



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

Rodrigo de Oliveira Formiga

**Inibição de neuraminidases do hospedeiro como uma abordagem terapêutica
para regular a resposta de neutrófilos na sepse e COVID-19**

Florianópolis
2022

Rodrigo de Oliveira Formiga

**Inibição de neuraminidases do hospedeiro como uma abordagem terapêutica
para regular a resposta de neutrófilos na sepse e COVID-19**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller

Florianópolis

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Formiga, Rodrigo de Oliveira

Inibição de neuraminidases do hospedeiro como uma abordagem terapêutica para regular a resposta de neutrófilos na sepse e COVID-19 / Rodrigo de Oliveira Formiga ; orientador, Fernando Spiller, 2022.

132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Neutrófilos. 3. Neuraminidases. 4. Sepse. 5. COVID-19. I. Spiller, Fernando. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Rodrigo de Oliveira Formiga

**Inibição de neuraminidases do hospedeiro como uma abordagem terapêutica
para regular a resposta de neutrófilos na sepse e COVID-19**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 2 de setembro de 2022,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Marcia Regina Piuvezam, Dra.
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Giuseppe Palmisano, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
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.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Fernando Spiller, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me mostrarem a Educação como uma fonte de crescimento e transformação social. Por todo apoio depositado ao longo desse árduo caminho que é a Pós-Graduação, meu carinho e muito obrigado. A todos os meus familiares e amigos pelo suporte emocional.

Ao meu orientador Prof. Fernando Spiller por aceitar me guiar nesses anos de doutorado, pelas discussões científicas, ensinamentos e por ter ido muitas vezes para bancada comigo.

Ao Laboratório de Imunobiologia (LIDI/CCB/UFSC) nas figuras dos Prof. André Báfica e Prof. Daniel Mansur por fornecerem um ambiente físico e intelectual para realização dos experimentos e discussões científicas. A todos os alunos e pesquisadores do LIDI pela ajuda diária e momentos de descontração. Um agradecimento especial a Greicy, Lucas M., Adara, Daniel Mendes, Daniel Patrício, Yonne, Nicoli, Luan, Nicholas, Luci, Itamar, Caio e Marick. Aos alunos de iniciação científica Priscila, Lucas F., Jonathan, Geovana e Juliana pelo companheirismo e colaboração com o meu projeto. As minhas companheiras Flávia e Cris, obrigado por todo apoio e amizade.

A minha orientadora do período sanduíche (*Bourse d'excellence Eiffel*) Véronique Witko-Sarsat por apostar no meu potencial e me estimular diariamente. A toda Equipe Witko-Sarsat (*3I, Institut Cochin, INSERM, Université Paris Cité*), em especial a Léa Remy-Tourneur pelo seu auxílio diário. Aos companheiros de laboratório Lucie, Giovanni, Karen, Jenni, Manon, Chloé, Théo e Julien pelo acolhimento e ajuda.

A Sylvie Chollet-Martin (*Université Paris-Saclay*) pela colaboração e ajuda na obtenção de mais tempo para o período sanduíche (CAPES PrINT/UFSC).

Aos colaboradores desse estudo Regina Sordi (UFSC), Rosemeri Maurici (UFSC), Edroaldo Lummertz (UFSC), Fernando Cunha (USP), Frederico Silva (UFRJ), Alexandre Morrot (FIOCRUZ RJ), Matthew Macauley (University of Alberta), Johan Van Weyenbergh (KU Leuven), Sylvie Chollet-Martin (*Université Paris-Saclay*), Margarita Hurtado Nedelec (*Hôpital Bichat*), Frédéric Pene (*Hôpital Cochin*), Pierre-Régis Burgel (*Hôpital Cochin*), Clémence Martin (*Hôpital Cochin*), Vivian Costa (UFMG) e seus respectivos alunos pelo trabalho coletivo voltado para realização desse trabalho.

Aos professores Márcia Piuvezam (UFPB), Giuseppe Palmisano (USP) e Alfeu Zanotto (UFSC) que gentilmente se dispuseram a avaliar este trabalho. Estendo igualmente aos membros suplentes da banca professores José Henrique de Oliveira (UFSC) e Daniel Mansur (UFSC) meu muito obrigado.

Ao LAMEB (CCB/UFSC) e as Plataformas do Departamento 3I do *Institut Cochin* por fornecerem treinamentos e equipamentos para realização de experimentos.

Ao *Institut Cochin (Université Paris Cité)*, *Le programme de bourses d'excellence Eiffel (Campus France - Ministère de l'Europe et des Affaires étrangères)* e ao programa de internacionalização CAPES/PrInt (UFSC/*Université Paris-Saclay*) pelo apoio institucional e financeiro para realização do estágio sanduíche na França.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A UFSC pelo apoio institucional e ambiente fantástico para formação profissional gratuita e de qualidade.

RESUMO

Os ácidos siálicos de membrana, dentre outras funções, parecem regular as respostas imunes, já que sua remoção por neuraminidases (NEU) derivadas de patógenos induz as funções antimicrobianas de neutrófilos, como a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, a contribuição da atividade de NEU derivada do hospedeiro na desregulação dessas células ainda não foi explorada. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar se a NEU do hospedeiro pode ser um alvo importante para regular a resposta de neutrófilos em contextos inflamatórios mimetizados *in vitro* pela estimulação com o lipopolissacarídeo (LPS), *ex vivo* a partir de neutrófilos isolados de pacientes com COVID-19, e *in vivo* em modelos animais de sepse e de inflamação pulmonar aguda semelhante a COVID-19. Foi demonstrado nesse estudo que o desafio de neutrófilos com o LPS induz o aumento da atividade de NEU e a clivagem de ácidos siálicos nas conformações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. Esses eventos foram acompanhados de alterações fenotípicas características de ativação celular avaliados pela manutenção da expressão dos marcadores da superfície CD66b, CD62L, CXCR2 e CD11b e do aumento das funções de neutrófilos. Esses efeitos foram reduzidos na presença dos inibidores da NEU viral Oseltamivir e Zanamivir. Ainda foi observado que na presença do LPS ocorre um aumento do subtipo NEU1 na membrana celular onde a interação com a matriz metaloproteinase (MMP)-9 é um fator determinante para que os efeitos do LPS ocorram. Também foi demonstrado que animais submetidos aos modelos de sepse induzida por peritonite ou pneumonia e tratados com Oseltamivir apresentaram uma diminuição da infiltração difusa de neutrófilos para os pulmões com regulação da migração celular para o foco da infecção. Esses resultados foram acompanhados por uma melhora do perfil bactericida, diminuição da inflamação local e sistêmica, redução dos marcadores de injúria tecidual e manutenção dos níveis de ácidos siálicos na superfície de neutrófilos circulantes. Isso resultou em altas taxas de sobrevivência dos animais tratados. A partir de uma reanálise de sequenciamento de RNA *single cell* de amostras do trato respiratório inferior e superior de pacientes com COVID-19 grave foi observado um aumento da percentagem de expressão de NEU1 em neutrófilos. Além disso, foi observado nesses indivíduos um aumento de NEU1 na membrana plasmática de neutrófilos e da atividade sialidase (plasmática e celular) com redução do conteúdo de ácidos siálicos na conformação $\alpha 2,3$. Por outro lado, a incubação *ex vivo* de neutrófilos com os inibidores de NEU foi capaz de modificar o estado de ativação celular e a perda de ácidos siálicos de membrana. Já o tratamento com o Oseltamivir em animais submetidos a infecção do trato respiratório com um betacoronavírus de murinos regulou a infiltração de neutrófilos para os pulmões e diminuiu ambos os danos pulmonares e a carga viral. Assim, a indução da atividade de NEU1 constitui um mecanismo que favorece a ativação exacerbada de neutrófilos avaliadas *in vitro* ou em condições de inflamação sistêmica. Essa enzima, por sua vez, pode ser considerada como um alvo do hospedeiro para regular a função de neutrófilos durante infecções graves.

