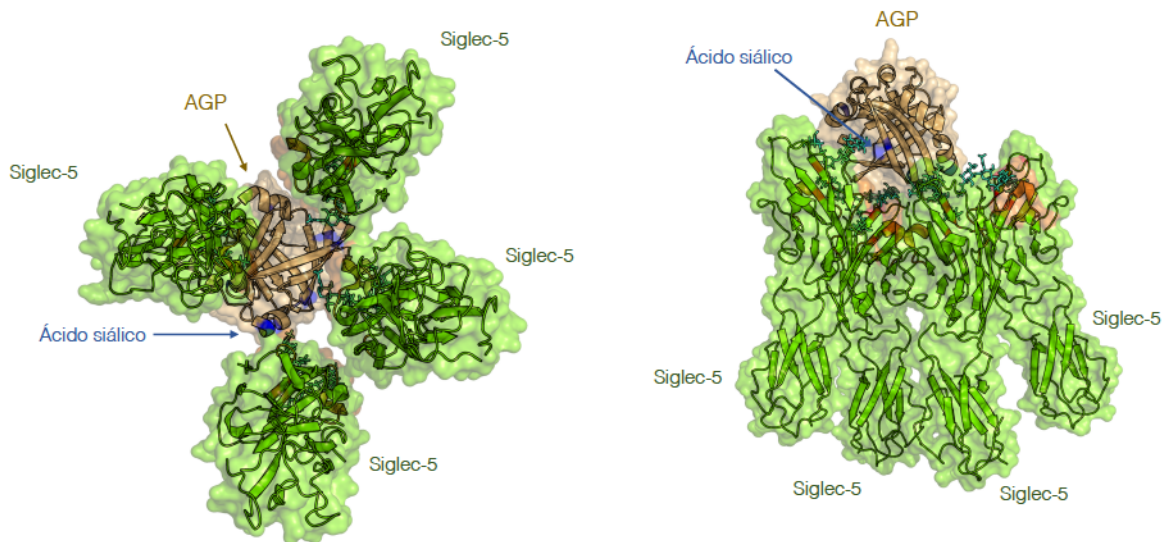


Figura 10- A AGP pode ligar até quatro moléculas de Siglec-5. Análise de bioinformática Symmetry docking entre AGP humana e Siglec-5 mostrando que uma molécula AGP (PDB-ID: 3kq0, representada na cor marrom) poderia interagir com quatro moléculas de Siglec-5 (PDB-ID: 2zg1, em verde) através de seus resíduos de ácido siálico (ciano). A simulação de Docking foi analisada através de SymmDock ([hmp://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/](http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/)) e os resultados manualmente explorados utilizando o software Pymol.

Para confirmar os dados encontrados na análise de bioinformática e descritos na literatura, foram empregadas duas metodologias distintas, a de *western blot* (WB) e de ELISA (do inglês *Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*). Para ambas as técnicas foram utilizadas quimeras recombinantes de hSiglec-FC que são constituídas pela porção N-terminal do receptor fusionada à porção FC do anticorpo IgG1 humano.

Na análise por *western blot*, 1 mg de AGP foi transferida do gel (SDS-PAGE) para a membrana, que foi incubada com as diferentes hSiglecs-FC e reveladas com um anticorpo que se liga à fração FC. A interação foi considerada positiva quando observado o aparecimento de

uma banda com massa molecular de aproximadamente 47 kD correspondente ao peso molecular da proteína. Além da AGP com e sem o ácido siálico, também foram utilizadas as proteínas albumina bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) e a arginina cinase que não expressa nenhum carboidrato em sua superfície. Neste ensaio, também foram utilizadas as hSiglecs-FC -5, -2, -9 e sua ortóloga em camundongos a Siglec-E-FC. Como controle de ligação inespecífica foi utilizado o anticorpo anti-IgG1 humano, além dos controles de *load* da proteína feitos com géis espelho e revelados com o anticorpo anti-AGP humano ou corados com nitrato de prata.

A figura 11 mostra que a AGP, mas não as outras proteínas, interage com Siglec-5-FC. A ausência de ligação a essas proteínas, em especial a dAGP, mostram que a ligação AGP-Siglec-5-FC depende do ácido siálico. Foram também detectadas bandas correspondentes à interação da AGP com as Siglecs-2-FC (CD22) e em menor intensidade com a Siglec-9 (Figura 11A-E). Não foi observada interação significativa de nenhuma das outras proteínas analisadas com as Siglecs testadas.

A ligação entre AGP e a Siglec demonstrada no WB foi quantificada em um ensaio de ELISA. Nesse ensaio, a placa foi sensibilizada com AGP e incubada com as Siglecs-FC. A interação com as Siglecs-FC foi concentração dependente, e ocorreu no grupo incubados com a Siglec-5 e, em menor intensidade, com Siglec-9. A ligação com Siglec-2 foi confirmada, porém não existem relatos de expressão desse receptor em neutrófilos e esses resultados não foram investigados. Assim, como no ensaio de WB, o controle de ligação inespecífica foi feito avaliando o anti-IgG1.

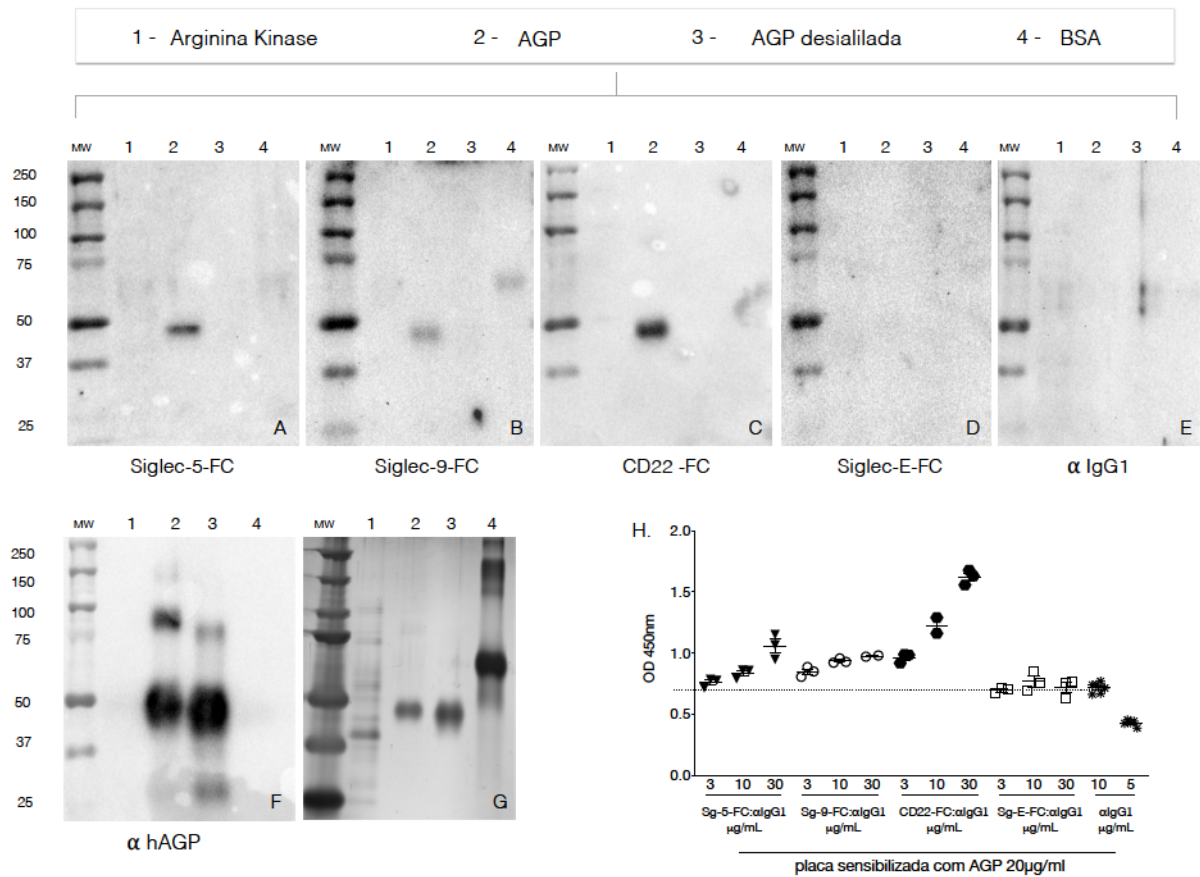


Figura 11- Demonstração da interação de Siglec-5 FC com AGP. No ensaio de WB as proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE, para o qual foram utilizados 2 μ M das proteínas AGP ou dAGP (canaletas 2 e 3, respectivamente), além das proteínas utilizadas como controle: a arginina cinase (AK – canaleta 1) e a albumina bovina (BSA – canaleta 4). (A – D) Após transferência para uma membrana de nitrocelulose as proteínas foram incubadas com 3 μ g/ml das diferentes quimeras recombinantes de Siglec-FC. Para a resolução foi utilizado um anticorpo secundário anti-porção FC do IgG1. (E) Controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário. (F) Como controle da técnica, o anticorpo anti-AGP humana foi utilizado no lugar das Siglecs-FC. (G) SDS-PAGE espelho corado com nitrato de prata. (H) Ensaio de ELISA - a placa foi sensibilizada com 20 μ g/ml de AGP e foram utilizadas 3, 10 e 30 μ g/ml de Siglec-FC. A resolução foi feita com o anticorpo anti-FC do IgG1 humano. A linha tracejada indica o background com base no controle IgG1.

4.5 O TRATAMENTO DE NEUTRÓFILOS COM A AGP NÃO MODULA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE fMLP (FPR1)

Induzir a dessensibilização de um receptor e conseqüentemente sua endocitose diminui o número de receptores passíveis de serem ativados e, assim, inibe a resposta da célula. Por isso, partiu-se do pressuposto de que a AGP poderia estar modulando o receptor de fMLP (FPR1) e promovendo sua dessensibilização/internalização. Menos FPR1 na membrana reduziria a quimiotaxia estimulada pelo fMLP.

O perfil de expressão do FPR1 foi avaliado em neutrófilos isolados, tratados, ou não, com AGP e estimulados, ou não, com fMLP. Em seguida, as células foram incubadas com um anticorpo anti-FPR1 Alexa Fluor 647, e a fluorescência emitida foi analisada em um ensaio de citometria de fluxo.

Como mostra o histograma da figura 12A, as células estimuladas com fMLP apresentaram uma redução na expressão do receptor FPR1 ao serem comparadas com as do grupo controle. Essa variação se deve ao fato de que muitos receptores GPCRs são internalizados após a ligação com seu agonista (RAJAGOPAL e SHENOY, 2018). No entanto, o tratamento com a proteína AGP nas células estimuladas, ou não, com fMLP, não interferiu na expressão do receptor (Figura 12B). Isso indica que esses receptores não estão sendo endocitados em decorrência do tratamento com AGP e que provavelmente não existe uma interação química entre o fMLP e a AGP.

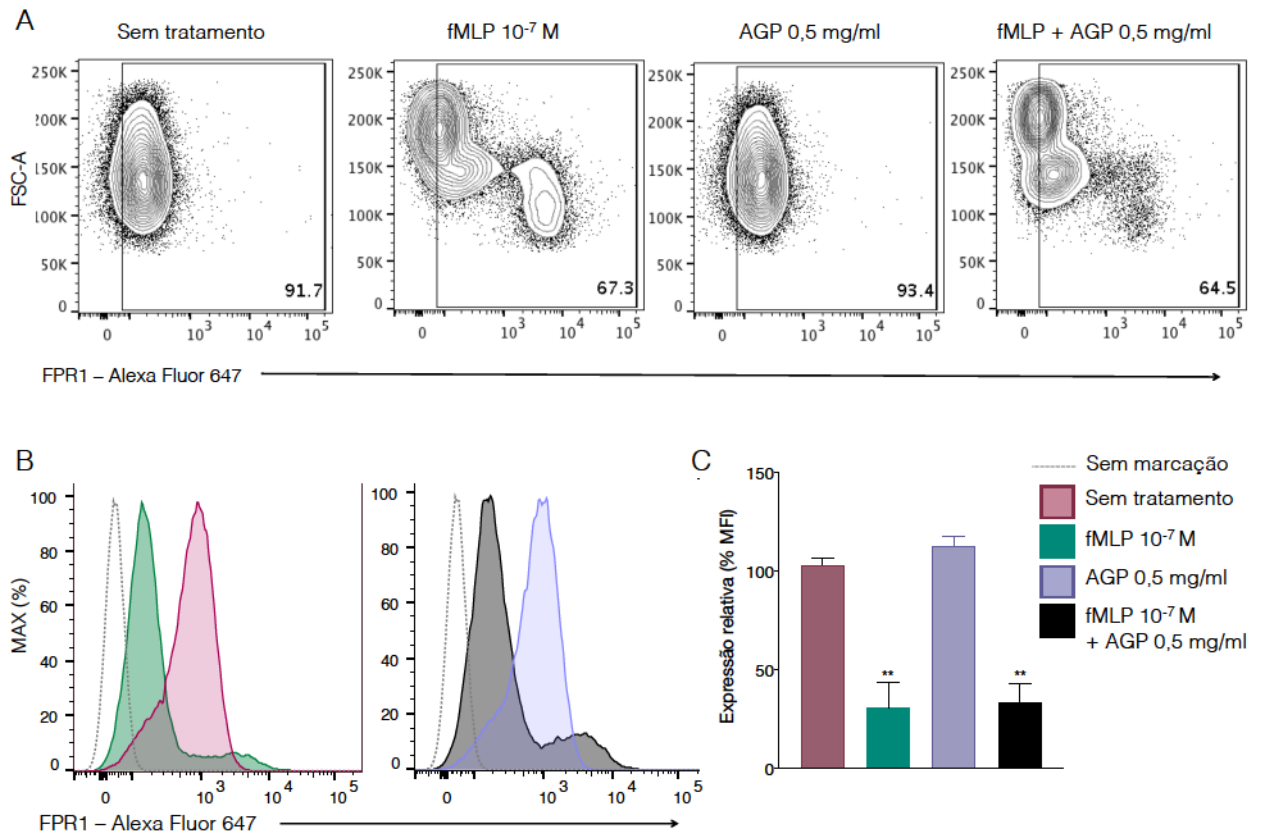


Figura 12- AGP não modula a expressão dos receptores de fMLP (FPR1) na membrana de neutrófilos. (A) Gráfico de contorno representativo de 2 experimentos distintos. (B) Citometria de fluxo representada por histogramas sobrepostos da intensidade de fluorescência da expressão de FPR1 em neutrófilos não tratados ou tratados com a AGP. (C) Expressão relativa da porcentagem da mediana de intensidade de fluorescência representada no histograma em B. Neutrófilos isolados ($n=3$) previamente tratados, ou não, com AGP foram estimulados por 3 minutos com fMLP, 10^{-7} M, ou não, e em seguida marcado com o anticorpo anti-FPR1 humano Alexa Fluor 647. Para esse ensaio foram adquiridos 50.000 eventos e a estratégia de gating utilizada para análise partiu de células CD66b e CD16 duplo positivas. Resultados expressos como média \pm EPM das medidas adquiridas em triplicata; * = $p<0.05$ em relação ao controle (sem tratamento + fMLP); ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.6 A MOBILIZAÇÃO DE CÁLCIO DECORRENTE DO ESTÍMULO COM fMLP NÃO É INFLUENCIADA PELO TRATAMENTO COM AGP

Entre outras, a ativação de receptores FPR1 induz a cascata de sinalização da PLC que mobiliza cálcio de seus estoques intracelulares para o citosol. O cálcio é um dos segundos mensageiros mais importantes e está envolvido com inúmeras respostas celulares, muitas delas importantes para a migração (IMMLER e colab., 2018). Procurando investigar quais seriam os efeitos da AGP sobre essa via de sinalização, considerou-se avaliar sua influência sobre o influxo de cálcio citosólico ativado pelo fMLP.

A dosagem de cálcio intracelular foi feita utilizando a molécula Fluo3AM que emite fluorescência ao se ligar ao cálcio no interior da célula. Nesse ensaio, os neutrófilos foram tratados, ou não, com a AGP e marcados com essa molécula fluorescente. Em seguida, as células foram estimuladas com fMLP, e a fluorescência emitida foi analisada por citometria de fluxo (Figura 13A -C).

Como a mobilização de cálcio ocorre muito rapidamente após adição do estímulo, para evitar perda do tempo de resposta, foi utilizando um leitor de placa com pipetador automático acoplado (FlexStation® 3). Com isso, o sinal emitido relativo ao cálcio liberado é captado imediatamente após a adição do estímulo (fMLP) (Figura 13D e E).

A fluorescência adquirida em ambos os instrumentos não revelou nenhuma diferença na concentração desse íon entre os grupos analisados. Após adição do fMLP ocorre um aumento na intensidade de fluorescência que decresce com o passar do tempo. As curvas obtidas na amostra controle e nas tratadas com a AGP (1 mg/ml ou 0,5 mg/ml) foram semelhantes. A área sob a curva obtida a partir do gráfico da figura 13 não apresentou diferença significativa entre o grupo controle (barra verde) e o grupo que foi incubado com a AGP (barra preta e barra azul).

Os resultados obtidos, ainda demonstraram que a presença de 1 mg/ml de AGP no meio não altera a concentração de cálcio basal da célula (Figura 13C e E - barra lilás). Para o controle da viabilidade e capacidade de resposta das células, foi utilizada a ionomicina (1 mM) que é um ionóforo que induz aumento da concentração Ca^{2+} citoplasmático (MORGAN e JACOB, 1994).

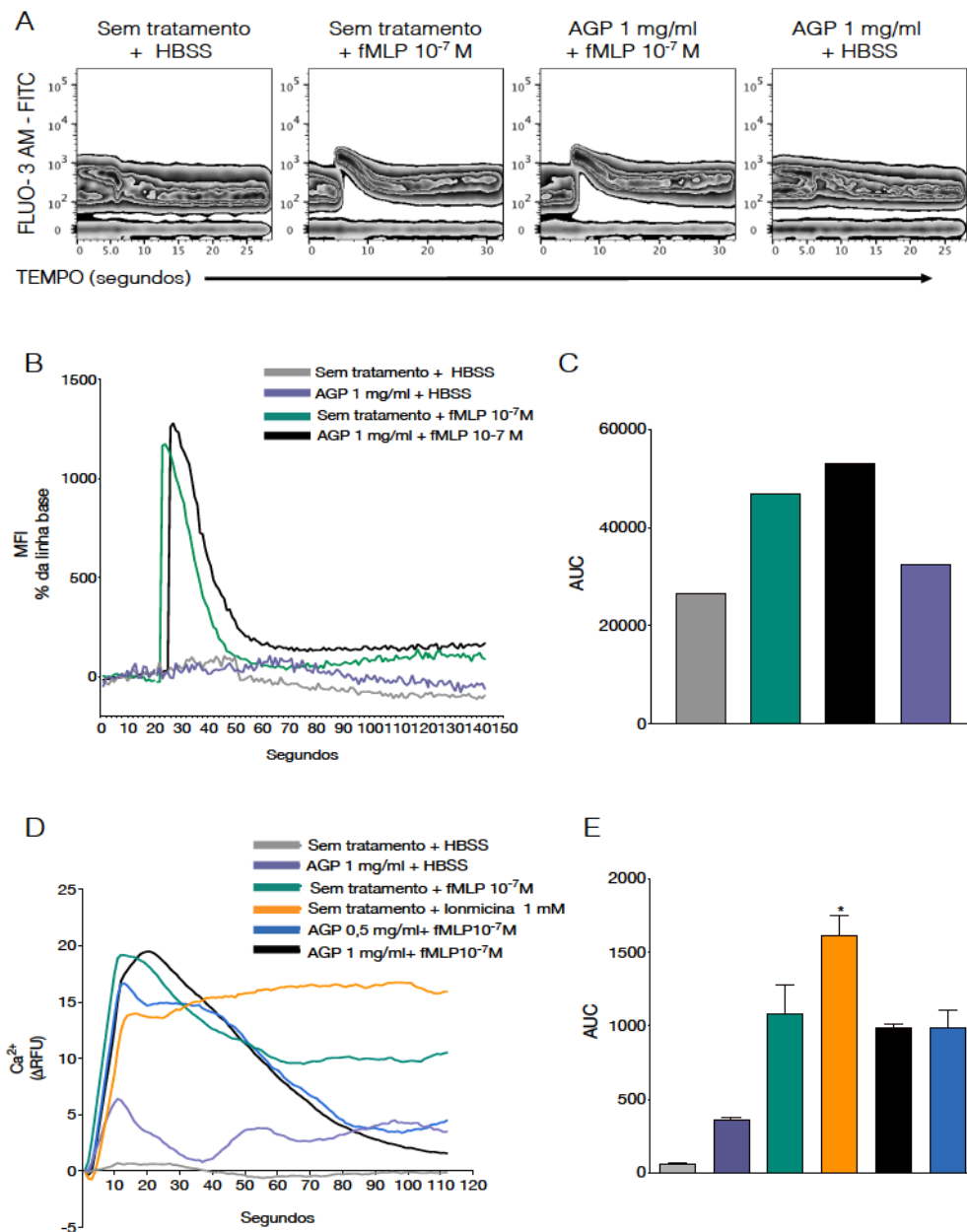


Figura 13- A AGP não interfere na mobilização de cálcio induzida pelo fMLP. Análise da mobilização de cálcio intracelular utilizando a marcação com Fluo-3 AM em neutrófilos tratados, ou não, (TA) com AGP. Em seguida, as células foram estimuladas com fMLP 10^{-7} M (concentração final); 1 mM de ionomicina ou não estimuladas (adição de HBSS). **(A)** Gráfico (zebra plot) da fluorescência emitida pelo Fluo-3 AM *versus* o tempo, representativo de 3 experimentos distintos. Os eventos foram adquiridos por citometria de fluxo durante 1 minuto antes do estímulo (linha de base) e por mais 5 minutos após adição do estímulo. **(B)** Cinética da média de intensidade de fluorescência adquirida e sua respectiva área sobre a curva **(C)**. **(D)** Cinética da variação das unidades relativas de fluorescência obtidas em leitor de placa FlexStation 3. Os valores foram subtraídos da linha base adquirida antes da leitura. **(E)** Área sob a curva referente ao gráfico D. Resultados representativos de 3 experimentos distintos, expressos como média \pm EPM das medidas adquiridas em triplicata; * = $p < 0.05$ em relação ao controle (sem tratamento + fMLP); ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.7 NEUTRÓFILOS TRATADOS COM AGP POLIMERIZAM MENOS ACTINA QUANDO ESTIMULADOS COM FMLP

O movimento da célula decorrente da quimiotaxia requer um rearranjo constante do seu citoesqueleto que depende da polimerização de actina (POLLARD e BORISY, 2003; DEVREOTES e HORWITZ, 2015). Inibir a polimerização de actina impede a polarização celular, o que resulta em uma deficiência de locomoção. Por isso, considerou-se importante investigar a influência da AGP sobre a formação dos polímeros de actina.

O rearranjo do citoesqueleto se dá a partir de monômeros de G-actina que polimerizam e formam filamentos de F-actina, os quais podem ser quantificados. A polimerização de actina foi avaliada em neutrófilos previamente tratados com diferentes concentrações de AGP e estimulados com o fMLP. A resposta da célula foi então estabilizada com o agente fixador paraformaldeído e os filamentos de actina marcados com faloidina acoplada à molécula fluorescente rodamina.

A análise por imunofluorescência mostrou que todas as concentrações testadas de AGP inibem a formação de polímeros de actina a níveis próximos ao do grupo de células não estimulado (Figura 14A e B). Da mesma maneira, as amostras quantificadas por citometria de fluxo também demonstram inibição em quase todas as concentrações testadas, exceto nas concentrações mais baixas (Figura 14C e D).

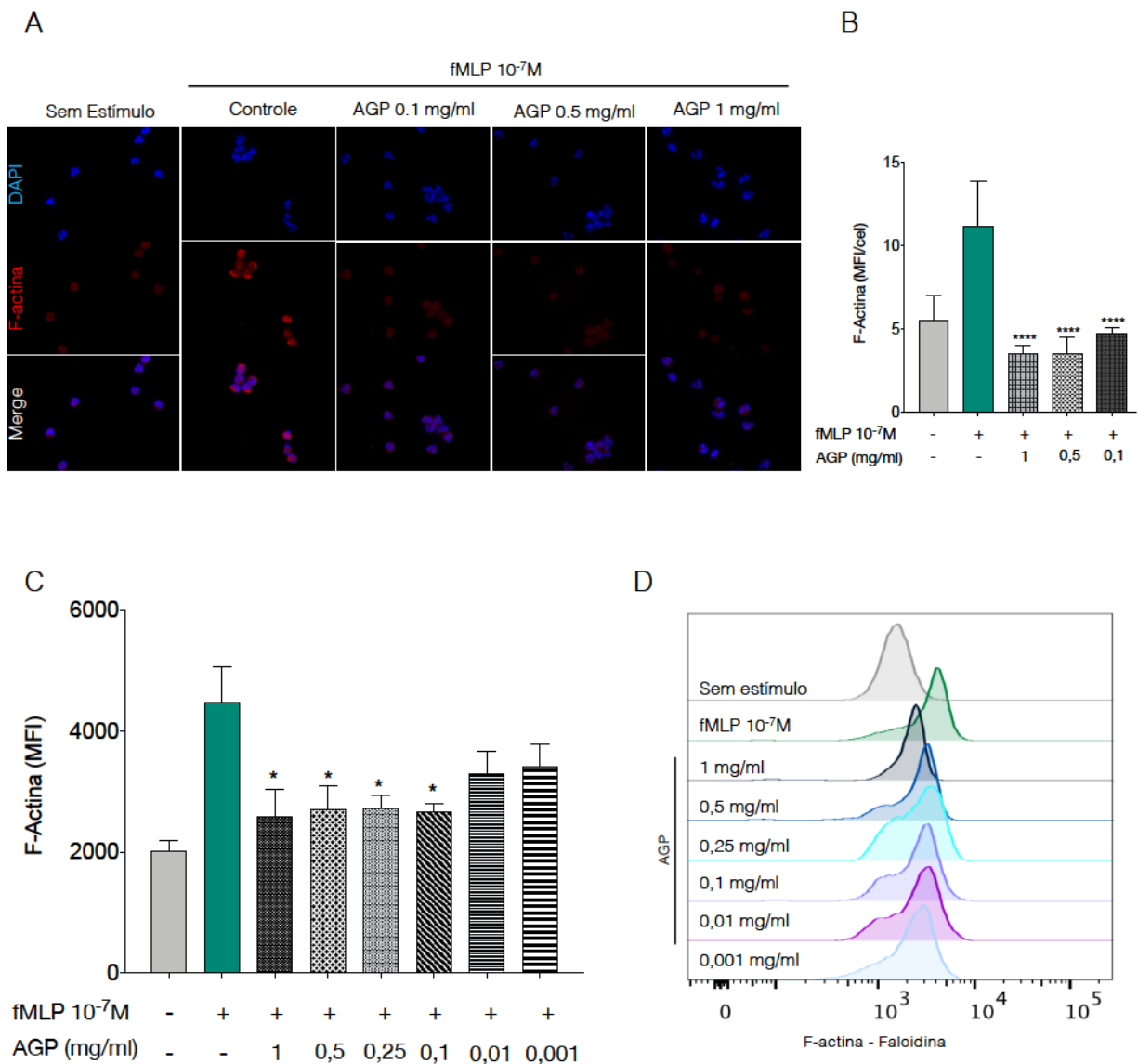


Figura 14- AGP inibe a polimerização de actina em neutrófilos estimulados com fMLP. Neutrófilos (1×10^6 células/ml) isolados foram tratados com diferentes concentrações de AGP por 40 minutos a $37^\circ C$ e após foram estimulados com $10^{-7}M$ de fMLP por 3 minutos. (A) Imagens representativas da polimerização de actina analisada por imunofluorescência, utilizando faloidina marcada com rodamina (vermelho) e o marcador de núcleo DAPI (azul). O controle refere-se aos neutrófilos não tratados com a AGP e estimulados com fMLP (B) Quantificação das imagens apresentada como média de intensidade de fluorescência (MFI). Gráfico representativo de 5 experimentos independentes obtidos com amostras de 5 doadores saudáveis. (C) Curva concentração *versus* resposta da inibição da polimerização de actina induzida pela AGP, analisada por citometria de fluxo e expressa como média da intensidade de fluorescência da Faloidina-Rodamina e seu histograma representativo. Dados analisados por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD FACSVerse®. Para esses ensaios foram adquiridos 20.000 eventos totais. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Resultados expressos como média \pm EPM das medidas adquiridas em triplicata; *para $p < 0,05$ e ***para $p < 0,001$ em relação ao controle (sem tratamento); ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

Além disso, como demonstra a figura 15, esse efeito na polimerização de actina é dependente do ácido siálico da proteína. Nesses resultados, a dAGP não interfere na polimerização de actina induzida pelo fMLP, demonstrando que a retirada do ácido siálico extingue o efeito inibitório da AGP observado anteriormente. A proteína desialilada não apresentou efeito inibitório em nenhuma das concentrações testadas, tanto nas análises feitas por imunofluorescência (Figura 15A e B) quanto por citometria de fluxo (Figura 15C).

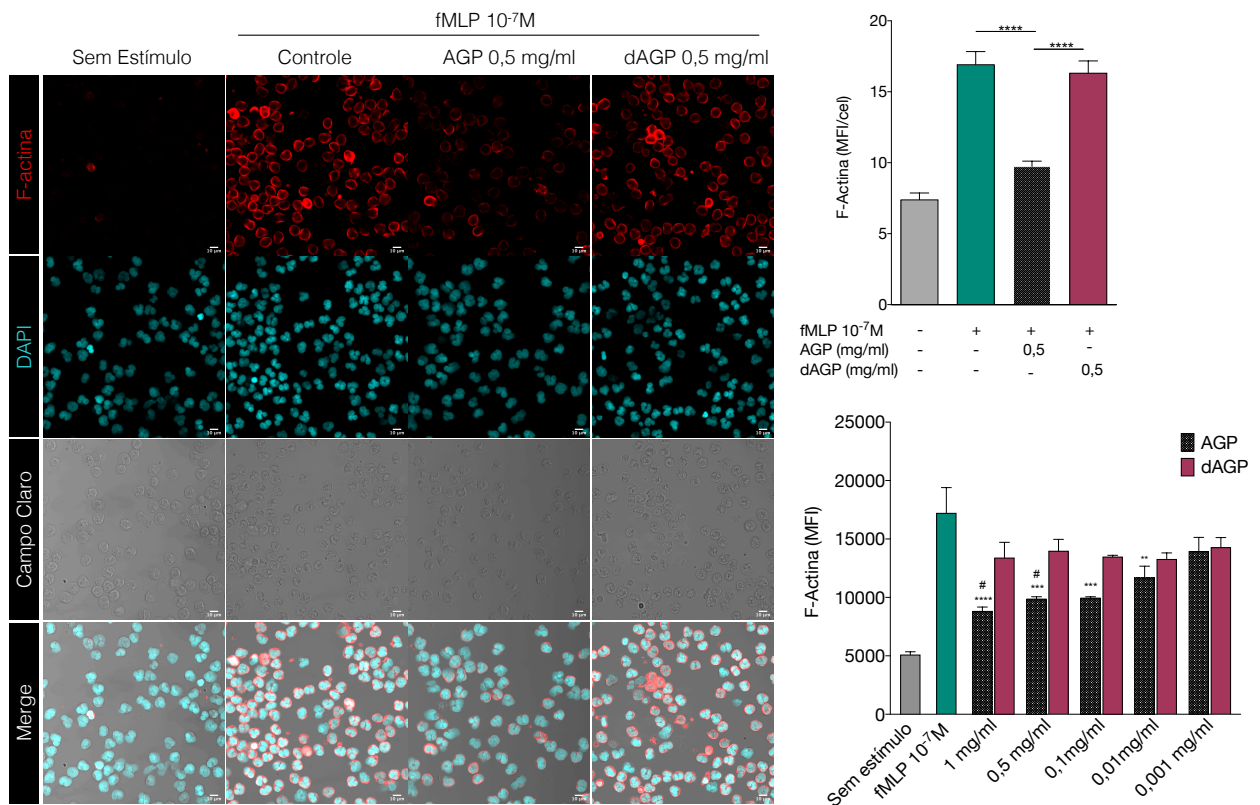


Figura 15- AGP inibe a polimerização de actina em neutrófilos de forma dependente de ácido siálico. Neutrófilos (1×10^6 células/ml) isolados foram tratados com 0,5 mg/ml de AGP ou AGP desialilada (dAGP) por 40 minutos a 37°C. Após incubadas, essas células foram estimuladas com 10^{-7} M de fMLP por 3 minutos e a reação parada com PFA 4%. **(A)** Imagens representativas da polimerização de actina analisada por imunofluorescência utilizando faloidina marcada com rodamina (vermelho) e o corante DAPI (azul) para a marcação do núcleo. O controle refere-se aos neutrófilos não tratados com a AGP e estimulados com fMLP. **(B)** Quantificação das imagens apresentada como média de intensidade de fluorescência (MFI). Gráfico representativo de 8 experimentos independentes obtidos com amostras de 3 doadores saudáveis. **(C)** Curva concentração *versus* resposta da inibição da polimerização de actina induzida pela AGP ou dAGP e analisada por citometria de fluxo e expressa como média da intensidade de fluorescência da faloidina-rodamina. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. Os resultados foram expressos como média \pm EPM ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ em relação ao grupo fMLP; # = $p < 0,05$ grupo AGP x dAGP nas mesmas concentrações ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Para esses ensaios foram adquiridos 20.000 eventos totais em citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

Determinada a importância do ácido siálico nos resultados obtidos anteriormente, a próxima etapa do trabalho procurou investigar se a ação modulatória da AGP sobre a polimerização de actina estava ocorrendo através da sua ligação com Siglec.

Para avaliar se o perfil inibitório observado poderia ser revertido ao impedir a interação entre a AGP e a Siglec, foram utilizados anticorpos neutralizantes anti-Siglec-5 ou anti-Siglec-9. Ao se ligar a esse receptor, os anticorpos neutralizantes utilizados impediriam a interação com seu ligante. Logo, os neutrófilos foram pré-tratados com esses anticorpos por vinte minutos e na sequência incubados com a AGP. Os resultados obtidos foram analisados por imunofluorescência (Figura 16 A e B) e por citometria de fluxo (Figura 16C) demonstraram que o uso do anticorpo anti-Siglec-5 reverteu significativamente o efeito inibitório da AGP sobre a polimerização de actina. Para excluir uma reação cruzada com a porção FC do anticorpo, o que resultaria numa ativação inespecífica da célula, as amostras foram tratadas com um bloqueador dos receptores Fc (FcR). Além disso, a reversão da inibição que foi observada, poderia ser resultado de uma indução da polimerização de actina decorrente dessa ativação. Então, além de bloquear os FcR, como controle foram utilizados os mesmos anticorpos, porém as células foram tratadas com dAGP e não AGP. Entretanto, nesse grupo, não foi observado nenhum efeito aditivo na média de intensidade de fluorescência quando comparado com o grupo que foi incubado apenas com a dAGP. Ainda, os dados obtidos por citometria de fluxo revelaram que essa reversão se extingue à medida que a concentração do anticorpo neutralizante diminui (Figura 16C).

De forma contrária, o tratamento das células com o anti-Siglec-9 não foi capaz de reverter o efeito inibitório da AGP sobre a polimerização de actina (Figura 17). Esses resultados, aliados aos dados que mostraram uma menor afinidade da AGP por Siglec-9 (Figura 11B), sugerem que esse efeito sobre os neutrófilos seja mediado pela ativação somente de Siglec-5.

Em conjunto, os resultados mostram que a AGP inibe a polimerização de actina nos neutrófilos estimulados com fMLP, e que isso ocorre em função do ácido siálico da proteína e da sua interação com Siglec-5 e não Siglec-9.

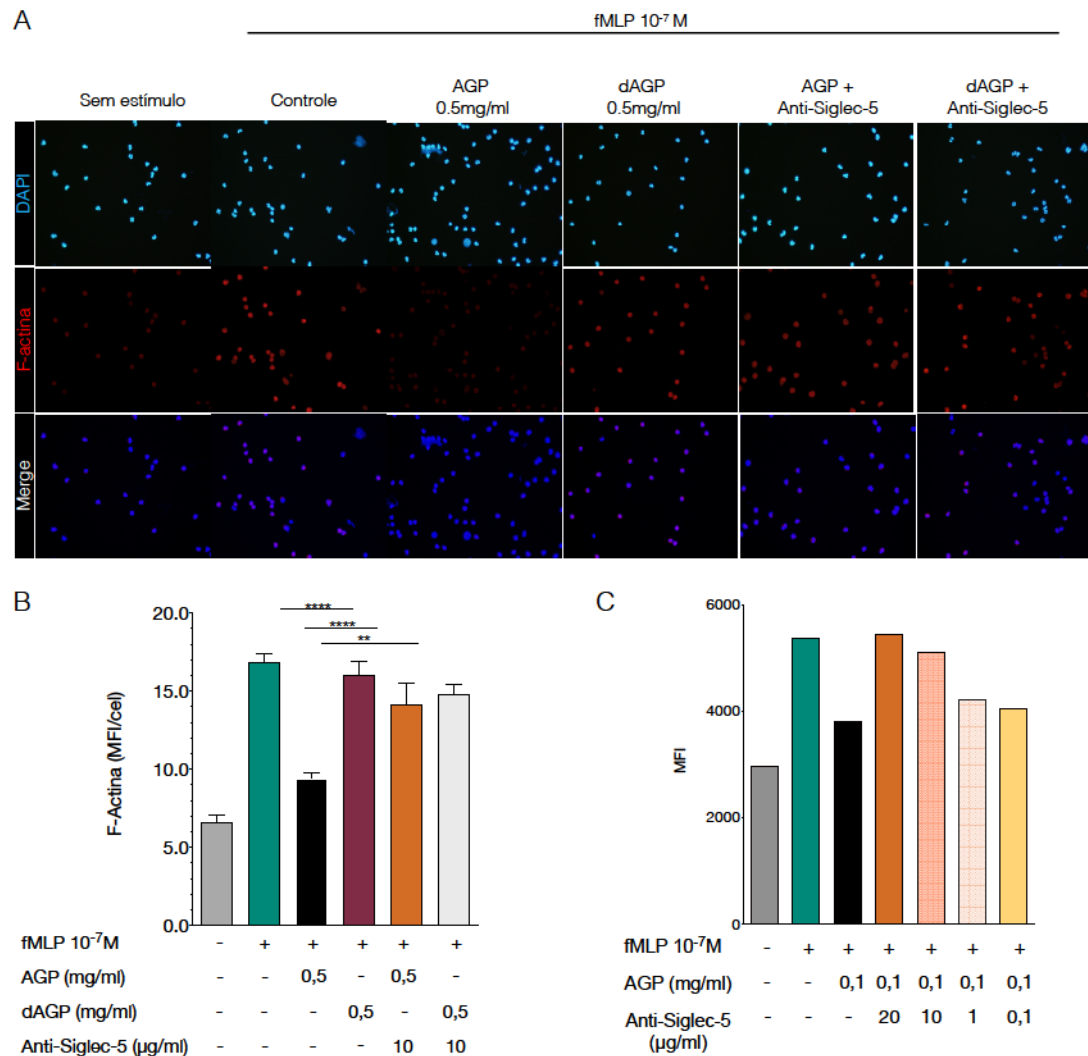


Figura 16- O tratamento de neutrófilos com o anticorpo neutralizante anti-Siglec-5 reverte a inibição da polimerização de actina induzida pela AGP. Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram, ou não, previamente incubados com o anticorpo ($10 \mu\text{g/ml}$) anti-Siglec-5 por 30 minutos. Após, foram incubados com AGP, ou dAGP ($0,5 \text{ mg/ml}$), ou somente meio RPMI por mais 40 minutos (37°C $5\%\text{CO}_2$). Em seguida, essas células foram estimuladas com o fator quimiotático fMLP (10^{-7}M) por 3 minutos e a reação parada com PFA 4%. (A) Imunofluorescência da polimerização de actina analisada utilizando faloidina marcada com rodamina (vermelho) e o corante DAPI (azul) para a marcação do núcleo. O controle refere-se aos neutrófilos não tratados com a AGP e estimulados com fMLP. Para esse ensaio, 100 células por grupo, foram analisadas. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. (B) Gráfico da média de intensidade de fluorescência por célula (MFI/célula) obtido a partir das imagens de imunofluorescência e quantificadas pelo programa ImageJ. Para esse ensaio, 100 células por grupo foram analisadas. (C) Curva de titulação do anticorpo neutralizante de Siglec-5 expressa pela média da intensidade de fluorescência obtida por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. **para $p < 0,01$ e ***para $p < 0,001$; ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Para esses ensaios foram adquiridos 30.000 eventos totais em citômetro de fluxo BD FACSVerser[®].