Palavras-chave: neutrófilos, neuraminidases; ácidos siálicos; sepse; COVID-19.

ABSTRACT

Membrane sialic acids, among other functions, seem to regulate immune responses, as their removal by pathogen-derived neuraminidases (NEU) induces neutrophils antimicrobial functions, such as phagocytosis and the production of reactive oxygen species (ROS). However, the contribution of host-derived NEU activity in neutrophils dysregulation has not yet been explored. Thus, this study aimed to investigate whether host NEU may be an important target to regulate the response of neutrophils in inflammatory contexts mimicked *in vitro* by stimulation with lipopolysaccharide (LPS), *ex vivo* from neutrophils isolated from COVID-19 patients, and *in vivo* in animal models of sepsis and COVID-19-like acute lung inflammation. It was demonstrated in this study that neutrophils challenge with LPS induces an increase in NEU activity and cleavage of sialic acids in the α 2,3 and α 2,6 conformations. These events were accompanied by phenotypic changes characteristic of cell activation assessed by the maintenance of expression of the surface markers CD66b, CD62L, CXCR2 and CD11b and the increase in neutrophil functions. These effects were reduced in the presence of the viral NEU inhibitors Oseltamivir and Zanamivir. It was also observed that in the presence of LPS there is an increase in the NEU1 subtype in the cell membrane where the interaction with the matrix metalloproteinase (MMP)-9 is a determining factor for the effect of LPS. It was also demonstrated that animals submitted to models of sepsis induced by peritonitis or pneumonia and treated with Oseltamivir showed a decrease in diffuse neutrophil infiltration into the lungs and regulation of cell migration to the focus of infection. These results were accompanied by an improvement in the bactericidal profile, a decrease in local and systemic inflammation, a reduction in tissue injury markers and maintenance of sialic acid levels on the surface of circulating neutrophils. This resulted in high survival rates for treated animals. From a single cell RNA sequencing reanalysis of lower and upper respiratory tract samples from patients with severe COVID-19, an increase in the percentage of NEU1 expression in neutrophils was observed. In addition, an increase in NEU1 in the plasma membrane of neutrophils and in sialidase activity (plasmatic and cellular) was observed in these individuals, with a reduction in the content of sialic acids in the α 2,3 conformation. On the other hand, *ex vivo* incubation of neutrophils with NEU inhibitors was able to modify the cell activation state and the loss of membrane sialic acids. Oseltamivir treatment in animals subjected to respiratory tract infection with a murine betacoronavirus regulated the infiltration of neutrophils into the lungs and decreased both lung damage and viral load. Thus, the induction of NEU1 activity constitutes a mechanism that favors the exacerbated activation of neutrophils evaluated *in vitro* or under conditions of systemic inflammation. This enzyme, in turn, may be considered as a host target to regulate neutrophil function during severe infections.

Keywords: neutrophils, neuraminidases; sialic acids; sepsis; COVID-19.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biologia de neutrófilos humanos	18
Figura 2.	Mecanismo de sinalização e transdução do sinal envolvidos na resposta imune do hospedeiro ao LPS	21
Figura 3.	Recrutamento de neutrófilos para os sítios da infecção e fagocitose do patógeno	23
Figura 4.	Mecanismos moleculares de ativação da NADPH-oxidase de fagócitos (NOX2)	25
Figura 5.	Mecanismos da formação de NETs	29
Figura 6.	Neu5Ac e sua complexidade nos glicoconjugados	34
Figura 7.	Ciclo do vírus influenza e o papel de neuraminidases virais na infecção de células hospedeiras	36
Figura 8.	LPS incubado no sangue total induz a clivagem de ácidos siálicos na superfície de neutrófilos humanos	61
Figura 9.	LPS estimula a atividade NEU em leucócitos humanos, induz a clivagem de ácidos siálicos e ativação de neutrófilos	63
Figura 10.	LPS estimula a atividade NEU em neutrófilos e monócitos isolados induzindo a clivagem de ácidos siálicos e a ativação celular	65
Figura 11.	LPS aumenta a fagocitose e o <i>killing</i> de <i>E. coli</i> por neutrófilos de forma dependente de NEU	67
Figura 12.	CpNEU tem efeitos semelhantes ao LPS e aumenta a fagocitose e o <i>killing</i> de <i>E. coli</i> por neutrófilos	68
Figura 13.	LPS aumenta a produção de EROs e a liberação de NETs por neutrófilos de forma dependente de NEU	69
Figura 14.	A atividade de NEU1 induzida pelo LPS é dependente de MMP-9 em neutrófilos humanos	71
Figura 15.	A ativação da NADPH oxidase em neutrófilos humanos é induzida pela atividade NEU via estímulos distintos, um efeito dependente da MMP-9	73
Figura 16.	A inibição de NEU do hospedeiro melhora o resultado da sepse induzida por <i>E. coli</i>	75
Figura 17.	A inibição de NEU do hospedeiro melhora o resultado da sepse induzida por CLP.	77
Figura 18.	A inibição de NEU melhora o resultado da sepse induzida por <i>K. pneumoniae</i>	79
Figura 19.	Expressão de NEU1 em neutrófilos e outras células infiltradas no trato respiratório superior de pacientes com COVID-19	80

Figura 20.	Expressão de NEU1 em neutrófilos e outras células infiltradas no trato respiratório inferior de pacientes com COVID-19 grave	81
Figura 21.	Atividade aumentada de NEU1 em neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave e crítica	82
Figura 22.	Ativação e clivagem de ácidos siálicos em neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave ativa, mas não em convalescentes	83
Figura 23.	Atividade de NEU e de outros fatores solúveis no plasma de pacientes com COVID-19 grave	85
Figura 24.	rh S100A8 mimetiza os efeitos do LPS e induz a ativação de NEU em neutrófilos humanos	86
Figura 25.	A inibição de NEU do hospedeiro regula as respostas de neutrófilos durante a inflamação pulmonar aguda induzida pelo betacoronavírus murino MHV-3	87
Figura 26.	Mecanismo proposto para a ação de neuraminidases endógenas na desregulação de neutrófilos durante a inflamação	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Inibidores de neuraminidases virais anti-influenza	37
Tabela 2.	Características gerais dos quatro subtipos de neuraminidases identificadas em mamíferos	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora-1
Asp	Aspartato
AST	Aspartato aminotransferase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEACAM	<i>CEA-related cell adhesion molecule</i>
CLEC	Família 12 do domínio da lectina do tipo C
CLP	Ligação e punção do ceco
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CpNEU	Neuraminidase purificada de <i>Clostridium perfringens</i>
CXCR	<i>CXC motif chemokine receptor</i>
DANA	Ácido 2-desoxi-2,3-didesidro-N- acetilneuramínico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase alcalina
FcγR	Receptor Fc gamma
fMLP	N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina
Glu	Ácido glutâmico
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HIF	Fator induzido por hipóxia
HLA	Antígeno leucocitário humano
HMGB	<i>High mobility group protein B</i>
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina

iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IP ₃	Fosfatidil inositol trifosfato
IRAK	Cinase associada ao receptor de IL-1
IRF	Fator regulador de interferon
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs</i>
JNK	Cinase N-terminal c-Jun
K ₃ EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético tripotássico
LBA	Labado broncoalveolar
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LILRB	<i>Receptores de leucócitos semelhantes à Ig da subfamília B</i>
LPS	Lipolissacarídeo
LTB	Leucotrieno B
MAC	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAL-II	Lectina da <i>Maackia amurensis II</i>
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
MD2	Fator de diferenciação mieloide 2
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
MGG	Método de May-Grunwald-Giemsa
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MMP	Matriz metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
MyD	Fator de diferenciação mieloide
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NETs	<i>Neutrophils extracellular traps</i>
NEU	Neuraminidase
Neu5Ac	Ácido N-acetil neuramínico
Neu5Ac2en	DANA
NF-κB	Fator nuclear κB
PAD	<i>Protein-arginine deiminase</i>

PAF	Fator agregador de plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PECAM	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinases
PILR	Imunoglobina emparelhada como o receptor alfa do tipo 2
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
LP	Lavado peritoneal
PFU	<i>Plaque-forming units</i>
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
PSGL	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
scRNA-seq	<i>Single cell RNA-sequencing</i>
SFB	Soro fetal bovino
Siglec	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin</i>
SNA	Lectina da <i>Sambucus nigra</i>
TAK	Proteína ativada pela quinase 1 ativada por TGF- β
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF	Fator associado ao Receptor de TNF
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	proteína adaptadora contendo domínio TIR
Tyr	Tirosina
UFC	Unidade formadora de colônias
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Zo	Zimosan opsonizado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Neutrófilos – Características gerais e funções biológicas	17
1.2 Regulação da atividade de neutrófilos e resolução da inflamação	30
1.2.1 Regulação via apoptose	30
1.2.2 Regulação via receptores inibitórios	32
1.3 Ácidos siálicos, neuraminidases e a modulação das funções biológicas	34
1.4 Potencial terapêutico de inibidores de neuraminidases do hospedeiro durante a inflamação sistêmica	40
1.4.1 Sepses	41
1.4.2 COVID-19	43
2. HIPÓTESE	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Amostras de sangue	48
4.2 Avaliação da resposta de neutrófilos <i>in vitro</i>	49
4.2.1 Avaliação do conteúdo de ácidos siálicos e ativação de neutrófilos	49
4.2.2 Avaliação da fagocitose por neutrófilos	50
4.2.3 Avaliação do <i>killing</i> de <i>E. coli</i>	51
4.2.4 Avaliação da ativação da NADPH-oxidase e produção de ROS	51
4.2.5 Avaliação da liberação de NETs	52
4.3 Avaliação da cinética da atividade de neuraminidase	52
4.4 Ensaio de imunofluorescência e Duolink PLA	53
4.5 Análise de dados públicos de scRNA-seq	53
4.6 Avaliação das respostas da incubação do plasma de pacientes com COVID-19 com neutrófilos de doadores saudáveis	54
4.7 Camundongos e experimentos <i>in vivo</i>	54
4.8 Modelo de sepsis induzida por <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e ligação e punção do ceco (CLP)	55
4.8.1 Análise da migração de neutrófilos	56
4.8.2 Contagens de UFC no sangue, lavado peritoneal e broncoalveolar	57
4.8.3 Determinação dos níveis TNF e IL-17	57
4.8.4 Análise de marcadores bioquímicos de lesão tecidual	57
4.9 Modelo de inflamação pulmonar aguda induzida pelo betacoronavírus murino MHV-3	58
4.9.1 Análise indireta da migração de neutrófilos	58

4.9.2	Análise da carga viral de MHV-3 em pulmões	59
4.9.3	Análise histopatológica	59
4.10	Análise estatística	60
5.	RESULTADOS	61
5.1	LPS induz a atividade de neuraminidases endógenas resultando na remoção de ácidos siálicos e a ativação de neutrófilos humanos	61
5.2	A atividade de NEU induzida pelo LPS estimula a fagocitose, <i>killing</i> de <i>E. coli</i> , produção de ROS e liberação de NETs em neutrófilos humanos	66
5.3	A interação NEU1-MMP-9 está envolvida na ativação de neutrófilos humanos induzida por LPS	70
5.4	A inibição da NEU endógena melhora a taxa de sobrevivência de camundongos em diferentes modelos experimentais de sepse	74
5.5	A atividade de NEU está envolvida na desregulação de neutrófilos de pacientes com COVID-19	80
6.	DISCUSSÃO	89
7.	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXO A - Características demográficas e clínicas dos doadores saudáveis incluídos no estudo	127
	ANEXO B - Características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes com COVID-19 incluídos no estudo	128
	ANEXO C - Estratégia de <i>gate</i> representativa usada para análise de neutrófilos	130
	ANEXO D - Controles negativos técnicos para os experimentos de imunofluorescência indireta e Duolink PLA	131

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos – Características gerais e funções biológicas

A inflamação é parte integrante da biologia animal e fornece proteção contra infecções, reforçando a defesa da homeostase e a integridade funcional e estrutural dos tecidos (MEDZHITOV, 2021). Esse processo ocorre por meio da ativação de células efetoras, que liberam seus mediadores e levam ao recrutamento e a ativação de diferentes populações celulares amplificando, difundindo e coordenando a resposta (CHEN et al., 2018). Em geral essa resposta é autolimitada e atenuada quando o estímulo inicial é eliminado. No entanto, quando não controlada contribui para o dano tecidual e para o estabelecimento de inflamações crônicas e da autoimunidade (DUAN et al., 2019).

Os neutrófilos são componentes-chave da resposta imune primária contra patógenos, constituindo cerca de 60 a 70% dos leucócitos circulantes no sangue de um indivíduo adulto. Inicialmente essas células são formadas na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas via diferenciação sucessiva de células progenitoras mieloides comuns em mieloblastos, pró-mielócitos, mielócito, metamielócitos, neutrófilos imaturos (núcleo em banda) e neutrófilos maduros (núcleo segmentado) (**Figura 1A**) (HONG, 2017).

Na ausência de infecções e inflamação aproximadamente 10^{11} neutrófilos maduros são formados, podendo se localizar na medula ou divididos entre um *pool* circulante, presente em grandes vasos sanguíneos e na corrente axial de pequenos vasos, e um *pool* marginal temporariamente presos em capilares estreitos, principalmente pulmonares (PETERS, 1998). Possuem um tempo de viabilidade médio de 6 a 12 horas após a sua liberação da medula podendo chegar a dias em contextos inflamatórios (SUMMERS et al., 2010).