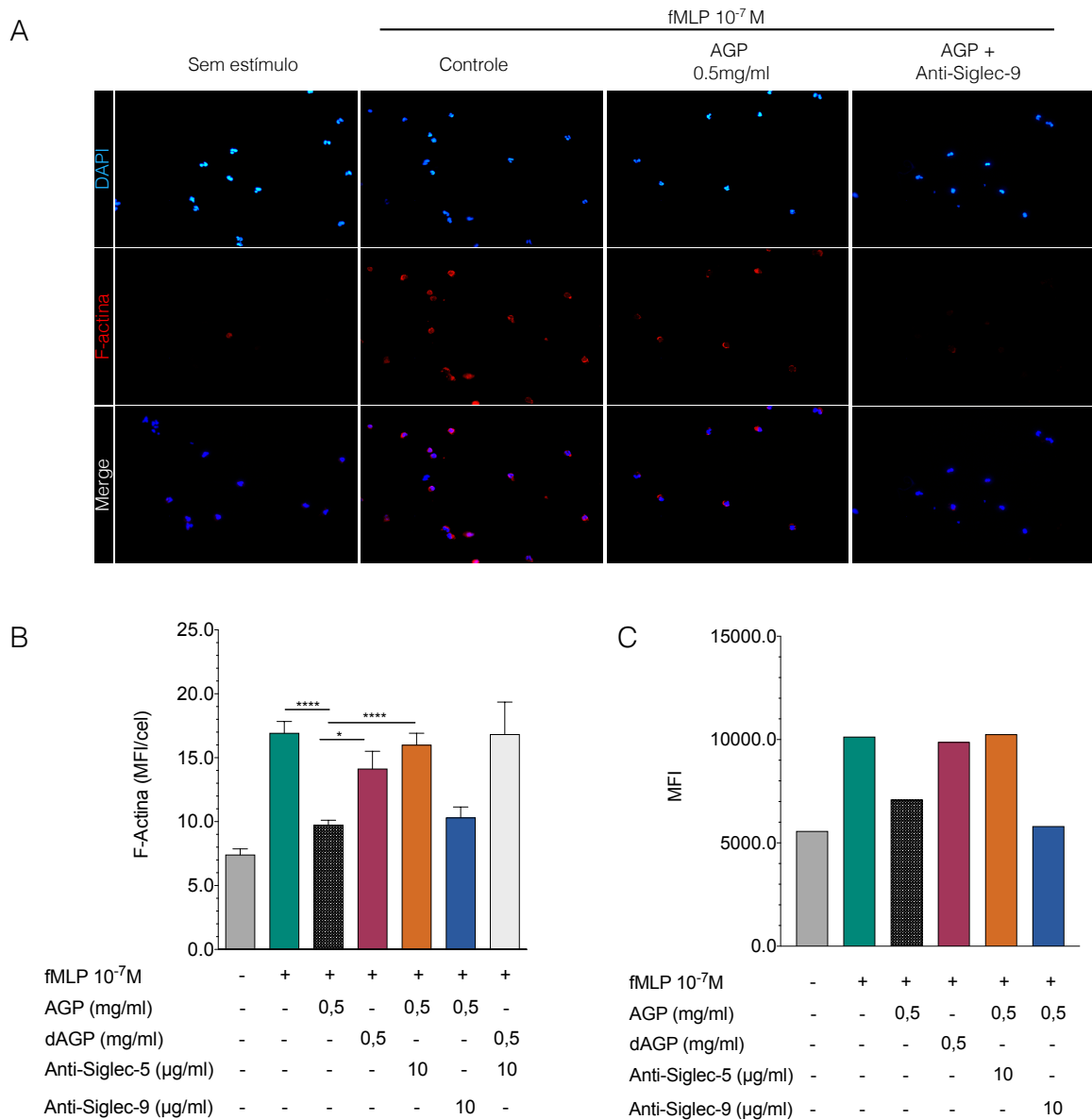


Figura 17- A inibição da polimerização de actina pela AGP não ocorre via Siglec-9. Previamente ao tratamento com a AGP os neutrófilos (1×10^6 cel/ml) foram incubados, ou não, com o anticorpo anti-Siglec-9 ($10 \mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. Após, foram incubados com AGP, ou dAGP ($0,5 \text{ mg/ml}$), ou sem tratamento por mais 40 minutos (37°C $5\%\text{CO}_2$). Em seguida, essas células foram estimuladas com o fator quimiotático fMLP (10^{-7}M) por 3 minutos e a reação parada com PFA 4%. **(A)** Polimerização de actina analisada por imunofluorescência utilizando faloidina marcada com rodamina (vermelho) e para a marcação do núcleo o corante DAPI (azul). Imagens representativas de 3 experimentos independentes. **(B)** Gráfico da média de intensidade de fluorescência por célula (MFI/célula) obtido através das imagens de imunofluorescência e quantificadas pelo programa ImageJ. Para esse ensaio, 100 células por grupo, foram analisadas. Os resultados demonstrados foram obtidos com amostras de 3 doadores saudáveis e expressos como média \pm EPM das medidas **para $p < 0,01$ e ***para $p < 0,001$; ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.8 A CAPACIDADE DE FAGOCITOSE DOS NEUTRÓFILOS NÃO É AFETADA PELO TRATAMENTO COM AGP

Demonstrado o efeito da AGP sobre a polimerização de actina, imaginou-se que a AGP poderia influenciar outros eventos que também dependem do rearranjo do citoesqueleto. Sabendo do envolvimento da formação de polímeros de F-actina durante a formação do fagossomo (para a formação dos pseudópodes que englobam a partícula a ser ingerida durante a fagocitose), aliado ao estudo publicado por Van Oss et al (1974) que demonstrou que a AGP inibe a fagocitose de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, considerou-se pertinente avaliar a influência dela nessa resposta da célula.

Para tal, foram utilizadas *E. coli* conjugadas com corante sensível ao pH (pHRodo-*E. coli* Bioparticles), como descrito em materiais e métodos. Nesse ensaio, os neutrófilos foram pré-incubados com a AGP e em seguida as bactérias *E. coli*-pHRodo foram adicionadas ao meio. Após a fagocitose, ocorre a formação do fagossomo que, ao se fundir com o lisossomo, forma uma vesícula (fagolisossomo) com um pH baixo. Assim, as partículas sensíveis ao pH, quando fagocitadas, emitem uma determinada fluorescência que foi quantificada por citometria de fluxo.

Após noventa minutos de incubação, aproximadamente trinta por cento das células apresentaram fluorescência. Essa porcentagem se manteve a mesma entre os grupos tratados, ou não, com a AGP (Figura 18A e B). A média de intensidade de fluorescência também não foi diferente para nenhuma das concentrações da proteína testadas (Figura 18C). Prevendo um possível envolvimento da ativação de Siglec-5, como controle, utilizamos a proteína HsP70 (do inglês *70 Kilodalton Heat Shock Protein*) que, segundo a literatura, é ligante desse receptor. Contudo não ocorreram alterações na taxa de fagocitose nos grupos tratados com ela. A citocalasina D foi utilizada como controle de inibição uma vez que ela promove a despolimerização da actina, o que impede a fagocitose.

Para descartar a questão temporal necessária para uma fagocitose eficiente, o tempo de incubação foi aumentado para cento e vinte minutos. Com isso, a porcentagem de células positivas aumentou para sessenta por cento, mas, apesar disso, a taxa representativa de fagocitose manteve-se a mesma entre os grupos testados (Figura 18D).

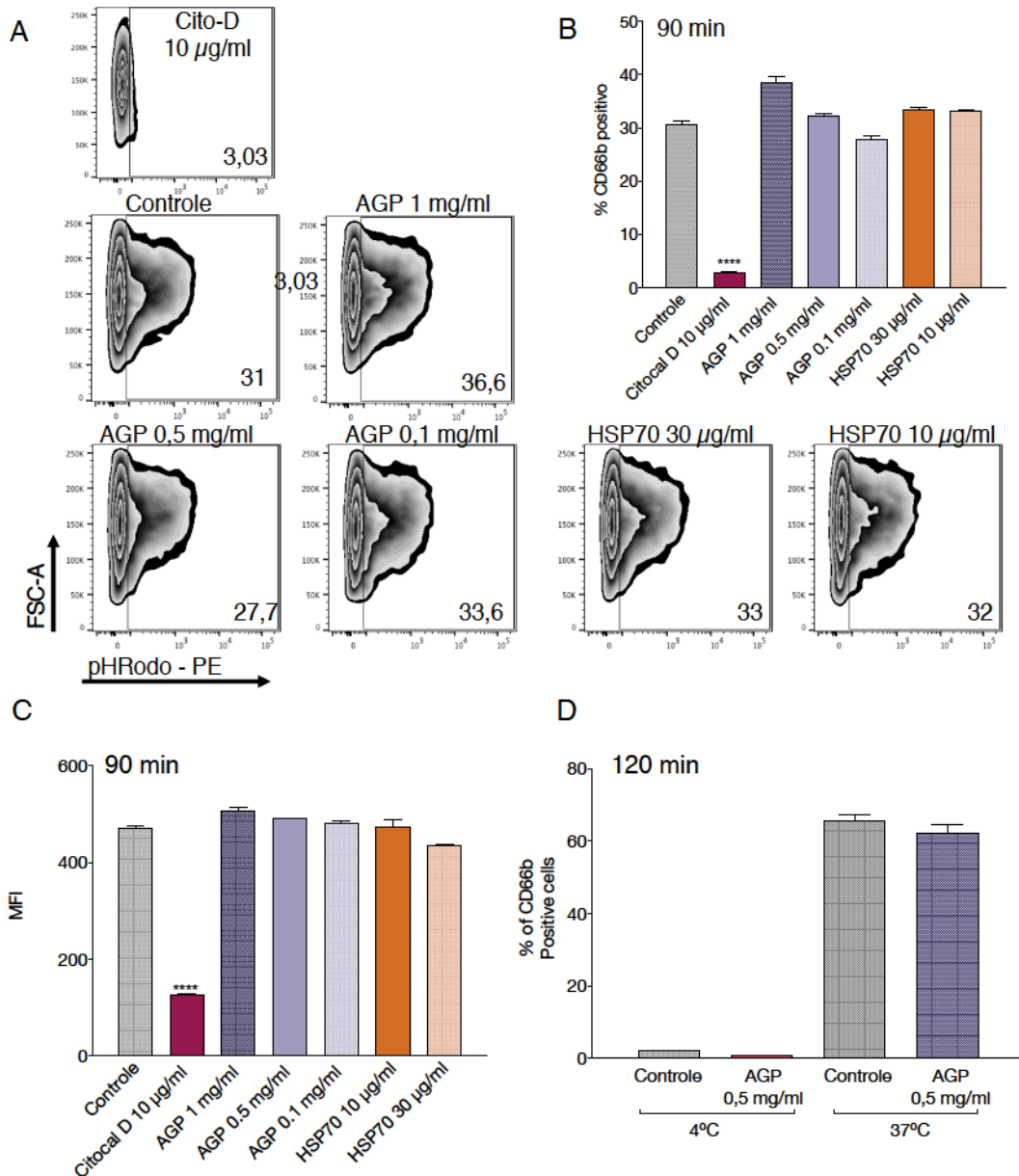


Figura 18- O tratamento dos neutrófilos com AGP não interfere na sua capacidade de fagocitose de *E. coli*. Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo. Os neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram pré-tratados com a AGP nas diferentes concentrações por 40 minutos a 37°C ou não foram tratadas (controle). Em seguida, os grupos foram incubados com as partículas de pHRedo por 90 ou 120 minutos. **(A)** Gráficos (zebra plot) representativos de 4 experimentos distintos, demonstrando a frequência de eventos positivos versus granulocidade (SSC). **(B)** Histograma de fluorescência representativo de 2 experimentos independentes e 4 doadores. Frequência de células positivas analisadas após 90 minutos de incubação a 37°C (5%CO₂). **(C)** Gráfico de barras da porcentagem de células positivas para pHRedo - PE e **(D)** da mediana da intensidade de fluorescência das células analisadas a partir do gate de células CD66b positivas. **(E)** Frequência de células positivas após 120 minutos de incubação à 4°C ou a 37°C e 5%CO₂. Resultados expressos como média \pm EPM das medidas ***para $p < 0,001$; ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.9 O TRATAMENTO DE NEUTRÓFILOS COM AGP INIBE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) INDUZIDAS PELO ESTÍMULO COM FMLP

A produção de ROS está relacionada com uma fagocitose eficiente, entretanto sua ação sobre as células saudáveis contribui para o dano tecidual. Tanto o envolvimento das Siglecs, quanto da AGP, em inibir a sua produção já foram descritos. Por exemplo, os neutrófilos deficientes para Siglec-E produzem mais ROS e induzem a morte do tecido nesses animais nocautes (SCHWARZ e colab., 2015). Da mesma maneira, o tratamento de neutrófilos humanos com a AGP inibe a sua produção, *in vitro*, em células estimuladas com fMLP (RINALDI e colab., 2008; STAKAUSKAS e colab., 2005). Juntando essas evidências, procuramos investigar se a AGP impede a formação e liberação de ROS, e se isso ocorre de maneira dependente de ácido siálico e/ou da ativação de Siglec-5 ou -9.

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células em decorrência do estímulo com fMLP foram dosadas por quimioluminescência e confirmadas por citometria de fluxo. O ensaio de quimioluminescência foi realizado utilizando o reagente de luminol e os resultados não apresentaram valores de inibição significativos para as diferentes concentrações de AGP testadas (Figura 19A). As células tratadas com a AGP sem o ácido siálico (dAGP) também não apresentaram diferença na concentração de ROS produzida, porém ambas as amostras apresentaram uma tendência à inibição a qual foi investigada utilizando uma metodologia diferente.

A produção de ROS foi, então, dosada por citometria de fluxo utilizando a sonda DHE (dihidroetídio), e os dados foram expressos como a média de intensidade de fluorescência induzida pela sonda (19B e C). Os resultados desse ensaio demonstraram que o tratamento dos neutrófilos com concentrações superiores a 0,1 mg/ml de AGP inibem a produção de ROS decorrente da sua estimulação com fMLP. Os valores dosados foram inferiores ao basal produzido pela célula, uma vez que as medidas feitas nas amostras tratadas com a AGP foram inferiores ao grupo sem estímulo. Além disso, os dados mostraram que esse mecanismo é parcialmente independente do ácido siálico, já que proteína desialilada também inibiu essa produção. Os grupos onde os neutrófilos foram tratados com 0,1; 0,5 ou 1 mg/ml de AGP ou dAGP demonstraram uma produção de ROS inferior ao controle. No entanto, quando comparamos os grupos tratados com a AGP com os tratados com a dAGP nas mesmas concentrações, observamos uma diferença nessa produção. Aparentemente, o efeito da AGP sobre a formação de ROS é mais intenso do que o da sua variável sem o ácido siálico.

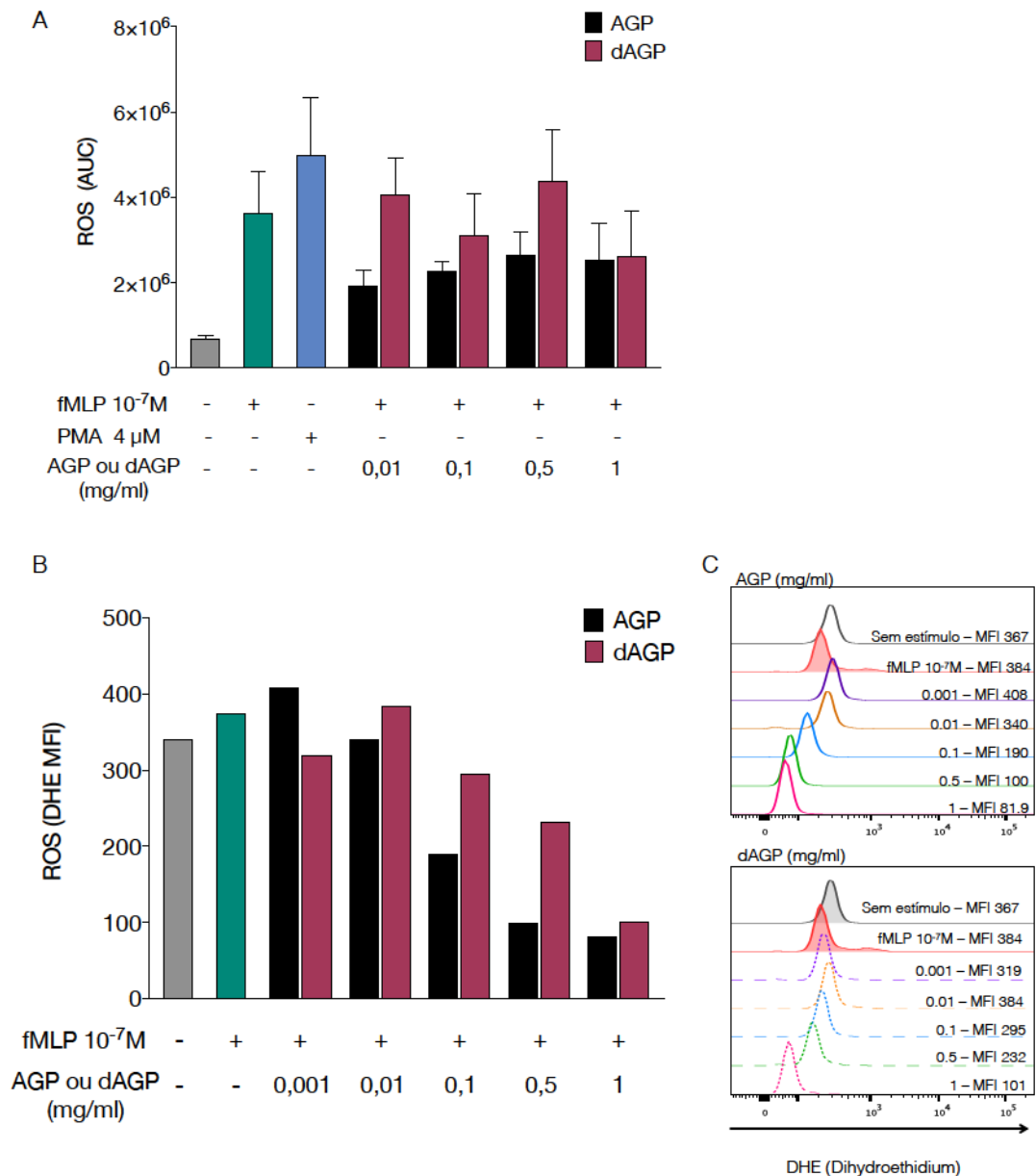


Figura 19- A AGP e a dAGP inibem a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo fMLP. Neutrófilos tratados com AGP ou dAGP por 40 minutos foram estimulados com fMLP $10^{-7}M$ por 30 minutos. **(A)** Área sobre a curva da produção de ROS obtida pelo método colorimétrico Luminol. Como controle foi utilizado o PMA (do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) que induz o aumento de ROS via PKC. Resultados expressos como média \pm EPM das medidas; ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. **(B)** Gráfico do MFI obtido por citometria de fluxo utilizando a sonda DHE. **(C e D)** Histograma representativo da intensidade de fluorescência produzida por DHE em células tratadas com diferentes concentrações da proteína com e sem o ácido siálico. Para os experimentos foram adquiridos 20.000 eventos totais no citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

No entanto ao investigar a participação desse carboidrato utilizando anticorpos neutralizantes anti-Siglec-5 ou anti-Siglec-9, não observamos diferença. Os dados mostram que esse pré-tratamento dos neutrófilos com o os anti-Siglec-5 ou -9 não revertem a inibição induzida pela AGP (Figura 20).