Estruturalmente os neutrófilos maduros quando aderidos a superfícies em esfregaços de sangue periférico possuem um diâmetro médio de 12 a 15 micrometros enquanto em suspensão cerca de 8 a 9 micrometros (NIEMIEC et al., 2015). Possuem um núcleo multilobado conectado por fragmentos de cromatina (3 a 5 segmentos), o que também justifica serem conhecidos como leucócitos polimorfonucleares juntamente com os eosinófilos e basófilos (LEIDING, 2017). Seu citoplasma está repleto de grânulos

contendo produtos proteicos liberados no processo conhecido como degranulação, o que contribui para que essas células sejam conhecidas como granulócitos (**Figura 1B**). São eles os grânulos primários ou azurofílicos (mieloperoxidase, elastase, catepsina G, proteinase 3, lisozima, serina proteases neutras, defensinas), secundários ou específicos (lactoferrina, colagenase, gelatinase, fosfatase alcalina), e terciários (catepsina B e D, glicoronidase, manosidase, matriz metaloproteinase-9) (LACY, 2006).

Durante infecções ou inflamação, os neutrófilos circulantes tornam-se significativamente elevados em um processo chamado granulopoese de emergência. Este processo envolve a geração aumentada de neutrófilos na medula óssea através do aumento da proliferação de células progenitoras mieloides em resposta a quimiocinas como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (PEDERSEN et al., 2016).

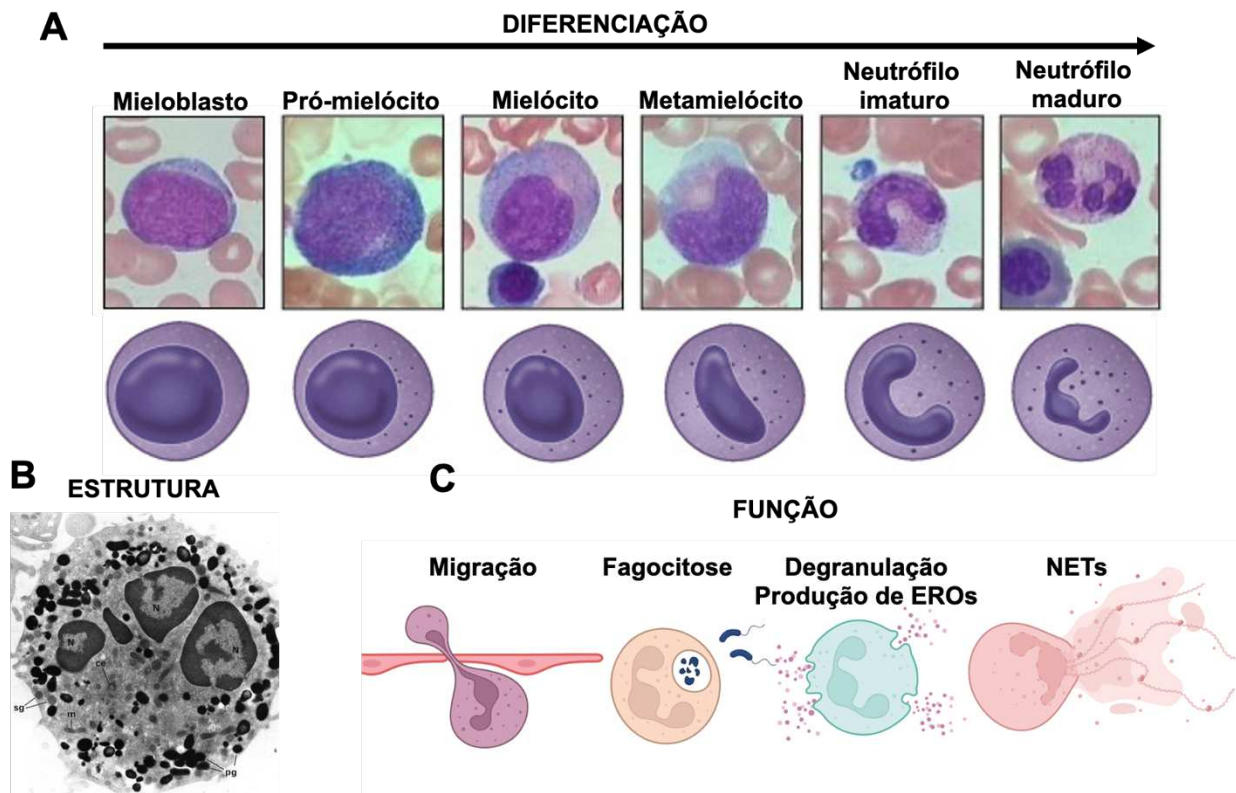


Figura 1. Biologia de neutrófilos humanos. Imagens de células coradas pela técnica de MGG mostrando as fases do desenvolvimento e processo de diferenciação de neutrófilos a partir precusores mieloides na medula óssea (A). Imagem de neutrófilos capturada por microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura arredondada de neutrófilos com citoplasma repleto de grânulos e núcleo multilobado (B). Ilustrações mostrando as funções biológicas de neutrófilos contra patógenos (C). MGG = método de May-Grunwald-Giemsa; EROs = espécies reativas de

oxigênio; NETs = armadilhas extracelulares de neutrófilos (Fonte: Adaptado de WITKO-SARSAT et al., 2000; LEHMAN; SEGAL, 2020; criado com BioRender).

Então, os neutrófilos migram e são recrutados rapidamente para o tecido acometido, onde reagem ao agente causador, exercendo funções defensivas clássicas, como a fagocitose, produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, proteases, peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), além das armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês *neutrophils extracellular traps, NETs*) (**Figura 1C**) (ROSALES, 2018).

Os mecanismos iniciais da resposta imune inata envolvem os receptores de reconhecimento de padrões expressos primeiramente em células residentes do tecido e secundamente em células infiltradas, que reconhecem estruturas moleculares conservadas de patógenos chamados de PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e desencadeiam respostas imunológicas. Dentre os principais PAMPs destacam-se os oligopeptídeos formilados, zimosan, flagelina, DNA bacteriano, RNA viral e o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Os membros mais importantes de receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPs são os receptores do tipo *toll* (TLRs), que compreendem dez membros diferentes em humanos. Alguns desses TLRs são proteínas integrais encontrados na membrana plasmática contendo um domínio extracelular e um domínio de sinalização intracelular (MOGENSEN, 2009; TANG et al., 2012). Já é bem estabelecido que as respostas induzidas pelo LPS são mediadas principalmente pelo TLR4. A ativação do TLR4 é um processo complexo e envolve a participação de várias moléculas efetoras (KUZMICH et al., 2017).

A primeira molécula implicada no reconhecimento do LPS é a proteína de ligação ao LPS (do inglês *LPS-binding protein, LBP*). Essa proteína plasmática de fase aguda reconhece e se liga ao fragmento do lipídeo A na estrutura do LPS liberado por bactérias (WAN, et al., 1995). O complexo LPS-LBP pode então se ligar a glicoproteína CD14, que existe em duas formas, uma ligada à membrana (mCD14) em células mieloides ou CD14 solúvel (sCD14) no sangue (JACK et al., 1995), que permite a resposta ao LPS por células que não expressam mCD14, por exemplo, células endoteliais (LLOYD-JONES et al., 2008). Neutrófilos humanos expressam pequenas quantidades de mCD14 (BARTH et al., 2001). No entanto, estudos demonstram que a forma R do LPS (lipídeo A mais dois

resíduos de ácido 3-desoxi-D-mano-2-octurossônico) pode interagir com TLR4 sem a presença de CD14. Entretanto, a expressão de CD14 reduz a quantidade de LPS necessária para as respostas celulares para concentrações picomolares. Portanto, tanto a LBP quanto CD14 aumentam a ligação do LPS ao TLR4 (**Figura 2**) (JIANG et al., 2005; GOMES et al., 2010).