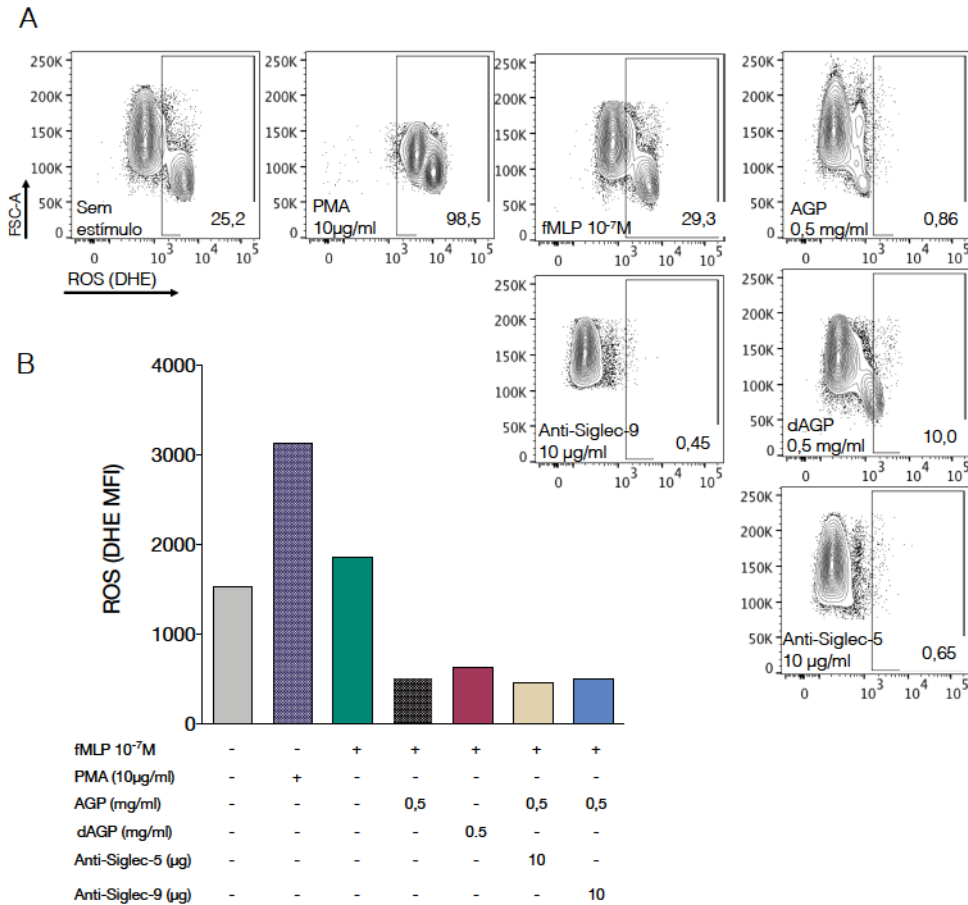


Figura 20- O pré-tratamento dos neutrófilos com o anticorpo neutralizante anti-Siglec-5 ou -9 não interfere na inibição induzida pela AGP ou pela dAGP. (A) Gráfico de pontos da porcentagem de células positivas e (B) Gráfico do MFI obtidos com o uso de 3 µM da sonda DHE. Os neutrófilos foram pré-tratados com anticorpo neutralizante anti-Siglec-5 ou -9 por 10 minutos, seguido do tratamento com AGP ou dAGP por 40 minutos e por fim incubados com fMLP $10^{-7}M$ durante 30 minutos. Após esse período, foram adquiridos 50.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSVerse®.

Levando em conta o contexto de ativação em que os neutrófilos se encontram durante um quadro de inflamação descontrolada, como no caso da sepse, procuramos investigar se o tratamento com a AGP seria capaz de suprimir a ativação dessas células. Para tentar reproduzir esse ambiente *in vitro*, os neutrófilos foram ativados com LPS, tratados com AGP ou dAGP e a produção de ROS induzida pelo estímulo com PMA (do inglês *Phorbol 12-myristate 13-acetate*). O uso do PMA nesse ensaio deve-se ao fato de que ele é um indutor direto da enzima PKC (proteína cinase C), e a ativação dessa enzima lidera a via de sinalização da qual decorre a maior produção de ROS.

Os resultados mostram que o tratamento com a AGP ou a dAGP inibiu a produção dessas espécies reativas (Figura 21).

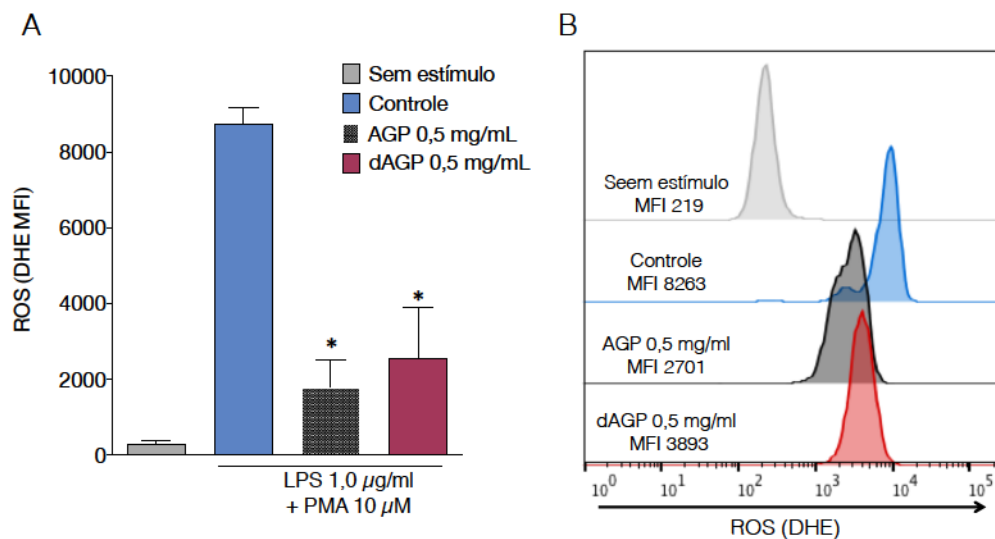


Figura 21- AGP inibe a produção de ROS em neutrófilos primados com LPS e estimulados com PMA. (A) Mediana da intensidade de fluorescência de ROS-DHE produzido por neutrófilos, de 3 doadores, primados ou não com LPS (1,0 µg/mL) por 2 horas e 20 minutos, seguido do tratamento por 40 minutos com AGP, dAGP ou sem tratamento (controle) e estimulados com PMA (10µM) por 10 minutos. Para esse experimento foram adquiridos 30.000 eventos totais no citômetro de fluxo BD FACSVerse ® (B) Histograma representativo das amostras de um dos doadores. Resultados expressos como média ± EPM das medidas **para $p < 0,01$ e ***para $p < 0,001$; ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey.

4.10 A AGP INIBE A VIA DE ATIVAÇÃO *INSIDE-OUT* DE INTEGRINAS β_2

Durante a quimiotaxia, a presença de integrinas β_2 são fundamentais para adesão da célula ao substrato. Receptores quimioatrativos além de direcionar a migração e induzirem a polimerização de actina, também ativam integrinas (ABRAM e LOWELL, 2009; SHAMRI e colab., 2005). Levando em conta que a AGP inibe a adesão em modelos *in vivo* e *in vitro* (MESTRINER e colab., 2007; SUMANTH e colab., 2019), e que a ativação do citoesqueleto está relacionada com a *via inside out* de ativação de integrinas (ANDERSON e colab., 2000), o próximo passo foi identificar quais seriam os efeitos da AGP sobre essas moléculas de adesão.

A ativação das integrinas β_2 está diretamente relacionada com sua conformação. A mudança de conformação induzida pela ativação da *via inside-out* interfere na sua afinidade pelo ligante, passando de um estado de baixa afinidade para o estado de afinidade intermediária e, em seguida, para o de alta afinidade (FAN e colab., 2016). Para fazer essa avaliação, a modulação conformacional das integrinas foi analisada em tempo real por citometria de fluxo utilizando dois anticorpos monoclonais (mAb), que juntos reportam em qual estado de ativação se encontram essas moléculas. O mAb KIM127 reconhece um epítipo localizado no joelho da integrina β_2 , que fica exposto somente quando a integrina está na sua conformação estendida (afinidade intermediária) (LU, C. e colab., 2001; ROBINSON e colab., 1992). Já o mAb24 liga-se a um epítipo β_2 *I-like domain* (*A domain*) que aparece somente quando esse assume sua conformação de alta afinidade (CHEN, Guo-Yun e BROWN e WU e KHEDRI e YU e CHEN e DE e colab., 2014; CONDLIFFE e colab., 1996) (Figura 15A).

Nesse ensaio, as células foram incubadas com AGP por quarenta minutos previamente às análises. Logo após, os anticorpos foram simultaneamente adicionados e os eventos foram adquiridos por um minuto. Em seguida, foi adicionado o estímulo fMLP e a ativação das integrinas foi registrada. Para o mAb24, o gráfico da cinética de ativação (Figura 22B) mostra que a presença da AGP no meio reduz a sua ligação aos neutrófilos quando comparada com o controle. A fluorescência adquirida para o mAbKIM127 também aparenta ser menor nas amostras tratadas com a AGP (Figura 22C). Quando calculada a variação da fluorescência durante a cinéticas observamos uma redução dessa no grupo de neutrófilos tratados com a AGP, contudo essa redução só foi significativa para o mAb24.

Com isso, os resultados mostram que a AGP inibe a ativação de integrinas, impedindo a mudança para a conformação de maior afinidade pelo ligante.

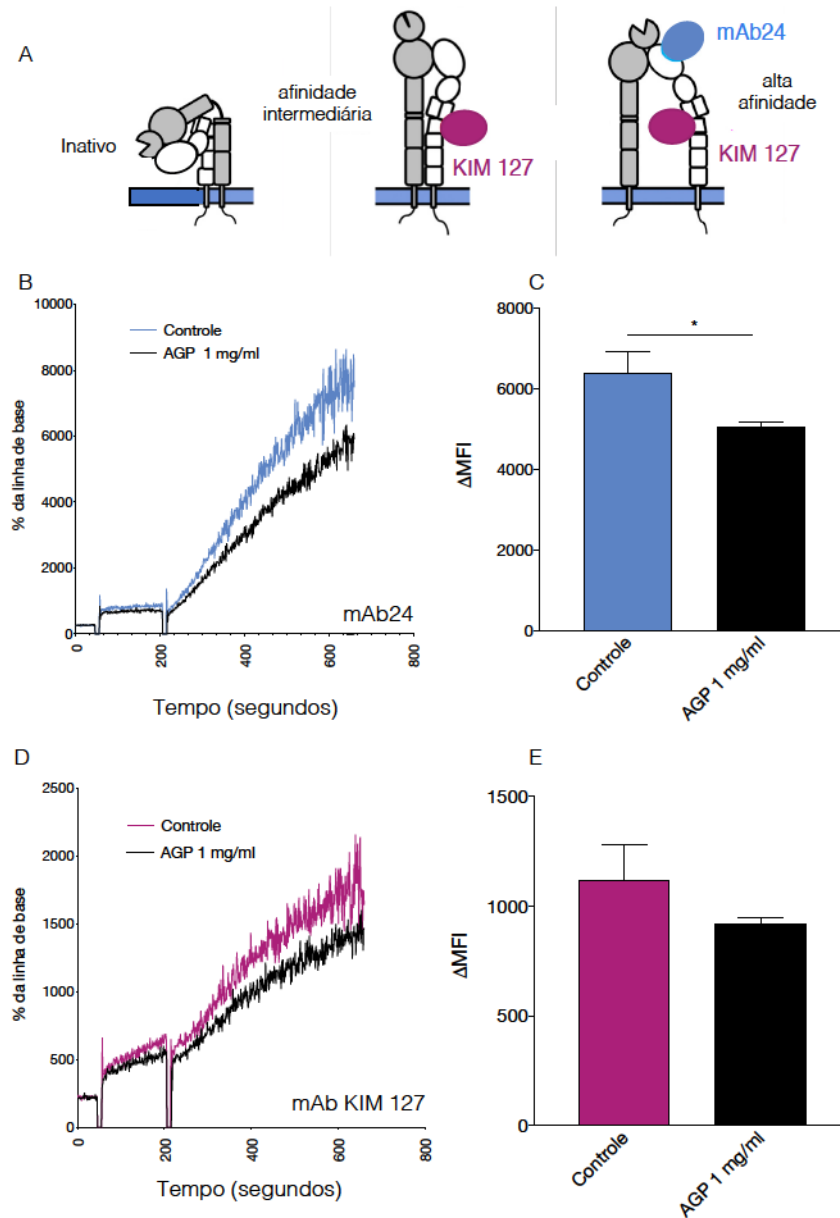


Figura 22- A AGP inibe a ativação de integrinas β_2 . (A) Esquema representativo do local de interação dos anticorpos com as integrinas β_2 , adaptado de (FAN e colab., 2019). Mediana da intensidade de fluorescência relativa à linha de base para o mAb24-Alexa Fluor 488 (B) e mAbKIM127-DyLight 550 (D) adquirida por 10 minutos após a adição de fMLP 10^{-7} M (concentração final). As células ($2,5 \times 10^5$ células/ml) foram previamente tratadas com AGP 1 mg/ml por 40 min (TA), ou não tratadas (controle). A linha de base foi adquirida por 30 segundos antes da adição do anticorpo (0,5 μ g/ml concentração final), após os eventos foram registrados por mais 3 minutos. Somente após esse período foi adicionado o estímulo. Gráfico da Δ MFI (MFI dos valores de fluorescência dos primeiros dez segundos após adição do anticorpo subtraídos do MFI dos últimos dez segundos registrados), (C) referente ao mAb24 e (E) ao mAbKIM127. Resultados representativos de 2 experimentos distintos, expressos como média \pm EPM das medidas adquiridas em triplicata **para $p < 0,01$ e ***para $p < 0,001$; teste t de Student's.

5 DISCUSSÃO

A ativação descontrolada e prolongada dos neutrófilos durante o processo inflamatório pode causar danos em células saudáveis. Conseqüentemente, a ativação dessa população celular deve ser finamente controlada para evitar a perda da função tecidual. Uma das funções dos neutrófilos que passa por um controle rígido e orquestrado é a migração celular. Essa regulação ocorre através da expressão de quimiocinas, moléculas de adesão e seus receptores/ligantes não só nos neutrófilos, mas também nos tecidos adjacentes envolvidos como, por exemplo, o endotélio e a matriz extracelular. A chegada dos neutrófilos até o foco inicial da inflamação ocorre através de uma série de eventos sequenciais. Dentre esses, a quimiotaxia desenvolve papel fundamental, pois é responsável por guiar essas células até o local da inflamação.

Em paralelo ao recrutamento dos neutrófilos, a resposta inflamatória desencadeia uma série de outros eventos, tais como o aumento da produção de proteínas secretadas pelo fígado, as chamadas proteínas de fase aguda. Algumas dessas proteínas têm características imunomodulatórias inibitórias, como é o caso da AGP, que inibe a chegada dos neutrófilos até o foco da infecção, atuando nas etapas de rolamento e adesão *in vivo e na* quimiotaxia *in vitro* (LAINÉ e colab., 1990b; MESTRINER e colab., 2007). Os mecanismos envolvidos nessa resposta inibitória, contudo, ainda não foram esclarecidos.

As propriedades inibitórias da AGP sobre as etapas de rolamento e adesão foram demonstradas por Mestriner et al. em 2007 (MESTRINER e colab., 2007). Nesse estudo, a análise da migração dos neutrófilos induzida pela carragenina, em tecido mesentérico de ratos, mostrou que o número de neutrófilos aderidos ao endotélio, assim como a taxa de rolamento dos mesmos foi reduzida de maneira significativa quando esses animais foram pré-tratados com AGP (4µg/rato) (MESTRINER e colab., 2007). No ambiente *in vivo*, porém, não é possível discernir se os efeitos observados sobre o rolamento e adesão decorrem de uma ligação da AGP sobre o endotélio ou se sua ação é de fato sobre os neutrófilos. Como o trabalho compreende entender as bases moleculares dessa inibição, achamos que seria interessante trabalhar com um modelo menos complexo que nos permitisse excluir algumas variáveis. Além disso, essa relação não havia sido investigada em células humanas que, pela sua biologia diversa da dos roedores, poderia nos dar respostas diferentes.

Assim, iniciamos o nosso trabalho investigando se a AGP também possui a capacidade de inibir o rolamento de neutrófilos humanos *in vitro*. Para isso, os neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico e tratados com AGP antes de serem submetidos ao ensaio de rolamento. Para esse ensaio as células foram perfundidas em uma câmara microfluidica

revestida com quimeras de P-selectina humana e a força de cisalhamento (*shear stress*) foi inferida por um fluxo de 6 dyn/cm². Como demonstrado na figura 7, o número de células que aderiram ao substrato reduziu significativamente quando os neutrófilos foram tratados com a AGP. Da mesma forma, o número de células capazes de rolar sobre a P-selectina, nesse grupo, também foi inferior ao do grupo controle.

Os ligantes de selectinas, como a AGP e a PSGL-1, são proteínas glicosiladas com oligossacarídeos específicos na sua estrutura. Uma das conformações apresentadas por esses sacarídeos se dá na forma do tetra sacarídeo Sialyl Lewis X (sLeX) (Figura 4). Durante o processo inflamatório, ocorre uma mudança no padrão de glicosilação da AGP, e dentre as modificações mais comumente encontradas está o aumento desses epítomos de sLeX (DE GRAAF e colab., 1993; HIGAI e colab., 2003; LEVANDER e colab., 2009; MACKIEWICZ e MACKIEWICZ, 1995). Em função disso, a literatura sugere que a presença de epítomos sLeX na estrutura da AGP possa inibir a etapa de rolamento dos neutrófilos por meio de uma competição com os ligantes das selectinas (JØRGENSEN e colab., 1998) impedindo, conseqüentemente, que a interação entre o leucócito e o endotélio seja formada. No entanto, em nosso ensaio de rolamento os neutrófilos foram lavados após tratamento com a AGP e essa não entrou em contato com a P-selectina, sugerindo assim que a inibição compreenderia outras propriedades que não apenas a interação física entre essas moléculas. Além disso, a AGP diminui a expressão de L-selectina em neutrófilos (MESTRINER e colab., 2007), sugerindo que o efeito inibitório não esteja ocorrendo por meio do bloqueio estérico dessa selectina, mas provavelmente induzindo um efeito intracelular. Outro indício está relacionado com a expressão de Siglec-5, uma vez que os neutrófilos de roedores não expressam esse receptor. E como demonstrado, a AGP liga com baixa afinidade em Siglec-9 e não liga em Siglec-E, sua ortóloga em camundongos (Figura 11C e D), o que indica que outros sítios de ligação, como o endotélio, estejam envolvidos na inibição do rolamento das células de camundongos.

Independente da etapa da migração em que os neutrófilos se encontrem, uma migração eficaz depende de uma quimiotaxia funcional. Assim, desde a etapa do rolamento, é a quimiotaxia que conduz a célula durante todo o percurso até o foco da inflamação. Mesmo que aparentemente a influência da AGP na migração dos neutrófilos esteja bem estabelecida, os mecanismos referentes a quimiotaxia, que aparentemente são distintos dos propostos para o rolamento, também não foram esclarecidos. Nesse contexto, supomos que a inibição ocorreria a nível molecular, envolvendo mecanismos específicos dessa resposta, e não da migração como um todo. Já foi demonstrado que a AGP inibe a quimiotaxia em resposta ao fMLP e ao IL-8 (LAINÉ e colab., 1990a; MESTRINER e colab., 2007; VASSON, M P e colab., 1994). Assim,

consideramos relevante reproduzir os experimentos da literatura, a fim de avaliar em uma curva concentração resposta a quantidade de AGP necessária para suprimir a resposta quimiotática da célula ou induzir uma resposta inibitória (Figura 9A).

Para isso, optamos por utilizar o fMLP como quimioatrativo, já que ele está diretamente relacionado com a inflamação decorrente de infecções ou dano tecidual (MCDONALD e colab., 2010). Além disso, a hierarquia entre as moléculas quimioatrativas estabelece uma preferência das células em migrar em direção ao fMLP ao IL-8, sugerindo maior potência quimioatrativa do mesmo (HARRIS e colab., 2012). Em nossos estudos tratamos os neutrófilos com diferentes concentrações de AGP antes deles serem submetidos ao ensaio de quimiotaxia. Optamos pelo pré-tratamento com base em resultados do nosso grupo, os quais demonstraram que em modelo de sepse o pré-tratamento de animais com AGP inibe a migração dos neutrófilos até o foco da infecção (MESTRINER e colab., 2007).