O TLR4 medeia a transdução de sinal em cooperação com a pequena proteína de fator de diferenciação mieloide 2 (MD2). O domínio extracelular do TLR4 forma um heterodímero estável a partir da ligação a uma bolsa hidrofóbica no MD2 causando a dimerização do complexo TLR4-MD2 (RESMAN et al., 2009). Isso desencadeia o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas para os domínios intracelulares, que são estruturalmente homólogos à família do receptor de interleucina-1 (IL-1R) chamados de domínios de homologia Toll/IL-1R (TIR). As proteínas adaptadoras envolvidas nesse processo também contêm domínios TIR, incluindo o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), a proteína semelhante ao adaptador MyD88 (Mal), a proteína adaptadora contendo domínio TIR (TRIF) e molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (**Figura 2**) (PARK et al., 2009).

O complexo TLR4-MD2 ativado pode desencadear duas vias de transdução de sinal, uma dependente e outra independente de MyD88. A resposta dependente de MyD88 requer a presença de Mal para sinalização e ativação da cinase associada ao receptor de IL-1 (IRAKs) e do Fator 6 associado ao Receptor de TNF (TRAF6). TRAF6 então pode ativar a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e a proteína cinase B (PKB), também conhecida com Akt, ou o complexo proteico formado pela proteína ativada pela quinase 1 ativada por TGF- β (TAK) e TAB 1 e 2. Esse complexo leva à rápida ativação das vias do fator nuclear κ B (NF- κ B) e das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) N-terminal c-Jun (JNK) e p38 (**Figura 2**) (WANG et al., 2001; ANDREAKOS et al., 2004; VALKOV et al., 2011).

A ativação da via do NF- κ B, por sua vez, leva à síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocinas, como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 3 α (MIP-3 α) e IL-8 (FUNAMI et al., 2008). Essa via também induz a expressão de proteínas envolvidas no processo oxidante, como a fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH)-oxidase

(NOX2 em fagócitos), sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e o do fator induzível por hipóxia (HIF) (WU et al., 2008; BANDARRA et al., 2015). Por outro lado, a ativação das vias das proteínas JNK e p38 desencadeiam a transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1), um fator de transcrição que também regula positivamente a expressão de proteínas que favorecem a inflamação (JEONG et al., 2013).

Já a sinalização independente de MyD88 é mediada por TRIF e TRAM, levando à fosforilação e dimerização do fator regulador de interferon 3 (IRF3), que resulta na liberação de interferon- β (IFN- β). A via independente de MyD88 também é capaz de ativar a sinalização de NF- κ B, porém em fases mais tardias (**Figura 2**) (FUNAMI et al., 2008; ENOKIZONO et al., 2013).

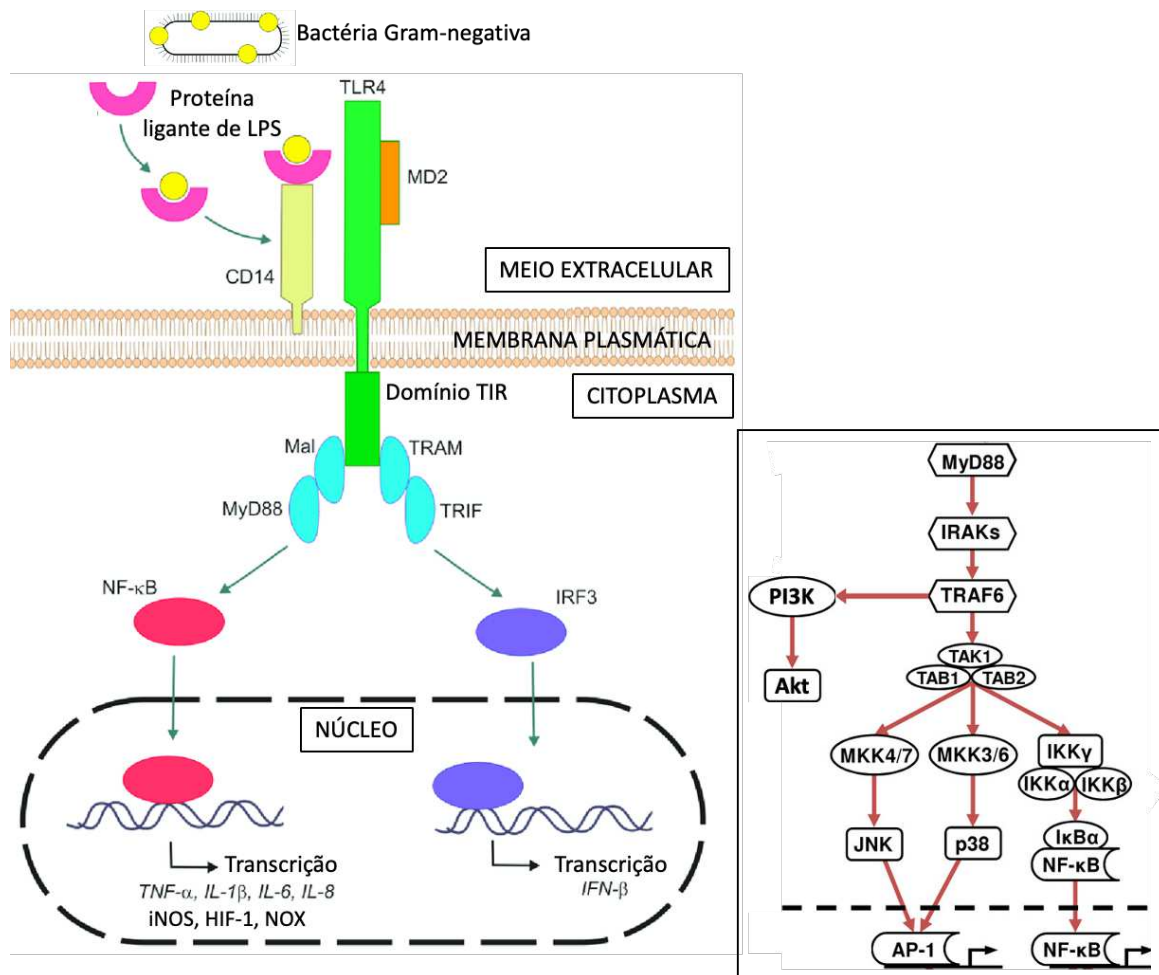


Figura 2. Mecanismo de sinalização e transdução do sinal envolvidos na resposta imune do hospedeiro ao LPS. TLR = receptor do tipo *tol*; LPS = lipopolissacarídeo; MD2 = fator de diferenciação mielóide 2; TIR = domínios de homologia Toll/IL-1R; fator de diferenciação mielóide

88 (MyD88); Mal = proteína semelhante a adaptador MyD88; TRIF = proteína adaptadora contendo domínio TIR; TRAM = molécula adaptadora relacionada a TRIF; TRAM = molécula adaptadora relacionada a TRIF; IRAKs = cinase associada ao receptor de IL-1; TRAF6 = Fator 6 Associado ao Receptor de TNF; PI3K = fosfatidilinositol 3-quinases; PKA/Akt = proteína cinase B; TAK = proteína ativada pela quinase 1 ativada por TGF- β ; JNK = N-terminal c-Jun; TNF = fator de necrose tumoral; IL = interleucina; iNOS = sintase do óxido nítrico induzível; HIF = fator induzido pela hipóxia; NOX = NADPH oxidase; fator regulador de interferon 3; IRF3 = fator regulador de interferon 3; IFN- β = interferon- β ; MKK = proteína cinase cinase; NF- κ B = fator nuclear κ B; IKK = I κ B cinase; I κ B α = inibidor do fator nuclear κ B (Fonte: Adaptado de NOVA et al., 2019).