A curva dose resposta mostrou que concentrações entre 0,1 e 1 mg/ml de AGP são suficientes para inibir a quimiotaxia frente ao fMLP. Essas concentrações correspondem àquelas encontradas no soro, tanto em pacientes saudáveis (0,5 mg/ml), quanto durante a resposta inflamatória (aproximadamente 2 mg/ml - no caso de sepse ou o que varia de indivíduo para indivíduo) (HIGAI e colab., 2005). No entanto, os valores mais baixos ou dentro dos níveis encontrados em indivíduos saudáveis (<0,5 mg/ml), sugerem um outro papel além daquele de controlar a ativação excessiva da célula durante uma resposta inflamatória descontrolada. Valores dentro dessa faixa estariam relacionados com um papel regulatório da proteína, contribuindo para a manutenção do estado quiescente da célula. Corroborando essa possibilidade, nossos resultados de *binding* demonstraram que baixas concentrações de AGP são suficientes para a interação com os neutrófilos (Figura 10). Outro indício é o fato de que além de ser produzida no fígado, a proteína é também liberada no local da inflamação por diferentes tipos celulares, como os próprios neutrófilos, e concentrações até 100 vezes abaixo das fisiológicas são suficientes para induzir uma resposta intracelular (GUNNARSSON e colab., 2007; SUMANTH e colab., 2019)

Vale lembrar que nos ensaios descritos neste trabalho, o nível de detecção de LPS na AGP foi de somente 0,069 ng/ml (< 1 EU/ml). Segundo a literatura, essa concentração não seria suficiente para inibir a migração dos neutrófilos, que ocorre com doses acima de 1 µg/kg administradas i.v. *in vivo* (TAVARES-MURTA e colab., 2001), e *in vitro* são necessários aproximadamente 10 µg/ml para inibir a quimiotaxia em resposta a IL-8 (ARRAES e colab., 2006; SOUTO e colab., 2011).

De acordo com a literatura, o ácido siálico da AGP desenvolve um papel central na modulação de algumas atividades da célula (BENNETT e SCHMID, 1980; GUNNARSSON e colab., 2010; LIU e colab., 2014), no entanto, o envolvimento desse carboidrato na quimiotaxia dos neutrófilos não havia sido verificado. Para esse fim, utilizamos uma AGP da qual foram retirados os grupamentos de ácido siálico, a qual nos referimos como AGP desialilada (dAGP). A clivagem desse carboidrato se deu pela ação de uma neuraminidase/sialidase, isolada de *Clostridium perfringens*, que cliva o ácido siálico preferencialmente nas posições α -2-3 > α -2-6; α -2-8.

A retirada do ácido siálico resultou na reversão da sua atividade inibitória sobre a quimiotaxia de aproximadamente 30% em relação à inibição induzida pela AGP sialilada, confirmando, assim, a importância dos resíduos de ácido siálico da AGP na inibição da quimiotaxia de neutrófilos. A reversão parcial do efeito inibitório pode ser decorrente do uso de uma concentração de dAGP muito elevada devido a baixa sensibilidade do método de utilização (BCA) para aferição da concentração das duas proteínas após o processo de retirada do ácido siálico. Concentrações muito altas de dAGP poderiam ligar em sítios não específicos como os demonstrados nos resultados que avaliaram a produção de ROS, nos quais apenas as concentrações mais elevadas da proteína (0,5 e 1 mg/ml) inibem a produção dessas espécies reativas. Além disso, esse efeito parcial pode ser devido a uma desialilação incompleta. Com relação a desialilação, de fato não podemos afirmar que ocorreu de forma completa, pois a confirmação da retirada do ácido siálico foi feita apenas com a lectina de *Sambucus nigra*. Essa lectina detecta o ácido siálico estruturado na posição α -2,6, e não nas posições α -2,3 ou α -2,8 que também estão presentes na estrutura da AGP. Assim, possíveis resíduos do carboidrato que permaneceram na AGP seriam responsáveis pela taxa de inibição remanescente. Os neutrófilos dispõem de uma gama de outros receptores inibitórios em sua superfície, que reconhecem o ácido siálico. Esses receptores poderiam interagir com o ácido siálico remanescente e induzir uma resposta intracelular. São exemplos os receptores da família PILRa, que são capazes de reconhecer diversos ligantes sialilados e cuja afinidade pelo ácido siálico é ainda maior do que a das Siglecs (LU, Qiong e colab., 2014; WANG e colab., 2013).

Diferente do rolamento em que o provável mecanismo inibitório da AGP seja por um impedimento estérico entre as selectinas e seus ligantes, o perfil de resposta obtido na quimiotaxia sugere que a atividade da AGP esteja ocorrendo através da inibição de receptores ativatórios, como os receptores de fMLP. Estudos já relataram que a AGP se liga na superfície das células como macrófagos, eritrócitos, adipócitos, hepatócitos, células epiteliais e também neutrófilos (HOICHEPIED e colab., 2003; MESTRINER e colab., 2007). Conforme

demonstrado em ensaio de *binding*, a AGP se liga de forma concentração-dependente em neutrófilos humanos (Figura 8). Observamos que essa interação ocorre em baixas concentrações da proteína, que demonstrou ter afinidade pela célula até em concentrações nanomolares (531 nM). Como já mencionado, esses resultados apontam para um papel local da AGP, onde pequenas concentrações seriam suficientes para induzir uma resposta inibitória, e contribuir para conter a célula em seu estado de repouso.

Para testarmos a especificidade dessa ligação foi feito um ensaio de competição utilizando uma AGP marcada e outra não marcada (Figura 8B). A adição de concentrações crescentes de proteínas não marcadas desloca a ligação da AGP-AF488 com a célula, demonstrando uma competição pelo sítio e assim descartando uma ligação inespecífica. Partimos da ideia de que o ácido siálico é importante na inibição da quimiotaxia, e que as interações entre os carboidratos e as proteínas que os reconhecem são normalmente específicas. Essa especificidade é definida por diversos fatores, entre eles a estrutura do carboidrato terminal e o tipo de ligação feita com o carboidrato subsequente. Sendo assim, pequenas mudanças no ligante são capazes de extinguir tal especificidade e por isso impedir a ligação com a lectina (VARKI, 1997; VARKI e colab., 2009) .

De maneira contrária, quando avaliamos essa ligação, observamos que a interação AGP-neutrófilo ocorre também na ausência do ácido siálico (Figura 8D). De fato, tanto a proteína sem o resíduo, quanto a proteína em seu estado íntegro, ligam-se aos neutrófilos com a mesma afinidade. Porém, essa ação não descarta a hipótese de que a ligação com o neutrófilo ocorra através desse glicano, mas sugere a existência de mais de um sítio de ligação. A retirada do ácido siálico expõem o carboidrato subjacente, no caso a galectina. Por exemplo, a desialilação de plaquetas durante a sepse causada por *S. pneumoniae* expõe seus resíduos de galactose, levando ao *clearance* dessas células pela ligação com receptores Ashwell (receptores de asialoglicoproteínas) em macrófagos residentes no fígado (GREWAL e colab., 2008). Além das plaquetas, durante a sepse ocorre a desialilação de fosfatases alcalinas, as quais são depuradas rapidamente do plasma pelos mesmos receptores Ashwell. Uma das funções descritas para essas fosfatases alcalinas é a detoxificação do LPS, dessa forma, a menor concentração de fosfatases alcalinas contribuem para as altas concentrações de LPS circulante e piora do quadro de sepse (YANG e colab., 2018). Receptores de asialoglicoproteínas já foram descritos em macrófagos e monócitos (HARRIS e colab., 2012) mas não em neutrófilos.

Conforme demonstramos, a capacidade da AGP de se ligar ao Siglec-5 depende da presença do ácido siálico em sua estrutura (Figura 11A). Os ácidos siálicos são conectados ao açúcar subsequente via uma ligação glicosídica no seu carbono 2' e na posição 3' ou 6' do

resíduo de galactose subjacente. Essa pequena mudança na posição de ligação na galactose confere a seletividade de ligação a diferentes proteínas. Tanto a Siglec-5 quanto Siglec-9, têm boa afinidade pela disposição do grupamento de carboidratos presentes em maior quantidade na estrutura da AGP: Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-4GlcNAc β 1- (Figura 3). A Siglec-5, no entanto, tem uma afinidade levemente maior por essa disposição de carboidratos que a Siglec-9 (BLIXT e colab., 2003), o que poderia explicar os resultados que observamos (Figura 11B). Além disso, a natureza da matriz que liga esse grupamento de carboidratos interfere na afinidade das Siglecs em função das possíveis interações estéricas. Pode ser que a AGP apresente o ácido siálico de uma maneira que favoreça a ligação à Siglec-5 e não à -9 (BLIXT e colab., 2003). Além disso, algumas Siglecs, como a Siglec-9, têm uma maior seletividade por sítios sialilados que contêm, além do ácido siálico, um ânion de sulfato, sendo a posição do sulfato determinante para essa especificidade (CAMPANERO-RHODES e colab., 2006; CROCKER e colab., 2007)

A ligação de carboidratos com proteínas/lectinas é seletiva, no entanto, apresenta uma baixa afinidade com o ácido siálico nas posições (Neu5Ac) α 2-3 e α 2-6, variando na faixa de micromolar a milimolar (Kd de 0,1-3 mM) (BLIXT e colab., 2003; MACAULEY e colab., 2014) Assim, para estabelecer uma afinidade de relevância biológica, as proteínas que se ligam aos carboidratos, de maneira geral, apresentam mais de um sítio de ligação e a capacidade de se associarem espontaneamente na membrana plasmática formando multímeros (VARKI e colab., 2009). Isso de fato foi confirmado em nossas análises de bioinformática que demonstram que a AGP pode interagir com até 4 moléculas de Siglec-5. As Siglecs normalmente dispõem-se na membrana em forma de dímeros com uma alta probabilidade de formação de *clusters* (VARKI e colab., 2009).

No mais, nossos resultados demonstraram que AGP também liga-se em Siglec-2 (Figura 11C). A Siglec-2 é altamente expressa em linfócitos B e tem uma forte preferência por estruturas que contenham Neu5Ac α 2-6Gal (POWELL e colab., 1993). Um possível papel dessa interação nessas células seria o de contribuir para manter o estado de repouso dos linfócitos durante uma resposta imune inata (GAHMBERG e ANDERSSON, 1978). O aumento da concentração de AGP durante a fase aguda ajudaria a manter essas células em seu estado não ativado para uma resposta inflamatória eficaz. A AGP se liga à superfície de linfócitos e, na concentração de 1 mg/ml, suprime sua mitose induzida por fitohemaglutinina (SINGH e HUGH FUDENBERG, 1986). Os neutrófilos não expressão Siglec-2 (TORRES e colab., 1992) por isso o envolvimento dessa Siglec não foi investigado nesse trabalho.

De acordo com os nossos resultados, Gunnarsson e colaboradores demonstraram que a AGP se liga a Siglec-5 de maneira dependente aos seus resíduos de ácido siálico

(GUNNARSSON e colab., 2007). Nesse mesmo estudo foi demonstrado, em ensaio de mobilização de cálcio, que a AGP pode ativar uma cascata de sinalização intracelular em células primadas (GUNNARSSON e colab., 2007). Outra evidência da ligação AGP-Siglec pode ser sugerida fazendo um paralelo entre a estrutura da AGP e os ligantes de selectinas. Com base na sua estrutura e na disposição do ácido siálico no grupamento de carboidratos, a AGP estaria inibindo o rolamento através de uma competição com os ligantes de P-selectinas. Dito isso, um estudo demonstrou, que Siglec-5 solúveis inibem o rolamento de neutrófilos sobre P-selectina *in vitro*, além de prevenir o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação *in vivo*, nos modelos de inflamação estéril induzido por TNF (PEPIN e colab., 2016). Isso mostra uma semelhança na afinidade da AGP com os ligantes de P-selectina compartilhando um mesmo sítio de ligação que seria então reconhecido pela Siglec-5.

O perfil de interação AGP-neutrófilo obtido neste estudo, assim como a ligação da AGP ao receptor solúvel Siglec-5-FC, por meio do ácido siálico, e a dependência desse carboidrato na inibição da quimiotaxia induzida pela AGP, apontam para uma atividade dependente da ativação desse receptor inibitório. Além disso, a ativação de Siglecs também pode induzir endocitose. Reconhecidos por serem receptores rapidamente endocitados após adesão a ligantes sialilados ou anticorpos, as Siglecs também têm a propriedade de induzir a endocitose de outros receptores do sistema (ANGATA, Takashi e colab., 2015; BIEDERMANN e colab., 2007). Por exemplo, para que ocorra a endocitose de receptores TLR4 após ligação com a *E.coli* é necessária a presença da Siglec-9, e a desialilação desse TLR impede sua endocitose (WU e colab., 2016).

Uma modulação do receptor FPR1 induzida pela AGP levaria a uma diminuição desses receptores na superfície, a qual explicaria o menor número de células no ensaio de quimiotaxia no grupo tratado com a proteína. Entretanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento das células com a AGP não mudou a expressão do FPR1 (Figura 12A e C). O tratamento das células com fMLP induziu uma endocitose do seu receptor e a presença da AGP não interferiu nesse perfil de expressão, descartando o seu envolvimento na endocitose do receptor (Figura 12B).

Quando dessensibilizado, o receptor pode ser internalizado ou permanecer na membrana, mas se torna refratário ao estímulo. Os receptores dessensibilizados não respondem ao seu ligante, prevenindo uma superativação ou terminando a resposta celular. Receptores acoplados à proteína G, como o receptor do fMLP, o FPR1, podem ser modulados por uma série de moléculas exógenas ou endógenas (WOOTTEN e colab., 2013). A ligação do fMLP ao seu receptor pode induzir dessensibilização homóloga, quando ocorre diretamente no sítio

ativo do receptor pelo seu ligante. Além disso, essa dessensibilização pode ser heteróloga quando induzida por diferentes receptores como, por exemplo, após a ativação dos receptores C5aR, CXCR2 e CCR1 (ALI, Hydar e colab., 1999; BEDNAR e colab., 2014). Ainda, a dessensibilização pode ser alostérica, onde o modulador se liga em um sítio diferente do ocupado pelo ligante e estabiliza o receptor em uma conformação inativa (LANE e colab., 2013; VAN DER WESTHUIZEN e colab., 2015).

Como não foi observada uma diferença na expressão do receptor do fMLP, o efeito da inibição da quimiotaxia pela AGP poderia estar ocorrendo via dessensibilização do receptor. Uma das maneiras de avaliar a funcionalidade do FPR1 é pela mobilização de cálcio intracelular. O cálcio é um segundo mensageiro envolvido em uma gama de eventos celulares. A ativação de receptores FPR1 induz diferentes vias de sinalização, entre elas a que leva à mobilização de cálcio para o citoplasma proveniente de seus estoques no retículo endoplasmático. Não observamos interferência da proteína na mobilização de cálcio induzida pelo fMLP, sugerindo que o efeito inibitório da AGP não dependa da mobilização de cálcio intracelular (Figura 13). A indução da via que culmina com a abertura e liberação de cálcio intracelular não foi afetada, uma vez que as concentrações obtidas em nossos resultados não diferem entre os grupos e foram consistentes entre os diferentes métodos de dosagem utilizados. Esses achados diferem do protocolo descrito na literatura onde as células eram primeiramente primadas com um anticorpo anti-L-selectina, e então, a AGP era utilizada como um segundo estímulo, o que resultou em um aumento transitório de cálcio intracelular. Esse trabalho demonstrou que a AGP é capaz de induzir a liberação de cálcio em neutrófilos primados, mas não em neutrófilos em repouso. Vale lembrar ainda, que o *priming* que gerou o estímulo positivo reportado na literatura é dependente exclusivamente da ativação por L-selectina, dado que esse efeito não foi observado quando as células foram primadas com o fMLP, ou com integrinas do tipo β -2 (anti- CD18) (GUNNARSSON e colab., 2007). Em nossos resultados, a AGP não induziu um aumento de cálcio intracelular nos neutrófilos em repouso, corroborando com o estudo referido acima.

Evidências indicam que durante a quimiotaxia a participação desse íon é secundária e muitas vezes dispensável (FRANCIS e HEINRICH, 2018). Sendo assim, nossos resultados convergem ao mostrar que a atividade da AGP sobre a quimiotaxia não é decorrente da modulação das vias do cálcio, pois suprimir a ativação da PLC não seria suficiente para atingir a resposta inibitória apresentada em nossos resultados (LI, Z., 2000).

Já a polimerização da actina é um evento essencial e indispensável para que a célula se movimente. Durante a quimiotaxia a célula sente o gradiente quimiotático, polariza e move-se

em direção a esse atrativo. Os movimentos quimiotáticos dependem do rearranjo do citoesqueleto da célula que decorre da polimerização da actina. Após ativado, o receptor de fMLP inicia uma cascata intracelular que favorece a formação de filamentos de actina-F, os quais se acumulam no córtex frontal da célula, direcionando seus movimentos. Isso posto, foi investigada a ação da AGP sobre a formação desses polímeros nos neutrófilos estimulados com fMLP. Após o tratamento com a proteína, concluímos que as mesmas concentrações que inibiram a quimiotaxia também inibiram a polimerização de actina (Figura 14). Os grupos que receberam a AGP polimerizaram menos actina que o grupo controle, e a inibição aconteceu de forma dependente da concentração de proteína adicionada.

Até o momento, a atividade da AGP sobre a migração dos neutrófilos ainda não havia sido correlacionada com a polimerização de actina. Nós ainda demonstramos que a presença do ácido siálico na estrutura da AGP é fundamental para sua ação inibitória (Figura 15). Da mesma forma que nos ensaios de quimiotaxia, a retirada desse carboidrato suprime a atividade imunomodulatória da AGP, a qual perde sua capacidade de intervir no rearranjo do citoesqueleto em todas as concentrações testadas. A importância do ácido siálico da AGP foi demonstrada por nós e também evidenciada em estudos de agregação de plaquetas e de leucócitos, assim como na já mencionada indução de cálcio intracelular dependente de Siglec-5 (COSTELLO e colab., 1984; DIRIENZO e colab., 1987; GUNNARSSON e colab., 2007). Sendo assim, nós estudamos a hipótese de que o bloqueio da interação Siglec-5-AGP seria suficiente para reverter a modulação inibitória da AGP sobre a resposta dos neutrófilos. De fato, nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dessas células com o anticorpo anti-Siglec-5 bloqueou a ação da AGP impedindo sua atividade inibitória sobre a polimerização de actina induzida pelo fMLP (Figura 16).

Como demonstrado neste trabalho, a ligação da AGP com a Siglec-9 é uma ligação fraca e provavelmente de baixa afinidade. Consistente com esses resultados, a neutralização dos receptores Siglec-9 não reverteu a atividade inibitória sobre a formação de F-actina (Figura 17). Demonstrando que as atividades imunomodulatórias da AGP sobre a polimerização de actina decorrem da sua interação com Siglec-5 de forma dependente do ácido siálico. A relação aqui descrita parece estar de acordo com a biologia desses receptores, dado que os domínios ITIM presentes em sua estrutura exercem uma regulação negativa sobre as células do sistema imune. A ativação do domínio ITIM recruta fosfatases da família das Src cinases como a SHP-1 e SHP-2. Essas fosfatases inibem as proteínas envolvidas na sinalização ativada por outros receptores (AVRIL e colab., 2004).

Além da quimiotaxia, a polimerização da actina é importante para que diferentes eventos celulares ocorram, como a degranulação, a divisão celular e a fagocitose. A fagocitose é um processo onde as células fagocíticas, como os neutrófilos, internalizam microrganismos, células mortas e restos celulares presentes no meio. Para que isso ocorra, a célula depende do remodelamento do seu citoesqueleto e da membrana plasmática. De modo geral, a polimerização dos filamentos de F-actina nas extremidades da célula, que ocorre após o reconhecimento do patógeno ou da partícula a ser ingerida, resulta em protusões na membrana. A internalização do alvo ocorre quando essas protusões englobam o alvo reconhecido formando o fagossomo, que após maturação funde-se com o lisossomo formando o fagolisossomo. O resultado desse processo é a acidificação e formação de um meio com capacidade oxidativa e de degradação (FAIRN e GRINSTEIN, 2012). Utilizando *E. coli* conjugadas com fluoróforo sensível ao pH (pHRodo-*E. coli* *Bioparticles*) testamos a capacidade de fagocitose dos neutrófilos tratados, ou não, com a AGP. A capacidade fagocítica foi verificada utilizando tanto bactérias opsonizadas, quanto não opsonizadas (dados não mostrados), sendo assim descartamos o uso da opsonização prévia nos experimentos, com intuito de diminuir o número de interferentes.