Essa via de sinalização mediada pelo LPS também favorece a ativação do endotélio vascular e o aumento da expressão de moléculas de adesão para o recrutamento de células inflamatórias (MORISE et al., 1999). O recrutamento de neutrófilos da circulação para os tecidos envolve diversos passos, iniciando pela marginalização. Esse processo se dá a partir da captura mediada por P- e E-selectinas, as quais interagem com ligantes glicosilados localizados na membrana celular, como a PSGL-1 (do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*) (RAMACHANDRAN et al., 2001). Uma outra molécula importante para o processo de rolamento é a L-selectina ou CD62L que interage com CD34 presente no endotélio. Essas interações iniciais são caracterizadas por serem de baixa afinidade e ocorrem à medida que os neutrófilos rolam sob o endotélio (**Figura 3A**) (HIDALGO et al., 2002).

O contato entre a superfície do endotélio ativado favorece a expressão de integrinas α 1 β 2 como a LFA1 (do inglês *lymphocyte function-associated antigen 1*) ou CD11a/CD18, bem como as integrinas α M β 2 Mac-1 (do inglês *macrophage-1 antigen*) ou CD11b/CD18. Estas integrinas se ligam as moléculas de adesão intercelular 1 e 2 (ICAM1 e ICAM2 do inglês *intercellular adhesion molecule*) e VCAM-1 do (inglês *vascular cell adhesion molecule 1*) presentes no endotélio vascular formando ligações mais estáveis, que resultam na interrupção do rolamento (LANGEREIS, 2013). O endotélio dos microvasos inflamados produz fatores quimiotáticos, como o fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4) e várias quimiocinas. Entre essas quimiocinas, a interleucina 8 (IL-8) atrai especificamente neutrófilos via interação com o seu receptor CXCR2 (do inglês *CXC motif chemokine receptor 2*). Além disso, a IL-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α e fatores do sistema complemento, como o C5a, também constituem

importantes moduladores positivos desses eventos (SURMI; HASTY, 2010; SPEYER; WARD, 2011).

O processo de migração de neutrófilos é então concluído pelo extravasamento pela ação de integrinas (LFA-1, MAC-1, VCAM1) e da PECAM1 (do inglês *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), que favorecem a transmigração e diapedese em direção aos estímulos inflamatórios (**Figura 3A**) (CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU et al., 1997; HYUN et al., 2019). Uma vez recrutados, os neutrófilos podem interagir e fagocitar fatores infecciosos, em especial fungos e bactérias. A fagocitose por neutrófilos envolve duas classes diferentes de proteínas, os receptores Fc (FcγRIIA ou CD32 e FcγRIIIB ou CD16) (ZHANG et al., 2010) e do complemento (CD35 e CR3 ou CD11b/CD18) (NILSSON et al., 2005).

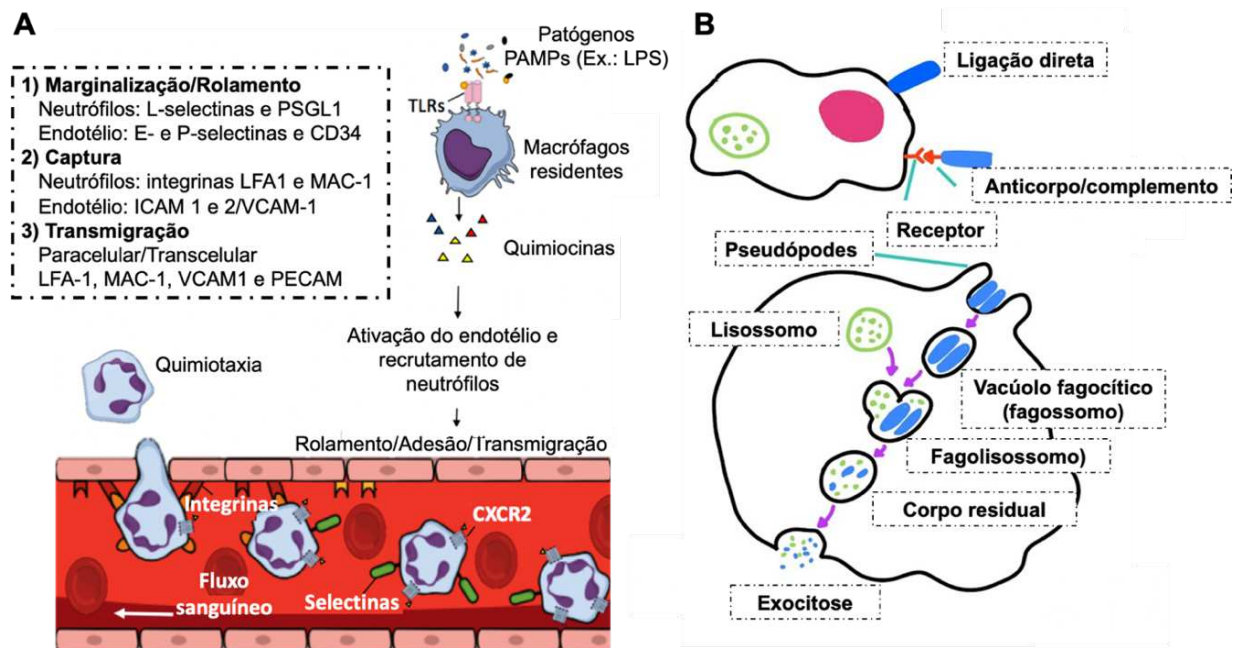


Figura 3. Recrutamento de neutrófilos para os sítios da infecção e fagocitose do patógeno.

A migração de neutrófilos da circulação sanguínea para os focos da infecção compreendem diversas etapas desde a interação do patógeno com células residentes para liberação de fatores quimiotáticos e que ativam o endotélio para a expressão de moléculas de adesão tanto na membrana celular quanto na parede endotelial. Esses eventos favorecem a marginalização, rolamento, captura e a transmigração de neutrófilos (A). Ao entrar em contato direto com o patógeno os neutrófilos infiltrados realizam a fagocitose a partir da ligação direta com receptores de membrana ou de forma indireta ligados a opsoninas (IgG ou C3b), ativando receptores Fcγ ou do complemento (B). TLR = receptores do tipo *toll*; PSGL1 = *P-selectin glycoprotein ligand-1*; LFA1 = *lymphocyte function-associated antigen 1*; MAC = *macrophage-1 antigen*; ICAM = *intercellular adhesion molecule*; VCAM = *vascular adhesion molecule*; PECAM =

platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; CXCR2 = CXC motif chemokine receptor 2 (Fonte: Adaptado de SPILLER et al., 2019).