Os resultados apresentados demonstraram que independente da concentração de AGP utilizada não houve mudança no número de células capazes de fagocitar, nem na quantidade de partículas fagocitadas (Figura 18). Esses achados diferem dos relatos anteriores da literatura, no entanto, as condições experimentais não foram as mesmas que as utilizadas por nós, assim como as técnicas utilizadas que não permitem diferenciar com clareza se a bactéria estaria ancorada à célula ou de fato no seu interior, diferentemente da técnica utilizada neste trabalho. Além do mais, os resultados referentes à inibição pela AGP da fagocitose em neutrófilos humanos induzida por *Escherichia coli* foi atribuído a um efeito sobre a bactéria e não sobre o neutrófilo em si, pois nesse estudo a AGP foi incubada com a bactéria antes de ser introduzida no meio celular, e o autor sugere uma ação da AGP sobre a opsonização da bactéria, impedindo que essa ocorra e assim inibindo a fagocitose (VAN OSS e colab., 1974). Ainda, a sua inibição sobre a fagocitose de neutrófilos bovinos e felinos foi relatada utilizando *Escherichia coli* opsonizada, o que difere das condições do nosso trabalho (LECCHI e colab., 2013). Contudo, corroborando com nossos resultados, um estudo demonstrou que a AGP não inibe a fagocitose de *Estafilococos aureus* de neutrófilos isolados (RINALDI e colab., 2008).

A fagocitose de microrganismos pelos neutrófilos ocorre através de receptores que são ativados após interação com o patógeno, de forma direta, ou não. Os receptores em células fagocíticas podem ser divididos nos que reconhecem os patógenos opsonizados e nos que não

necessitam dessa etapa para o início da fagocitose. Receptores não opsônicos podem identificar diretamente moléculas presentes na superfície ou secretadas pelos micro-organismos. Já os opsônicos, dependem da produção pelo hospedeiro de moléculas como, por exemplo, componentes da cascata do complemento, fibronectina, lectinas e anticorpos, as quais se ligam à superfície do invasor, sinalizando para a fagocitose (URIBE-QUERO e ROSALES, 2017).

Ambas, a fagocitose e a quimiotaxia, dependem de uma polimerização de actina específica e localizada para completar sua ação. Sendo assim, seria de se esperar que essas duas respostas compartilhassem muitas das etapas da cascata de sinalização que culmina com a formação de F-actina, entretanto, as vias de sinalização intracelulares que induzem a polimerização de actina pela fagocitose não ocorrem através da ativação de receptores GPCR. A ativação de receptores do tipo TLR e GPCR não é suficiente para iniciar o processo de fagocitose, sua função seria a de facilitar a ativação de receptores específicos envolvidos na fagocitose. Assim, a polimerização de actina induzida pela fagocitose e por fatores quimiotáticos ocorrem após ativação de receptores/ligantes distintos. A polimerização de actina iniciada por receptores fagocíticos ocorrem por meio da cascata intracelular induzida, por exemplo, por domínios ITAM (ativada por receptores FC) e cinases da família Src, as quais são distintas das vias induzida por receptores GPCR, as quais serão abordadas adiante. Porém, a certa altura essas vias convergem, o que pode explicar essa diferença na modulação da polimerização de actina da AGP sobre a quimiotaxia e não sobre a fagocitose. A AGP, por meio da ativação do domínio inibitório de Siglecs, pode estar suprimindo alguma das proteínas que se localizam *upstream* dessa convergência. Fazendo uma correlação, foi demonstrado que a AGP inibe a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos bovinos induzida por PMA, mas não interfere na produção induzida por receptores FC (STAKAUSKAS e colab., 2005).

Por outro lado, alguns trabalhos já demonstraram o envolvimento das Siglecs em inibir a fagocitose. A Siglec-E quando ativada em micróglia, inibe a fagocitose de restos neuronais e impede a formação de ROS estimulada por esses *debris* celulares (CLAUDE e colab., 2013), assim como, a ligação da GBP aos Siglec-5 e -9, em monócitos e macrófagos, que impede a fagocitose da bactéria aumentando sua sobrevivência (CARLIN e colab., 2009; CHANG e colab., 2014). Indo ao encontro dos nossos resultados, outros estudos mostraram que as Siglecs podem inibir a liberação de NETs sem interferir na taxa de fagocitose (KHATUA e colab., 2012).

A resposta de fagocitose dos neutrófilos está diretamente relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio. As moléculas de ROS podem ser liberadas no meio

extracelular no sítio da infecção, ou intracelular no fagolisossomo após a fagocitose do patógeno. A produção de espécies reativas de oxigênio é um dos principais mecanismos de defesa contra infecções por bactérias e fungos. Sua ação como agente antimicrobiano é fundamental, contudo quando age sobre as células do hospedeiro pode causar danos significativos que comprometem a função do tecido, por isso sua liberação é bem controlada. O envolvimento dos Siglecs em conter a liberação de ROS já foi demonstrado em animais Siglec-E^{-/-} e em células super expressando Siglec-5 (CARLIN e colab., 2009; CHANG e colab., 2014; CLAUDE e colab., 2013; ZENG e colab., 2017). Além disso, o aumento da longevidade de mamíferos também foi atribuído a um aumento da expressão das CD33r-Siglecs e a diminuição da formação de espécies reativas (SCHWARZ e colab., 2015).

Os efeitos da AGP sobre a produção de ROS foram relativamente bem investigados na literatura (GUNNARSSON e colab., 2010; MIRANDA-RIBERA e colab., 2010; RAHMAN e colab., 2008; STAKAUSKAS e colab., 2005; VASSON, Marie Paule e colab., 1994). Assim como nos nossos resultados, a literatura mostra que a AGP inibe de forma concentração dependente a produção de ROS induzida por fMLP em neutrófilos humanos (MATSUMOTO e colab., 2007). Mesmo que a diferença, observada por nós, entre as células não estimuladas e as células controle (estimuladas com fMLP) seja pequena nos ensaios realizados por FACS, a AGP parece inibir a produção de ROS basal da célula (Figura 19B). As altas concentrações de ROS presentes no grupo não estimulado podem ser em decorrência da ativação das células nesse experimento específico. O protocolo de isolamento dos neutrófilos requer a lise das hemácias, o que por si só pode ativar as células. A liberação do grupamento heme, assim como a retirada das hemácias do meio favorecem a ativação das células (LIZCANO e colab., 2017). Os neutrófilos expressam diversos grupos de receptores que podem levar à geração e liberação de espécies reativas, o que faz dos neutrófilos células facilmente estimuláveis. Através da técnica quimiluminescência (luminol), ainda que isolados e tratados seguindo exatamente o mesmo protocolo, podemos ver uma diferença clara entre os grupos sem estímulo e fMLP (Figura 19A). Nesse ensaio, os valores adquiridos nos grupos tratados com a AGP são também inferiores ao grupo fMLP, porém acima dos níveis basais observados nas células não estimuladas, diferentemente dos resultados obtidos por citometria. Além de serem experimentos realizados com doadores diferentes, as divergências observadas entre as técnicas podem ser atribuídas à diferença na sensibilidade das metodologias utilizadas e na reatividade das células durante o ensaio.

A ausência do ácido siálico na estrutura da AGP não foi suficiente para abolir a produção de ROS em concentrações altas. Em baixas concentrações a AGP também inibe a produção de

ROS mas não a dAGP. A participação da cadeia de carboidratos da AGP e o papel do ácido siálico sobre a inibição de ROS em neutrófilos não estão bem claros. Sua participação foi investigada em dois trabalhos diferentes e cada um apontou uma direção. Ambos os estudos foram realizados com neutrófilos humanos, no entanto a dependência do ácido siálico foi demonstrada utilizando *zymosan* como estímulo, enquanto as células estimuladas com fMLP ou PMA não demonstraram diferença entre a AGP sialilada e a desialilada (GUNNARSSON e colab., 2010; STAKAUSKAS e colab., 2005). Por mais que os resultados demonstrados apontem para uma inibição independente de ácido siálico, já que ambas as proteínas em concentrações equivalentes (0,5 e 1 mg/ml) inibiram essa resposta (Figura 19B), esses dados também nos mostram que a potência da dAGP em inibir essas espécies reativas é menor quando comparada com a AGP sialilada. Essa diferença nas concentrações também pode ter ocorrido por ligações em outros sítios não seletivas pela dAGP. Por outro lado, os resultados da figura 20 mostram que neutralizar os receptores Siglec-5/-9 não revertem o perfil inibitório da AGP sobre a produção de ROS pelos neutrófilos sugerindo que esse efeito seja independente da interação do ácido siálico com essas Siglecs. Além disso, a inibição pode estar ocorrendo através da ligação da AGP com outros receptores que também reconhecem esse carboidrato, como os receptores PILR.

A produção de espécies reativas de oxigênio está associado a regulação da quimiotaxia em neutrófilos (HATTORI e colab., 2010). Foi demonstrado que a inibição farmacológica de NADPH oxidase, ou ainda neutrófilos isolados de pacientes com doença granulomatosa, formam mais pseudópodes e perdem sua capacidade de direção frente a um gradiente quimioatrativo. Além disso, células HL-60 (neutrófilo-*like*) nocautes para a enzima NADPH possuem uma quimiotaxia ineficiente. Assim, a inibição da produção de ROS pela AGP também pode estar influenciando na sua ação inibitória sobre a quimiotaxia.

Para uma quimiotaxia eficiente, as células em migração devem aderir ao substrato para obterem a tração necessária para locomoção pelo tecido extravascular em direção ao foco inflamatório. Em neutrófilos humanos essa adesão vem basicamente das integrinas. A quimiotaxia dos neutrófilos é altamente dependente das integrinas da família $\beta 2$, como evidenciado em pacientes com LADI (*do inglês leucocyte adhesion deficiency type I*). Neutrófilos de pacientes com deficiência genética no CD18, que corresponde à subunidade $\beta 2$ da integrina, não fazem quimiotaxia e assim não chegam ao foco da inflamação. Os neutrófilos humanos expressam primordialmente duas integrinas pertencentes a essa família, as integrinas LFA-1 ($\alpha L\beta 2$; CD11 α /CD18) e Mac-1 (também conhecida como CR3, $\alpha m\beta 2$, ou CD11b/CD18) (WONG e colab., 2010) (HEIT e colab., 2005). A AGP também inibe a

expressão dessas moléculas de adesão. Como exemplo, a ação da AGP sobre monócitos bovinos diminui a expressão de CD18, mas não influencia a expressão de CD11b e CD47 em células tratadas com *zymosan* opsonizados (LECCHI e colab., 2008). Diferentemente, em células THP1 o tratamento com AGP inibiu a expressão basal e a expressão induzida por TNF das integrinas CD11a, CD11b, CD11c e CD49d. O papel da AGP sobre as integrinas também foi evidenciado em ensaios de adesão, onde ela inibe a adesão a um substrato gelatinoso induzida por LPS (agonista de TLR4), mas não a induzida por BLP (agonista de TLR2) (LAINÉ e colab., 1990b), além de inibir a adesão *in vivo* na cavidade peritoneal de ratos tratados com carragenina (MESTRINER e colab., 2007). Como a agregação celular também é dependente de integrinas (SIMON e colab., 1992), alguns estudos demonstraram que a AGP inibe a agregação dos neutrófilos de maneira concentração dependente quando esses são estimulados com fMLP (COSTELLO e colab., 1984).

Em um ambiente inflamatório a ativação das integrinas pode ocorrer pela ativação da via *inside-out* ou *outside-in* (ABRAM e LOWELL, 2009). Receptores quimioatrativos além de direcionarem a migração, induzirem a polimerização de actina e a produção de ROS, também ativam integrinas por meio da ativação da sua via *inside-out*. (MENARD e SNYDERMAN, 1993). A ativação dessa via depende do recrutamento de proteínas que conectam o citoesqueleto ao domínio citoplasmático da subunidade β da integrina, como a kindlin-3 e a talin-1 (RAJARATHNAM e colab., 2019). A ligação com a actina promove uma plataforma que aproxima as integrinas e favorece um *feedback* de ativação intracelular (BHOPALE e colab., 2015). Depois de recrutadas essas proteínas induzem uma mudança de conformação na parte extracelular dessas moléculas de adesão, permitindo uma maior afinidade com ligantes no substrato, além de favorecer sua mobilidade/deslocamento pela membrana plasmática, e a formação de *clusters* (KULKARNI e colab., 2011; USHA DEVI, 2000). Para avaliarmos a ativação dessa via, os neutrófilos foram pré-tratados com AGP e estimulados com fMLP. A ativação da via resulta na mudança de conformação das integrinas a qual foi avaliada utilizando dois anticorpos distintos: o mAb24 e o mAb KIM127. Cada um deles liga-se a um epítopo diferente que se torna acessível somente quando a integrina está em uma determinada conformação. Integrinas quando em seu estado inativo estão em uma conformação chamada “fechada” e têm uma baixa afinidade pelo ligante. Quando ativadas mudam sua conformação e afinidade pelo ligante, passando de baixa afinidade para o estado de afinidade intermediária e em seguida para o de alta afinidade. Cada um desses estados é caracterizado por uma conformação específica das subunidades da integrina. O KIM127 se liga a um epítopo localizado no joelho da subunidade β_2 , que só fica exposto quando esse joelho se estende, assim

sua ligação indica a extensão da molécula. O mAb 24 reconhece um epítopo também na subunidade β_2 em uma região denominada de *I-like domain* (*A domain*) que só pode ser acessada quando a integrina está na posição estendida, e é quando essa assume a conformação de alta afinidade (FAN e colab., 2016). Assim, quando avaliamos a ativação dessas moléculas de adesão percebemos que a AGP é capaz de inibir a ativação dessas moléculas, impedindo a mudança de conformação *inside-out*. A atividade inibitória da AGP foi melhor evidenciada para a conformação de alta afinidade (representada pela ligação de mAb24) (Figura 21A). Foi observada também uma tendência não significativa em inibir a conformação intermediária (Figura 21B).

O envolvimento de receptores inibitórios modulando a ativação da via *inside out* das integrinas corrobora nossos resultados. A ausência de Siglec-E em camundongos nocautes induz uma maior migração dos neutrófilos para o pulmão de forma dependente de integrinas β_2 . Nessa mesma linha, a ativação de uma outra classe de receptores, como o já mencionado PilR- β , também inibe a ativação dessas integrinas. Esses receptores também são capazes de reconhecer diversos ligantes sialilados através da interação com o ácido siálico com uma maior afinidade do que as Siglecs, e sua expressão aumenta em resposta a estímulos quimiotáticos como o fMLP (SUN e colab., 2012; LU, Qiong e colab., 2014; WANG e colab., 2013).

PilR são receptores com domínio inibitório intracelular ITIM. A fosforilação de receptores com domínio ITIM pela família das Src cinases recruta fosfatases como SHP1 ou SHIP. Neutrófilos de animais deficientes para *Lyn*^{-/-}, membro da família das cinases Src, também apresentaram um perfil hiper-reativo à adesão. O trabalho sugere que a ausência dessa proteína inibitória favorece a mudança de conformação do estado de menor afinidade para a conformação de maior afinidade. De fato, isso suporta nossa hipótese de que a ativação de receptores inibitórios modula a mudança de conformação das integrinas por meio da via *inside-out* e assim diminui a sua afinidade pelo substrato e impede a formação de *clusters*. Os animais nocautes para o receptor PILR α apresentaram uma maior infiltração de neutrófilos no pulmão e um aumento da adesão ao ICAM-1, principal ligante de integrina β_2 . Além disso, sua resposta quimiotática ao fMLP também foi acentuada, contudo não foi observada nenhuma diferença na polimerização de actina nos neutrófilos desses animais em comparação com os animais selvagens (LEE e colab., 2010). Entretanto, a relação da ativação das integrinas com as vias intracelulares induzidas por receptores inibitórios, incluído os Siglecs, foram pouco exploradas em neutrófilos humanos.

A resposta quimiotática é composta de ciclos coordenados de adesão ao substrato mediado por integrinas; formação de protrusões na porção frontal da célula: polimerização de

filamentos de F-actina; despolimerização da actina na porção posterior da célula; e contração do corpo celular através da interação actina-miosina. Esse processo é complexo e depende de uma variedade de sinais intracelulares para direcionar a célula até o foco da inflamação. As principais vias de transdução de sinal ativadas após a ligação do fMLP ao seu receptor GPCR ativam a PLC β 2/3, que desencadeia a liberação de cálcio e a ativação da PKC, e a PI3K γ que leva à produção de PIP3 e à ativação da proteína PKB/Akt (FILINA e colab., 2012; GORDON, 2012; HIRSCH e colab., 2000). No entanto, outras vias de sinalização também são ativadas pelos receptores quimiotáticos, como a ativação de GTPases da família das Rho, da cascata das MAPK cinases, Src cinases e de algumas fosfatases.

As diversas proteínas que conectam a ativação do receptor FPR1 e o remodelamento do citoesqueleto, foram investigadas de forma indireta neste trabalho, e a análise de algumas respostas da célula nos permite, especular a ação de inibitória de Siglec-5 entre as diferentes vias que estão sendo ativadas durante a resposta quimiotática, para então sugerir um mecanismo de ação inibitório direcionado pela AGP.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, conseguimos descartar as sinalizações intracelulares ativadas pelo fMLP que não participam diretamente do controle quimiotático inibitório induzido pela AGP, como por exemplo a mobilização de cálcio. Além de não ser fundamental para a quimiotaxia, sugerimos aqui que a ativação da PLC não é modulada pelos efeitos da AGP, permitindo-nos excluir seu envolvimento (FRANCIS e HEINRICH, 2018).

Como a AGP não interfere na mobilização de cálcio, descartamos a possibilidade de sua inibição sobre a PLC, contudo a modulação de proteínas *downstream* não pode ser descartada. De fato, os resultados obtidos nos ensaios de ROS com o estímulo PMA nos direcionam nesse sentido. Como demonstramos (Figura 20), a AGP e a dAGP inibem a produção de ROS induzida pelo PMA (indutor direto da enzima PKC). Além disso, a ação inibitória da AGP sobre as células estimuladas com PMA já está bem demonstrada na literatura (BENNETT e SCHMID, 1980; COSTELLO e colab., 1984; LAINÉ e colab., 1990a; MATSUMOTO e colab., 2007; PUKHAL'SKII e colab., 2000; RINALDI e colab., 2008; STAKAUSKAS e colab., 2005; VASSON, M P e colab., 1994). A ativação de PLC leva à produção de DAG e IP3 a partir do PIP2, e o DAG produzido ativa a PKC (SATO e colab., 2013). O envolvimento das enzimas da família da PKC, envolvida na ativação e regulação de NADPH oxidase foi sugerido por diversos estudos que demonstraram que a p47phox (componente do complexo formado para liberação de ROS) é um substrato para a PKC e participa na cascata de sinalização que ocorre entre o receptor FPR1 e a ativação da NADPH oxidase (DEKKER e colab., 2000; EL-BENNA e colab., 2008). Neutrófilos de camundongos nocautes para PKC demonstraram uma redução

de 50% na produção de superóxido comparada com os neutrófilos de animais selvagens (SELVATICI e colab., 2006).

Provavelmente, mesmo que a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio não seja exclusivamente dependente de receptores Siglec-5 nem -9, a diferença entre a AGP e a dAGP pode sugerir o envolvimento de mais de um mecanismo de ação para inibição dessa via específica. A maior liberação de ROS decorre da ativação da via da PLC, contudo a participação da PI3K também vem ganhando evidências. Estudos na literatura têm demonstrado que a PI3K γ , e mais recentemente a sua isoforma PI3K β , são necessárias para a produção de ROS (HIRSCH e colab., 2000; KULKARNI e colab., 2011). Consistentemente, a quantidade de superóxido produzida pela indução do fMLP em células nocautes para PI3K γ foram consideradas extremamente baixas (LI, Z., 2000). Acredita-se que durante uma infecção, essas duas vias possam atuar em paralelo ou ainda existir um *crosstalk* entre elas para favorecer a produção dessas espécies reativas e garantir uma resposta imune eficaz. Sendo assim, a diferença na produção de ROS observada entre as duas proteínas (AGP e dAGP) pode ser atribuída a um efeito aditivo na inibição. A AGP sialilada pode, além de inibir a PKC, também inibir paralelamente a PI3K, resultando em um efeito supressor mais potente do que o induzido pela dAGP.

A ativação das pequenas GTPases, fundamentais durante a fagocitose é um ponto de conversão entre as vias ativadas por diferentes receptores que induzem a polimerização de actina, como a quimiotaxia ou a fagocitose. Como a AGP, em nossos ensaios, não inibiu a fagocitose, é pouco provável que a inibição esteja ocorrendo a partir dessas proteínas na cascata de sinalização.