A sinalização de antígenos bacterianos ligados IgG (opsonização) promove a ativação de receptores Fc e a fosforilação de seus domínios ITAMS (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Uma vez fosforilados os ITAMS servem como sítios de ligação para domínios SH2 de proteínas adaptadoras. Essas estão envolvidas com a ativação de vias que induzem a polimerização de F-actina e a formação dos prolongamentos da membrana chamados de pseudópodes, que se estendem sobre a superfície da partícula opsonizada e formam o “copo fagocitário”, e engolfa a partícula. Uma vez internalizada o fagossomo é formado para o início da digestão do patógeno a partir da fusão com lisossomos que são ácidos no seu interior (pH ~4,5) e grânulos ricos em enzimas hidrolíticas (catepsinas, proteases, lisozimas e lipases) (SWANSON; HOPPE, 2004). Além disso, ocorre a ativação da resposta oxidante no fagolisossomo que culmina com a produção de EROs (**Figura 3B**) (FRANCHINI et al., 2013).

Já a via do complemento C3b/iC3b-CR3 de forma isolada não é capaz de induzir fagocitose por si só, necessitando de um estímulo complementar. A ativação dessa via leva as partículas opsonizadas a entrar na célula produzindo pequenas saliências. Além disso, atuam por um mecanismo dependente dos níveis intracelulares de cálcio e induzem a produção de EROs em cooperação com receptores Fcγ levando a fagocitose de partículas opsonizadas por anticorpos ou ligantes de CR3 glicosilados (**Figura 3B**) (GORDON et al., 1989; LÖFGREN et al., 1999; WALBAUM et al., 2021).

A eficiência antimicrobiana dos neutrófilos depende de dois eventos simultâneos que ocorrem no fagolisossomo, um deles a geração de EROs. A enzima responsável pela produção de EROs em neutrófilos é a NOX2, um complexo composto por duas proteínas de membrana (gp91^{phox}, p22^{phox}), que constituem a flavo-hemoproteína heterodimérica conhecida como citocromo b₅₅₈, e quatro proteínas citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e a pequena GTPase Rac1/2). Após a estimulação dos neutrófilos, a subunidade p47^{phox} é fosforilada e os componentes citosólicos migram para a membrana plasmática, onde se associam ao citocromo b₅₅₈ para montar a forma ativa da NOX2 (HEYWORTH et al., 1991; RADA et al., 2008; ZIEGLER et al., 2019). Este complexo enzimático é, portanto, capaz de gerar o ânion superóxido (O₂⁻), que pode ser dismutado em H₂O₂. Além disso,

o radical hidroxila (OH^\bullet) é um dos intermediários dessa reação, formado pela adição de elétrons, ou pela reação de Fenton, no qual o Fe^{2+} é reduzido a Fe^{3+} (**Figura 4**) (RAY et al., 2012).

Camundongos deficientes em p47^{phox} ou $\text{gp91}^{\text{phox}}$ desenvolvem uma desordem chamada de doença granulomatosa crônica (POLLOCK et al., 1995; CHANG et al., 1998), que está associada à suscetibilidade a infecções, especialmente fúngicas (CHANG et al., 1998) e bacterianas (FUJITA et al., 2010), semelhante ao observado em humanos. As EROs também têm um papel importante nos processos inflamatórios, incluindo na ativação da transcrição gênica via NF- κ B (WANG et al., 2014), e indução de apoptose em neutrófilos sob estresse oxidativo (ZHANG et al., 2003).

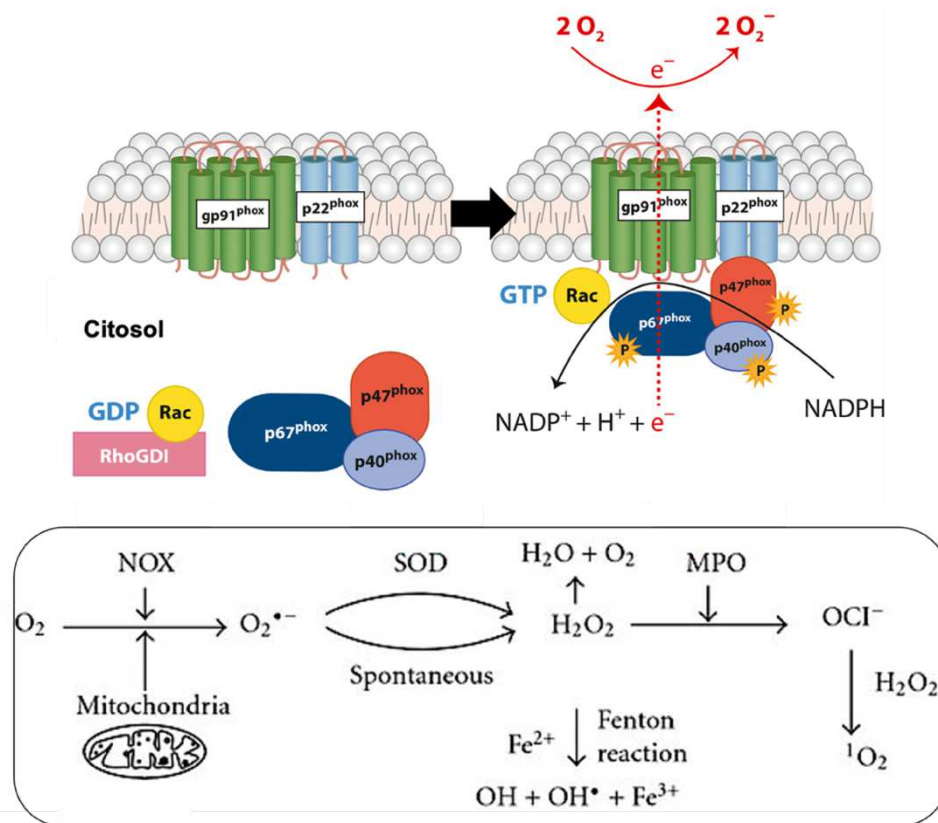


Figura 4. Mecanismos moleculares de ativação da NADPH oxidase de fagócitos (NOX2). O complexo NADPH oxidase de células fagocíticas é dissociado em fagócitos no estado de repouso. O citocromo b558 composto por $\text{gp91}^{\text{phox}}$, p22^{phox} está localizado na membrana plasmática e os fatores p47^{phox} , p67^{phox} e p40^{phox} formam um complexo no citoplasma. A pequena proteína de ligação ao GTP Rac está associada a Rho-GDI em sua forma inativa com o GDP. Após a ativação, os eventos de sinalização causam fosforilações e alterações conformacionais das subunidades da NADPH oxidase levando à sua montagem. A Rac-GTP ativada transloca e se ancora a membrana no complexo NADPH oxidase. O complexo NADPH oxidase totalmente montado é

capaz de desencadear a transferência de elétrons de NADPH para FAD e hemes para reduzir o oxigênio molecular em superóxido (A). Uma vez formado o ânion superóxido pode ser dismutado pela SOD e gerar o peróxido de hidrogênio, que posteriormente pode levar a geração de diversos EROs ao interagir com a MPO ou via reação de Fenton (B) (Fonte: Adaptado de ZENG et al., 2019).