Ainda, a família das RacGTPases conta com as maiores reguladoras da ativação das integrinas pela sinalização *inside-out* (KINASHI, 2005), no entanto o perfil de inibição da AGP sobre a ativação das integrinas em nossos resultados aponta para um caminho alternativo. Estudos demonstram que o remodelamento do citoesqueleto pode influenciar na ativação das integrinas (ANDERSON e colab., 2000; HUTTENLOCHER, Anna e colab., 1996; SILVEIRA e colab., 2017). O tratamento com citocalasina D inibe a ativação de integrinas β 2 em neutrófilos estimulados com o fMLP. Além disso, a regulação da afinidade das integrinas depende da interação da cauda citoplasmática da subunidade β com proteínas que se as ligam à actina (Talin-1 e Kindli-3), e a formação de filamentos de actina favorece o recrutamento dessas proteínas (BERTONI e colab., 2002; SILVEIRA e colab., 2017). Ao inibir a polimerização de actina, a AGP estaria dificultando a interação dessas proteínas com a integrina e impedindo sua mudança de conformação.

As vias de migração como a da PI3K e da p38/MAPK são fundamentais durante a quimiotaxia. Porém, ainda que todos os quimioatrativos sinalizem através de receptores do tipo GPCR, existe uma prevalência de ativação de uma via sobre a outra dependendo de qual fator quimiotático está sendo ativado. Atrativos como o fMLP, chamados de ponto final, induzem uma cascata intracelular que sinaliza preferencialmente via p38/MAPK. Ainda, o tratamento com AGP de macrófagos peritoneais murinos inibe, de forma concentração dependente, a fosforilação das proteínas envolvidas nessa sinalização induzida pelo LPS (SUMANTH e colab., 2019). Já o envolvimento das Siglecs em suprimir essa via foi demonstrado em animais deficientes para o Siglec-E, ortóloga ao siglec-9 em humanos. Células dendríticas desses animais, quando infectadas com *E. coli*, apresentaram um aumento da fosforilação de p38. Além disso, neutrófilos Siglec-E^{-/-} também demonstraram uma fosforilação exagerada dessa via ativada por CD11b. As células THP-1, expressando a Siglec-14 em grande quantidade (que é o *paired-receptor* de Siglec-5 e contém um domínio ITAM ao invés do domínio ITIM), também aumentaram a fosforilação dessa proteína p38 em resposta ao LPS ou ao *Streptococcus* do grupo B (ALI, Syed Raza e colab., 2014). Logo, essa possibilidade precisa ser investigada para compreendermos o papel da AGP na regulação da quimiotaxia dos neutrófilos e ainda elucidar a biologia dessa interação AGP-Siglec-5. Igualmente, é necessário demonstrar a participação de Siglec-5 tanto nos ensaios de quimiotaxia como na modulação das integrinas.

O envolvimento das Siglecs e da AGP na quimiotaxia, polimerização de actina e ativação de integrinas tinha sido, até então, pouco explorado. O que foi demonstrado neste trabalho nos permite dar um passo adiante para compreender o papel imunomodulatório da AGP e sua interação com Siglec-5. Agrupando os resultados demonstramos que o envolvimento da AGP na inibição da migração dos neutrófilos decorre da supressão da polimerização de actina via receptores Siglec-5, e ao conectar as vias de sinalização moduladas pela AGP procuramos sugerir um mecanismo de ação.

Considerando a complexidade da resposta inflamatória, identificar pontos de controle endógeno das células que sejam efetivos no combate aos danos causados pela infiltração exacerbada de neutrófilos, como os expostos neste trabalho, pode contribuir para o avanço do entendimento da biologia da resposta inflamatória e conseqüentemente para a farmacologia de agentes anti-inflamatórios.

6 CONCLUSÃO

- A inibição da quimiotaxia é parcialmente dependente dos resíduos de ácido siálico da AGP.
- A AGP inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo fMLP por meio da inibição da polimerização de actina e da ativação de integrinas.
- A polimerização de actina em resposta ao fMLP é inibida pela AGP por meio da interação do ácido siálico presentes em sua estrutura com receptores Siglec-5, mas não com Siglec-9.
- A inibição da polimerização de actina induzida pela AGP não acomete a capacidade de fagocitose de *E. coli* dos neutrófilos.
- A AGP não interfere na mobilização de cálcio intracelular em neutrófilos ativado com fMLP.
- AGP e sua variável sem o ácido siálico em concentrações altas inibem as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo estímulo com fMLP ou PMA. Entretanto, em baixas concentrações “não fisiológicas” a AGP desialilada não inibe a produção de ROS.

BIBLIOGRAFIA

ABADIER, Michael e colab. **Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier.** *European Journal of Immunology*, v. 45, n. 4, p. 1043–1058, 2015.

ABRAM, Clare L e LOWELL, Clifford a. **The ins and outs of leukocyte integrin signaling.** *Annual review of immunology*, v. 27, p. 339–362, 2009.

ALI, Hydar e colab. **Chemoattractant receptor cross-desensitization.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 10, p. 6027–6030, 1999.

ALI, Syed Raza e colab. **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, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4042635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ALVES-FILHO, José C e SPILLER, Fernando e CUNHA, Fernando Queiroz. **Neutrophil paralysis in sepsis.** *Shock*, v. 34, n. 1, p. 15–21, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714263>>.

ANDERSON, S I e HOTCHIN, N A e NASH, G B. **Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils.** *Journal of cell science*, v. 113, p. 2737–45, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893189>>.

ANDO, Munetoshi e colab. **Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 369, n. 3, p. 878–83, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325328>>.

ANDRADES, Michael e colab. **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, Natalie e INSALL, Robert 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 e VARKI, Ajit. **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, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801860>>.

ANGATA, Takashi e colab. **Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates.** *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 20, n. 12, p. 1964–73, 2006. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.06-5800com>>.

ANGATA, Takashi e colab. **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. 13251–13256, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=516556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ANGATA, Takashi e colab. **Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation.** Cellular and molecular life sciences : v. 11, n. 88, p. 151–156, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519826>>.

ANGATA, Takashi e NYCHOLAT, Corwin M. e MACAULEY, Matthew S. **Therapeutic Targeting of Siglecs using Antibody- and Glycan-Based Approaches.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 131, n. 3, p. 101–105, 2015.

ARNAOUT, M.A. e MAHALINGAM, B. e XIONG, J.-P. **Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling.** Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 21, p. 381–410, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212500>>.

ARRAES, Sandra Mara a e colab. **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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849637>>.

AVRIL, Tony e colab. **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, v. 173, n. 11, p. 6841–6849, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17138568>>.

BARNES, Peter J. **New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 119, n. 5, p. 1055–1062, 2007.

BEATSON, Richard e colab. **The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9.** Nature Immunology, v. 11, p. 1273–1281, 2016.

BEDNAR, Filip e colab. **Cross-Desensitization of CCR1, but Not CCR2, following Activation of the Formyl Peptide Receptor FPR1.** The Journal of Immunology, v. 192, n. 11, p. 5305–5313, 2014.

BEGANDT, Daniela e colab. **How neutrophils resist shear stress at blood vessel walls: molecular mechanisms, subcellular structures, and cell interactions.** Journal of Leukocyte Biology, v. 102, n. 09, p. 117-026, 2017. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/lookup/doi/10.1189/jlb.3MR0117-026RR>>.

BENNETT, M e 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. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=350223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BERG JM, TYMOCZKO JL. **Biochemistry**. 5th. ed. New York: W.H. Freeman, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22545/>>.

BERTONI, Alessandra e colab. **Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin α IIb β 3 and the actin cytoskeleton**. Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 28, p. 25715–25721, 2002.

BHOPALE, Veena M. e colab. **Factors associated with nitric oxide-mediated β 2 integrin inhibition of neutrophils**. Journal of Biological Chemistry, v. 290, n. 28, p. 17474–17484, 2015.

BIEDERMANN, Bjoern e colab. **Analysis of the CD33-related siglec family reveals that Siglec-9 is an endocytic receptor expressed on subsets of acute myeloid leukemia cells and absent from normal hematopoietic progenitors**. Leukemia research, v. 31, n. 2, p. 211–20, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828866>>.

BILLADEAU, Daniel D. **PTEN gives neutrophils direction**. Nature immunology, v. 9, n. 7, p. 716–8, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563079>>.

BLIXT, Ola e colab. **Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: Identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein**. Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 33, p. 31007–31019, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773526>>.

BOCHNER, B. S. **Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors**. Clinical & Experimental Allergy, v. 39, n. 3, p. 317–324, 2009.

BORREGAARD, Niels. **Neutrophils, from marrow to microbes**. Immunity, v. 33, n. 5, p. 657–70, 24 Nov 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463>>.

BOUTTEN, A e colab. **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, Caroline R e colab. **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, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/183/12/7703>>.

BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. M. e VARKI, Ajit. **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, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.12.8625>>.

BRINKMANN, Volker e colab. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 Mar 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>>.

BROWN, K a e colab. **Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis**. *Lancet*, v. 368, n. 9530, p. 157–69, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829300>>.

BUCKLEY, Christopher D. e colab. **The resolution of inflammation**. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 1, p. 59–66, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3362>>.

CAMPANERO-RHODES, María Asunción e colab. **Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 344, n. 4, p. 1141–1146, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647038>>.

CAMPELLONE, Kenneth G. e WELCH, Matthew D. **A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 4, p. 237–251, 2010.

CAO, Huan e CROCKER, Paul R. **Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation?** *Immunology*, v. 132, n. 1, p. 18–26, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3015071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CARLIN, Aaron F. e colab. **Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5**. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 224, p. 199–205, 2009.

CARLIN, Aaron F e colab. **Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes**. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 4, p. 1231–7, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CARP, H. **Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils**. *The Journal of experimental medicine*, v. 155, n. 1, p. 264–275, 1982.

CECILIANI, Fabrizio e colab. **alpha(1)-Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes**. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 116, n. 3–4, p. 145–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17321601>>.

CECILIANI, Fabrizio e POCACQUA, Vanessa. **The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases**. *Current protein & peptide science*, v. 8, n. 1, p. 91–108, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305563>>.

CHANG, Yung Chi e colab. **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.

CHEN, Guo-yun e BROWN, Nicholas K e WU, Wei e KHEDRI, Zahra e YU, Hai e CHEN, Xi e DE, Diantha Van e colab. **Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1.** *eLife*, v. 09, p. 040-66, 2014.

CHEN, Guo-Yun e colab. **Amelioration of sepsis by inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-SiglecG interaction.** *Nature biotechnology*, v. 29, n. 5, p. 428-435, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478876>>.

CHEN, Guo-Yun e BROWN, Nicholas K e WU, Wei e KHEDRI, Zahra e YU, Hai e CHEN, Xi e VAN DE VLEKKERT, Diantha e colab. **Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1.** *eLife*, 2014.

CHEN, Guo-Yun e colab. **CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses.** *Science*, v. 323, n. 5922, p. 1722-1725, 2009.

CHEN, Keqiang e colab. **Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family.** *Journal of Autoimmunity*, v. 85, p. 64-77, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.06.012>>.

CHIU, K M e colab. **Interactions of alpha1-acid glycoprotein with the immune system. I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness.** *Immunology*, v. 32, n. 6, p. 997-1005, 1977. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1445435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHODNIEWICZ, David e ZHELEV, Doncho 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.

CIEPIELA, Olga e OSTAFIN, Magdalena e DEMKOW, Urszula. **Neutrophils in asthma-A review.** *Respiratory Physiology and Neurobiology*, v. 1, p. 1098-1102, 2015.

CLAUDE, J. e colab. **Microglial CD33-Related Siglec-E Inhibits Neurotoxicity by Preventing the Phagocytosis-Associated Oxidative Burst.** *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 46, p. 18270-18276, 2013.

CONDLIFFE, A M e colab. **Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function.** *Immunology*, v. 89, n. 1, p. 105-11, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CONNOLLY, Nicholas P. e JONES, Margaret e WATT, Suzanne 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, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358929>>.

CORNISH, A L e colab. **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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731071>>.

COSTELLO, M J e FIEDEL, B A e GEWURZ, H. **Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein.** *Nature*, v. 281, n. 5733, p. 677–678, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/551286>>.

COSTELLO, M J e GEWURZ, H e SIEGEL, J N. **Inhibition of neutrophil activation by alpha1-acid glycoprotein.** *Clinical and experimental immunology*, v. 55, n. 2, p. 465–472, 1984. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1535826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CROCKER, Paul R. e PAULSON, James C. e VARKI, Ajit. **Siglecs and their roles in the immune system.** *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 4, p. 255–266, 2007.

CROCKER, Paul R. e VARKI, Ajit. **Siglecs, sialic acids and innate immunity.** *Trends in Immunology*, v. 22, n. 6, p. 337–342, 2001a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490601019305>>.

CROCKER, Paul R. e VARKI, Ajit. **Siglecs in the immune system.** *Immunology*, v. 103, n. 2, p. 137–145, 2001b.

CROCKER, Paul R. **Siglecs in innate immunity.** *Current opinion in pharmacology*, v. 5, n. 4, p. 431–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955740>>.

CROCKER, Paul R e ZHANG, Jiquan. **New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics.** *Biochemical Society symposium*, v. 94, n. 69, p. 83–94, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655776>>.

CROSS, Alan S e WRIGHT, Daniel 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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CROWLEY, C A e colab. **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.

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

DEKKER, Lodewijk V. e colab. **Protein kinase C-β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils.** *Biochemical Journal*, 2000.

DEVREOTES, P e HORWITZ, A R. **Signaling networks that regulate cell migration.** Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 7, n. 8, p. a005959, 2015.

DIRIENZO, W. e colab. **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, 1987. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165247887900496>>.

DORWARD, David A. e colab. **The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation.** American Journal of Pathology, v. 185, n. 5, p. 1172–1184, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.020>>.

EL-BENNA, Jamel e DANG, Pham My Chan e GOUGEROT-POCIDALO, Marie Anne. **Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: Role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane.** Seminars in Immunopathology. [S.l.: s.n.], 2008

ELKS, Philip M e colab. **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. 712–722, 21 Jul 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555741>>.

EPSTEIN, Franklin H. e WEISS, Stephen J. **Tissue Destruction by Neutrophils.** New England Journal of Medicine, v. 320, n. 6, p. 365–376, 9 Feb 1989. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198902093200606>>.

ERICKSON-MILLER, Connie L. e FREEMAN, Sylvie D. e HOPSON, Christopher B. e D’ALESSIO, Karla J. e colab. **Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes.** Experimental Hematology, v. 31, n. 5, p. 382–388, 2003.

ERICKSON-MILLER, Connie L. e FREEMAN, Sylvie D. e HOPSON, Christopher B. e D’ALESSIO, Karla J. e colab. **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, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763136>>.

FAIRN, Gregory D. e GRINSTEIN, Sergio. **How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes.** Trends in Immunology. v. 13, p. 787-793, 2012

FAN, Zhichao e colab. **High-Affinity Bent β 2-Integrin Molecules in Arresting Neutrophils Face Each Other through Binding to ICAMs In cis.** Cell Reports, v. 26, n. 1, p. 119- 130, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.038>>.

FAN, Zhichao e colab. **Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent β 2 integrin binding ligand in cis.** Nature Communications, v. 7, p. 12658, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms12658>> <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578049>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5013657>>.

FENG, D e colab. **Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP.** The Journal of experimental medicine, v. 187, n. 6, p. 903–915, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FERGUSON, G John e colab. **PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis.** Nature cell biology, v. 9, n. 1, p. 86–91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17173040>>.

FILINA, Yu. V. e SAFRONOVA, V. G. e GABDOULKHAKOVA, A. G. **Small G-proteins Ras, Rac and Rho in the regulation of the neutrophil respiratory burst induced by formyl peptide.** Biochemistry Membrane and Cell Biology, v. 6, n. 1, p. 67–74, 2012.

FONG, Jerry J e colab. **Immunomodulatory activity of extracellular Hsp70 mediated via paired receptors Siglec-5 and Siglec-14.** The EMBO Journal, v. 34, p. 2775–2788, 2015.

FOURNIER, Thierry e MEDJOUBI-N, Najet e PORQUET, Dominique. **Alpha-1-acid glycoprotein.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1482, n. 1–2, p. 157–171, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483800001539>>.

FRANCIS, Emmet A. e HEINRICH, Volkmar. **Extension of chemotactic pseudopods by nonadherent human neutrophils does not require or cause calcium bursts.** Science Signaling, v. 11, n. 521, 2018.

FUNAMOTO, Satoru e colab. **Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis.** Cell, v. 109, n. 5, p. 611–623, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062104>>.

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

GAHMBERG, C G e ANDERSSON, L C. **Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid).** The Journal of experimental medicine, v. 148, n. 2, p. 507–21, 1978. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2184935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GAULDIE, J e colab. **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, 1987. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.20.7251>>.

GORDON, Siamon. **Macrophage heterogeneity: a personal scientific journey.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 6, p. 1339–1342, 2012. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22592120&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1161/ATVBAHA.111.238139>>.

GREWAL, Prabhjit K. e colab. **The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis.** *Nature Medicine*, v. 14, n. 6, p. 648–655, 2008.

GUNNARSSON, Peter e colab. **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, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669698>>.

GUNNARSSON, Peter e colab. **The acute-phase protein alpha 1-acid glycoprotein (AGP) induces rises in cytosolic Ca^{2+} in neutrophil granulocytes via sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (siglecs).** *The FASEB journal*, v. 21, n. 14, p. 4059–4069, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675532>>.

GUNNARSSON, Peter e colab. **α 1-acid glycoprotein (AGP)-induced platelet shape change involves the Rho/Rho kinase signalling pathway.** *Thrombosis and Haemostasis*, v. 102, n. 4, p. 694–703, 2009.

GUNTEN, Stephan Von e colab. **Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment.** *Blood*, v. 106, n. 4, p. 1423–31, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15827126>>. Acesso em: 4 jun 2013.

GUPTA, G. S. **Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications.** 1. ed. Springer Vienna, 2012. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=SqAcYVGoQOcC>>.

GUTHRIDGE, J M e KAPLAN, A M e 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.

HÄGER, M e COWLAND, J B e BORREGAARD, N. **Neutrophil granules in health and disease.** *Journal of internal medicine*, v. 268, n. 1, p. 25–34, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497300>>.

HARRIS, Rebecca Louise e VAN DEN BERG, Carmen Wilma e BOWEN, Derrick John. **ASGR1 and ASGR2 , the Genes that Encode the Asialoglycoprotein Receptor (Ashwell Receptor), Are Expressed in Peripheral Blood Monocytes and Show Interindividual Differences in Transcript Profile .** *Molecular Biology International*, v. 2012 p. 1–10, 2012.

HATTORI, Hidenori e colab. **Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 8, p. 3546–51, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2840460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HEIT, Bryan e colab. **An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients.** The Journal of cell biology, v. 159, n. 1, p. 91–102, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2173486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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

HEIT, Bryan e COLARUSSO, Pina e KUBES, Paul. **Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis.** Journal of cell science, v. 118, n. Pt 22, p. 5205–20, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249234>>.

HELD, Werner e MARIUZZA, Roy a. **Cis-trans interactions of cell surface receptors: Biological roles and structural basis.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 345, p. 545–550, 2011.

HIGAI, Koji e colab. **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, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898102004278>>.

HIGAI, Koji e colab. **Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1725, n. 1, p. 128–135, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863355>>.

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

HOCHEPIED, Tino e colab. **Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties.** Cytokine & growth factor reviews, referencias agp migracao neutrofilos, v. 14, n. 1, p. 25–34, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485617>>.

HSIAO, Sheng-yuan e colab. **α -1-Acid Glycoprotein Concentration as an Outcome Predictor in Adult Patients with Sepsis.** BioMed Research International, v. 2019, p. 1–9, 12 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/3174896/>>.

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

HUTTENLOCHER, Anna e GINSBERG, Mark H. e HORWITZ, Alan F. **Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity.** Journal of Cell Biology, v. 134, n. 6, p. 1551–1562, 1996.

IMMLER, Roland e SIMON, Scott I. e SPERANDIO, Markus. **Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function.** European Journal of Clinical Investigation, v. 48, n. June, p. 1–11, 2018.

JANEWAY, Charles a. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th editio ed. New York: Garland Science, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27122/>>.

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

JØRGENSEN, H G e colab. **Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis**. *Biomedical chromatography: BMC*, v. 12, n. 6, p. 343–349, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861495>>.

JUNG, U e colab. **Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo**. *The Journal of clinical investigation*, v. 102, n. 8, p. 1526–1533, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=509002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KAUFMANN, Stefan 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, Ravi S. e colab. **Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition**. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. 1–8, 2012.

KHATUA, B. e BHATTACHARYA, K. e MANDAL, C. **Sialoglycoproteins adsorbed by Pseudomonas aeruginosa facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9**. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 91, n. April, p. 641–655, 2012.

KINASHI, Tatsuo. **Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes**. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 7, p. 546–559, 2005.

KOBAYASHI, Scott D e DELEO, Frank 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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/wsbm.32>>.

KOLACZKOWSKA, Elzbieta e KUBES, Paul. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation**. *Nature reviews. Immunology*, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>>.

KOMORI, Hisakazu e colab. **α 1 -Acid Glycoprotein Up-regulates CD163 via TLR4/CD14 Protein Pathway**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 36, p. 30688–30700, 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.353771>>.

KULKARNI, Suhasini e colab. **PI3K Plays a Critical Role in Neutrophil Activation by Immune Complexes**. *Science Signaling*, v. 4, n. 168, p. ra23–ra23, 2011. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2001617>>.

KUMAR, V e SHARMA, A. **Neutrophils: Cinderella of innate immune system.** International immunopharmacology, v. 10, n. 11, p. 1325–34, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640>>.

LAINÉ, E e colab. **Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein.** Inflammation, v. 14, n. 1, p. 1–9, 1990b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157658>>.

LANE, J. Robert e ABDUL-RIDHA, Alaa e CANALS, Meritxell. **Regulation of g protein-coupled receptors by allosteric ligands.** ACS Chemical Neuroscience, v. 4, n. 4, p. 527–534, 2013.

LARSON, R S e SPRINGER, T A. **Structure and function of leukocyte integrins.** Immunological reviews, v. 114, p. 181–217, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2196220>>.

LAUFFENBURGER, Douglas A. e HORWITZ, Alan F. **Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process.** Cell, v. 84, n. 3, p. 359–369, Fev 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400812805>>.

LAWRENCE, Michael B. e colab. **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.

LECCHI, Cristina e colab. **Bovine alpha-1 acid glycoprotein can reduce the chemotaxis of bovine monocytes and modulate CD18 expression.** Veterinary Research, v. 39, n. 5, p. 50, 2008. Disponível em: <<http://www.vetres.org/10.1051/vetres:2008027>>.

LECCHI, Cristina e colab. **α 1-Acid glycoprotein modulates phagocytosis and killing of Escherichia coli by bovine polymorphonuclear leucocytes and monocytes.** The Veterinary Journal, v. 196, n. 1, p. 47–51, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023312003255>>.

LEE, Yun Sok e colab. **Adipocytokine orosomuroid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation.** The Journal of biological chemistry, v. 285, n. 29, p. 22174–22185, 16 Jul 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2903347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEKSTROM-HIMES, J A e 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. e colab. **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, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508372>>.

LEY, Klaus e colab. **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. *Nature reviews. Immunology*, v. 7, n. 9, p. 678–89, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2156>>.

LI, Z. **Roles of PLC-2 and -3 and PI3K in Chemoattractant-Mediated Signal Transduction**. *Science*, v. 287, n. 5455, p. 1046–1049, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5455.1046>>.

LI, Zhong e colab. **Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42**. *Cell*, v. 114, n. 2, p. 215–27, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887923>>.

LI, Zhong e colab. **Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction**. *Science*, v. 287, n. 5455, p. 1046–1049, 2000.

LIU, Jinghui e colab. **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.

LIZCANO, Anel e colab. **Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation**. *Blood*, v. 129, n. 23, p. 3100–3110, 2017.

LOIKE, John D. e colab. **Differential regulation of $\beta 1$ integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin**. *Journal of Cell Biology*, v. 144, n. 5, p. 1047–1056, 1999.

LU, C. e colab. **Epitope Mapping of Antibodies to the C-Terminal Region of the Integrin 2 Subunit Reveals Regions that Become Exposed Upon Receptor Activation**. *The Journal of Immunology*, v. 123, n. 28, p. 7223–6, 2001.

LU, Qiong e colab. **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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843130>>.

MACAULEY, Matthew S e CROCKER, Paul R e PAULSON, James C. **Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease**. *Nature reviews. Immunology*, v. 14, n. 10, p. 653–66, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234143>>.

MACKIEWICZ, A e 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.

MATSUMOTO, Kazuaki e colab. **$\alpha 1$ -Acid Glycoprotein Suppresses Rat Acute Inflammatory Paw Edema through the Inhibition of Neutrophils Activation and Prostaglandin E2 Generation**. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 7, p. 1226–1230, 2007.

MCDONALD, Braedon e colab. **Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation.** *Science*, v. 330, n. 6002, p. 362–6, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947763>>.

MCDONALD, Braedon e KUBES, Paul. **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 e 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, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413410>>.

MCMILLAN, Sarah J e colab. **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, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3596968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MEDZHITOV, Ruslan. **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771–6, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303867>>.

MEDZHITOV, Ruslan. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913>>.

MENARD, L. e SNYDERMAN, R. **Role of phosphate-magnesium-binding regions in the high GTPase activity of rac1 protein.** *Biochemistry*, v. 32, p. 13357–13361, 1993.

MESTRINER, F L A C e colab. **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, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2148334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MILLS, John S. e colab. **Characterization of the binding site on the formyl peptide receptor using three receptor mutants and analogs of Met-Leu-Phe and Met-Met-Trp-Leu-Leu.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 50, p. 39012–39017, 2000.

MIRANDA-RIBERA, Alba e colab. **Down-regulatory effect of alpha 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil degranulation.** *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 33, n. 4, p. 291–306, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167758>>.

MOCSAI, A. e WALZOG, B e LOWELL, C a. **Intracellular signalling during neutrophil recruitment.** *Cardiovascular Research*, p. 1–13, 2015. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvv159>>.

MÓCSAI, Attila e WALZOG, Barbara e LOWELL, Clifford A. **Intracellular signalling during neutrophil recruitment**. *Cardiovascular Research*, v. 107, n. 3, p. 373–385, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cvres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvv159>>.

MONDAL, Subhanjan e colab. **Phosphoinositide lipid phosphatase SHIP1 and PTEN coordinate to regulate cell migration and adhesion**. *Molecular Biology of the Cell*, v. 23, n. 7, p. 1219–1230, 2012. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e11-10-0889>>.

MORGAN, A J e JACOB, R. **Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane**. *Biochemical Journal*, v. 300, n. 3, p. 665–672, 1994. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/bj3000665>>.

NATHAN, Carl. **Neutrophils and immunity: challenges and opportunities**. *Nature reviews. Immunology*, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498448>>.

NAUSEEF, William M e BORREGAARD, Niels. **Neutrophils at work**. *Nature immunology*, v. 15, n. 7, p. 602–11, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940954>>.

NÉMETH, Tamás e MÓCSAI, Attila. **The role of neutrophils in autoimmune diseases**. *Immunology Letters*, v. 133, n. 19, p. 3563–6, 2012.

NISHIO, Miki e colab. **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.

NIZET, Victor e colab. **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, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2665898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

O'FLAHERTY, J T e colab. **Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca²⁺(+)-independent and Ca²⁺(+)-dependent mechanisms**. *The Journal of biological chemistry*, v. 265, n. 16, p. 9146–52, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160959>>.

PAULSON, James C e MACAULEY, Matthew S e KAWASAKI, Norihito. **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, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PEPIN, Marion e colab. **Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity**. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 37953, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27892504>>.

PETRI, Björn e SANZ, Maria-Jesús. **Neutrophil chemotaxis**. *Cell and tissue research*, v. 371, n. 3, p. 425–436, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-017-2776-8>>.

PHILLIPSON, Mia e colab. **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, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PHILLIPSON, Mia e KUBES, Paul. **The neutrophil in vascular inflammation**. *Nature medicine*, v. 17, n. 11, p. 1381–90, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064428>>.

PILLAI, Shiv e colab. **Siglecs and Immune Regulation**. *Annual Review of Immunology*, v. 30, n. 3, p. 357–392, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3781015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PITTMAN, Keir e KUBES, Paul. **Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment**. *Journal of Innate Immunity*, v. 5, n. 4, p. 315–323, 2013.

POLLARD, Thomas D e BORISY, Gary G. **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments**. *Cell*, v. 112, n. 4, p. 453–65, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600310>>.

POWELL, L. D. e colab. **Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition**. *The Journal of biological chemistry*, v. 268, n. 10, p. 7019–27, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463235>>.

PUKHAL'SKII, A. L. e colab. **Effect of semisynthetic analog of α 1-acid glycoprotein on immunomodulatory and antiinflammatory activity of natural glycoprotein**. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 129, n. 5, p. 480–483, 2000.

PUKHALSKY, A L e colab. **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, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1781831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

RABSON, A R e ANDERSON, R e 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.

RAHMAN, Mizanur M D e colab. **Alpha(1)-acid glycoprotein is contained in bovine neutrophil granules and released after activation**. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 125, n. 1–2, p. 71–81, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584879>>.

RAJAGOPAL, Sudarshan e SHENOY, Sudha K. **GPCR desensitization: Acute and prolonged phases.** Cellular Signalling, v. 41, p. 9–16, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>>.

RAJARATHNAM, Krishna e colab. **How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways.** Cellular Signalling, v. 54, p. 69–80, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.004>>.

RAMACHANDRAN, Vishwanath e colab. **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 e VARKI, Ajit. **Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation.** Glycobiology, v. 9, n. 11, p. 1225–1234, 1999.

RINALDI, Manuela e colab. **Differential effects of α 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 126, n. 3–4, p. 199–210, 2008.

ROBINSON, Martyn K e colab. **Antibody against the Leu-CAM beta-chain (CD18) promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion events.** Journal of immunology, 1992.

ROSALES, Carlos. **Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?** Frontiers in Physiology, v. 9, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00113/full>>.

ROSSI, G. e colab. **Hyposialylated α 1-acid glycoprotein inhibits phagocytosis of feline neutrophils.** Research in Veterinary Science, v. 95, n. 2, p. 465–471, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.026>>.

SADIK, Christian D e KIM, Nancy D e LUSTER, Andrew D. **Neutrophils cascading their way to inflammation.** Trends in immunology, v. 32, n. 10, p. 452–60, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3470857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SAMPATH, Rangarajan e GALLAGHER, Patricia J e PAVALKO, Fredrick M. **Cytoskeletal Interactions with the Leukocyte Integrin beta2 cytoplamic tail.** J. Biol. Chem, v. 273, n. 50, p. 33588–33594, 1998.

SATO, T. e colab. **Molecular Mechanisms of N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced Superoxide Generation and Degranulation in Mouse Neutrophils: Phospholipase D Is Dispensable.** Molecular and Cellular Biology, v. 33, n. 1, p. 136–145, 2013.

SCHAUER, Roland. **Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions.** Current Opinion in Structural Biology, v. 19, n. 5, p. 507–514, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699080>>.

SCHMID, K e colab. **Structure of 1 -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins.** *Biochemistry*, v. 12, n. 14, p. 2711–24, 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4711474>>.

SCHMIDT, Sarah e MOSER, Markus e SPERANDIO, Markus. **The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies.** *Molecular immunology*, v. 55, n. 1, p. 49–58, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253941>>.

SCHÖNFELD, Dorian L. e colab. **The 1.8-Å Crystal Structure of α 1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin.** *Journal of Molecular Biology*, v. 3, n. 3, p. 97–103, 2008.

SCHWARZ, Flavio e colab. **Siglec receptors impact mammalian lifespan by modulating oxidative stress.** *eLife*, v. 4, p. 1–19, 2015.

SEGAL, Anthony W. **How neutrophils kill microbes.** *Annual review of immunology*, v. 23, n. 2, p. 197–223, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092448/>>.

SELVATICI, Rita e colab. **Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils.** *European Journal of Pharmacology*, v. 534, n. 1–3, p. 1–11, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299906000628>>.

SERHAN, Charles N. **Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation: To Resolve or Not?** *The American Journal of Pathology*, v. 177, n. 4, p. 1576–1591, 2010.

SERHAN, Charles N. e SAVILL, John. **Resolution of inflammation: The beginning programs the end.** *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, 2005.

SHAMRI, Revital e colab. **Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines.** *Nature immunology*, v. 6, n. 5, p. 497–506, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15834409>>.

SHI, J. **Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils.** *Blood*, v. 98, n. 4, p. 1226–1230, 2001. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood.V98.4.1226>>.

SHIN, Myung Eun e colab. **Spatiotemporal organization, regulation, and functions of tractions during neutrophil chemotaxis.** *Blood*, v. 116, n. 17, p. 3297–310, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2995358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SHIYAN, S D e BOVIN, N V. **Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein.** Glycoconjugate journal, v. 14, n. 5, p. 631–8, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298696>>.

SIBILLE, Y e MARCHANDISE, F X. **Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils.** The European respiratory journal, v. 6, n. 10, p. 1529–43, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112448>>.

SILVEIRA, Angélica Aparecida Antoniellis e colab. **TNF induces neutrophil adhesion via formin-dependent cytoskeletal reorganization and activation of β -integrin function.** Journal of Leukocyte Biology, n. July, p. 916-38, 2017.

SIMON, S I e colab. **Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells.** J Immunol, v. 4, n. 8, p. 19–23, 1992.

SINGH, Vijendra K. e HUGH FUDENBERG, H. **Lymphocyte stimulation in vitro by orosomucoid glycoprotein.** Immunology Letters, v. 14, n. 1, p. 9–13, 1986.

SMITH, E L e colab. **Sedimentation, diffusion, and molecular weight of a mucoprotein from human plasma.** The Journal of biological chemistry, v. 185, n. 2, p. 569–75, 1950. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14774398>>.

SMITH, KD D e colab. **Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer.** Intechopen, v. 2, p. 2787-2799, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/glycosylation/alpha-1-acid-glycoprotein-agp-as-a-potential-biomarker-for-breast-cancer>>.

SONG, Loling e colab. **Dictyostelium discoideum chemotaxis: Threshold for directed motion.** European Journal of Cell Biology, v. 55, p. 278-285, 2006.

SOUTO, Fabricio O. e colab. **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, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732989>>.

SPENCE, Shaun e colab. **Targeting Siglecs with a sialic acid – decorated nanoparticle abrogates inflammation.** Science translational medicine, v. 7, n. 303, p. 1–13, 2015.

SPILLER, Fernando e colab. **α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice.** Diabetes, v. 61, n. 6, p. 1584–91, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415874>>.

SPRINGER, Timothy a. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm.** Cell, v. 76, n. 2, p. 301–314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507411>>.

STAKAUSKAS, R. e colab. **Alpha-1-acid glycoprotein inhibits phorbol ester-induced but not Fc-receptor-induced generation of reactive oxygen species in bovine peripheral blood neutrophils.** Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine, v. 52, n. 5, p. 213–218, 2005.

SUMANTH, Mosale Seetharam e colab. **Acute phase protein, α – 1- acid glycoprotein (AGP-1), has differential effects on TLR-2 and TLR-4 mediated responses.** Immunobiology, n. May, 2019.

SUN, Yonglian e colab. **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, 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.286633>>.

SUNDD, Prithu e colab. **‘Slings’ enable neutrophil rolling at high shear.** Nature, v. 488, n. 7411, p. 399–403, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11248>>.

SUNDD, Prithu e POSPIESZALSKA, Maria K. e LEY, Klaus. **Neutrophil rolling at high shear: Flattening, catch bond behavior, tethers and slings.** Molecular Immunology, v. 55, n. 1, p. 59–69, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.025>>.

TAMURA, Keiji e colab. **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. e colab. **Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS.** Inflammation, v. 25, n. 4, p. 247–253, 2001.

THIEBLEMONT, Nathalie e colab. **Human neutrophils in auto-immunity.** Seminars in Immunology. [S.l: s.n.], , 2016

TILG, H e colab. **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.

TORRES, R M e colab. **Identification and characterization of the murine homologue of CD22, a B lymphocyte-restricted adhesion molecule.** The Journal of Immunology, v. 149, n. 8, p. 2641-2649, 1992. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/149/8/2641.abstract>>.

URIBE-QUERO, Eileen e ROSALES, Carlos. **Control of phagocytosis by microbial pathogens.** Frontiers in Immunology, v. 8, n. 10, p. 1–23, 2017.

USHA DEVI, A. R. **Normalized Braunstein-Caves inequalities.** Journal of Physics A: Mathematical and General, v. 33, n. 1, p. 227–232, 2000.

VAN DER WESTHUIZEN, E T e colab. **Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors.** J Pharmacol Exp Ther, v. 353, n. 2, p. 246–260, 2015.

VAN MOLLE, W e colab. **Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice.** *Journal of immunology*, v. 159, n. 7, p. 3555–64, 1997. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/RA/C6RA10351K%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms10274>>.

VAN OSS, C J e colab. **Phagocytosis-inhibiting properties of human serum alpha-1 acid glycoprotein.** *Immunological communications*, v. 3, n. 4, p. 321–8, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4618547>>.

VARKI, Ajit e colab. **Essentials of Glycobiology** . 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301239>>.

VARKI, Ajit. **Sialic acids as ligands in recognition phenomena.** *FASEB journal*, v. 11, n. 4, p. 248–55, 1997. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/190057b0>>.

VARKI, Ajit e ANGATA, Takashi. **Siglecs--the major subfamily of I-type lectins.** *Glycobiology*, v. 16, n. 1, p. 1R--27R, 2006a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014749>>.

VARKI, Ajit e ANGATA, Takashi. **Siglecs - The major subfamily of I-type lectins.** *Glycobiology*, v. 16, n. 1, p. 1–27, 2006b.

VASSON, M P e colab. **Effects of alpha-1 acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity.** *Clinica chimica acta*, v. 224, n. 1, p. 65–71, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8174279>>.

VASSON, Marie Paule e colab. **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, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8174279>>.

VIOLA, Joana e SOEHNLEIN, Oliver. **Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation.** *Seminars in Immunology*, v. 27, n. 3, p. 184–193, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.013>>.

VON GUNTEN, Stephan e BOCHNER, Bruce S. **Basic and clinical immunology of Siglecs.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1143, n. 1, p. 61–82, Nov 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1443.011>>.

WANG, Jing e colab. **Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation.** *Nature immunology*, v. 14, n. 1, p. 34–40, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142774>>.

WEATHINGTON, Nathaniel M. e colab. **A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation.** *Nature Medicine*, v. 12, n. 3, p. 317–323, 2006.

WILLIAMS, Alan F. e BARCLAY, A N. **The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition.** Annual review of immunology, v. 6, p. 381–405, 1988.

WILLIAMS, Marcie R e colab. **Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium.** Trends in immunology, v. 32, n. 10, p. 461–469, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3185121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WONG, Connie H Y e HEIT, Bryan e KUBES, Paul. **Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation.** Cardiovascular research, v. 86, n. 2, p. 183–91, 1 Maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124403>>.

WOOTTEN, Denise e CHRISTOPOULOS, Arthur e SEXTON, Patrick M. **Emerging paradigms in GPCR allosterity: Implications for drug discovery.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 12, n. 8, p. 630–644, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4052>>.

WU, Yin e REN, Dongren e CHEN, Guo-Yun. **Siglec-E Negatively Regulates the Activation of TLR4 by Controlling Its Endocytosis.** The Journal of Immunology, v. 197, n. 8, p. 3336–3347, 2016.

XIAO, Kun e colab. **α -1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis.** Journal of Critical Care, v. 30, n. 4, p. 744–751, Ago 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.04.007>>.

YANG, Won Ho e colab. **Accelerated Aging and Clearance of Host Anti-inflammatory Enzymes by Discrete Pathogens Fuels Sepsis.** Cell Host and Microbe, v. 24, n. 4, p. 500- 513.e5, 2018.

ZARBOCK, Alexander e LEY, Klaus. **Neutrophil adhesion and activation under flow.** Microcirculation, v. 16, n. 1, p. 31–42, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ZENG, Zhilin e colab. **Increased expression of Siglec-9 in chronic obstructive pulmonary disease.** Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 10116, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-09120-5>>.

ZHANG, J Q e colab. **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, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801862>>.

ZHOU, Julie Y. e colab. **The Glycoscience of Immunity.** Trends in Immunology, v. xx, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.004>>.

ZHURAVLEVA, Marina A. e TRANDEM, Kathryn e SUN, Peter D. **Structural Implications of Siglec-5-Mediated Sialoglycan Recognition.** Journal of Molecular Biology, v. 375, n. 2, p. 437–447, 2008.