A ativação da NOX2 pode ocorrer tanto na membrana plasmática quando na membrana dos grânulos liberando ânion superóxido no compartimento extracelular ou no interior dos fagossomos pré-formados (NAUSEEF, 2019). Não se sabe se os dois *pools* da enzima são regulados pelos mesmos mecanismos. Vários sinais e vias de transdução levam à ativação da oxidase em fagócitos, e diferentes estímulos induzem a produção de EROs extra- ou intracelularmente, indicando uma diversidade nas suas vias de regulação (CASBON et al., 2009; DINGJAN et al., 2017).

O LPS medeia seus efeitos a partir da ativação do TLR4 e induz uma sensibilização celular para uma ativação mais robusta posterior do complexo enzimático por um outro agonista (FOREHAND et al., 1989). Esses sinais induzem uma variedade de alterações na célula, incluindo a fosforilação parcial de p47^{phox}, alterações conformacionais no complexo p47^{phox}/p40^{phox}/p67^{phox} e a translocação de citocromo b₅₅₈ dos grânulos intracelulares para a membrana plasmática (LIU et al., 2019).

Por outro lado, a ativação de alguns receptores para integrinas, receptores Fc e receptores metabotrópicos, a exemplo para o fMLP, podem ativar o complexo NADPH-oxidase diretamente sem sensibilização inicial. O efeito do fMLP está relacionado com a ativação da via fosfolipase C (PLC) β /diacilglicerol e fosfatidil inositol trifosfato (IP₃)/PKC e a translocação e ativação de p67^{phox} and p47^{phox} para membrana plasmática originando principalmente EROs que são liberadas extracelularmente (VIGNAIS, 2002).

A estimulação direta da proteína quinase C (PKC) pelo PMA (do inglês *phorbol-12-myristate-13-acetate*) ativa a NADPH-oxidase através da fosforilação de várias proteínas, incluindo a p47^{phox}, proteínas MAP cinases (ERK/MAPK) e PI3K induzindo uma liberação intra e extracelular de EROs (KARLSSON et al., 2000). Já os complexos imunes de IgG ativam receptores Fc a partir da fosforilação dos seus domínios intracelulares ITAM e resulta no recrutamento e ativação de diversas proteínas relacionadas com a ativação da NADPH-oxidase, como a Syk, PI3K e PLC γ 2 (GAMBARDELLA et al., 2013).

O segundo evento para eficiência antimicrobiana dos neutrófilos corresponde a liberação do conteúdo enzimático antimicrobiano contida nos grânulos, a exemplo da

mieloperoxidase (MPO), uma proteína heme presente em grânulos azurófilos de neutrófilos. A MPO amplifica o potencial tóxico do H_2O_2 produzindo intermediários reativos. Em concentrações plasmáticas o íon cloreto pode ser substrato da MPO e formar o ácido hipocloroso (HOCl), que por sua vez, ao interagir com outra molécula de H_2O_2 pode gerar o oxigênio singleto (1O_2), uma molécula altamente citotóxica (**Figura 4**) (PANASENKO et al., 2005).

Um outro componente dos grânulos presente em neutrófilos são as proteínas matriz metaloproteinases (MMPs). Neutrófilos expressam a MMP-9 ou gelatinase B, armazenada em grânulos terciários, que degrada principalmente o colágeno tipo IV nativo e facilita sua migração para os tecidos (LINDSEY et al., 2001). No entanto, a MMP-9 tem ganhado uma maior atenção como uma protease reguladora do processamento de moléculas de sinalização, como citocinas, quimiocinas, hormônios, receptores e antígenos peptídicos (GARCÍA-PARDO; OPDENAKKER, 2015).

Os neutrófilos liberam a MMP-9 em resposta ao LPS *in vitro* (MASURE et al., 1991) bem como durante a bacteremia subletal e letal *in vivo*. Durante infecções bacterianas graves a MMP-9 foi encontrada em quantidades aumentadas no soro antes que diferentes quimiocinas e citocinas se elevassem na circulação (PAEMEN et al., 1997). Ainda camundongos deficientes em MMP-9 se mostraram resistentes a toxicidade induzida pela administração sistêmica do LPS, também conhecido como endotoxemia (DUBOIS et al., 2002). Do mesmo modo, durante a endotoxemia letal, a regasepina-1, um inibidor seletivo da MMP-9, elevou a sobrevivência de camundongos (HU et al., 2005).

A MMP-9 também já foi relacionada com a infiltração de neutrófilos para as vias aéreas em resposta à sinalização de TLRs induzida pelo vírus da gripe. Usando análises de mediadores inflamatórios foi mostrado que o fator quimiotático de neutrófilos, CCL3 e TNF- α foram reduzidos nas vias aéreas de animais deficientes para a molécula adaptadora da via dos TLRs MyD88. Nesse estudo também foi mostrado que o TNF- α induziu a secreção de MMP-9 por neutrófilos e o bloqueio desse fator *in vivo* reduziu o recrutamento celular após a infecção (BRADLEY et al., 2012). Isso sugere que os efeitos da MMP-9 são, pelo menos em parte, dependentes da ação de TLRs e importantes igualmente em infecções virais.

Um outro mecanismo para contenção de infecções descoberto mais recentemente são as NETs (BRINKMANN et al., 2004). As NETs podem se formar através de duas vias, sendo a primeira uma via de morte denominada NETose lítica, que começa com delobulação, desmontagem do envelope nuclear, descondensação da cromatina seguida da ruptura da membrana plasmática (FUCHS et al., 2007). A segunda constitui uma forma não lítica, que pode ocorrer independentemente da morte celular e envolve a liberação da cromatina advinda do DNA mitocondrial acompanhada pela degranulação de enzimas antimicrobianas, como a MPO, elastase e catepsina G (PILSCZEK et al., 2010; YIPP et al., 2012). Então, esses componentes são montados e formam citoplastos anucleados ativos que continuam a ingerir microrganismos (**Figura 5A**) (KRISHNAMOORTHY et al., 2018).

A formação de NETs pode ser desencadeada por microrganismos (bactérias, fungos, vírus, e seus PAMPs) e estímulos endógenos, como os padrões moleculares associados ao dano, a exemplo dos complexos imunes e dos cristais de colesterol (BEHNEN et al., 2014; WARNATSCH et al., 2015). Plaquetas ativadas também podem desencadear NETose através do receptor HMGB1 (do inglês *high mobility group protein B1*) e seus ligantes RAGE (do inglês *glycation end products*) (MAUGERI et al., 2014). Estímulos com moléculas sintéticas, como o PMA induzem NETose lítica através da ativação da enzima NADPH-oxidase e da produção de EROs (KESHARI et al., 2013). Já o LPS e moléculas opsonizadas com C5a desencadeiam NETose não lítica e a liberação de DNA advindo da mitocôndria (**Figura 5B**) (PIETERSE et al., 2016).

As EROs demonstram dois papéis principais para a NETose, primeiramente para ativação da enzima PAD4 (do inglês *protein-arginine deiminase 4*), que sequestra um grupamento amino do aminoácido arginina convertendo-o em citrulina, nas histonas H3 e H4, provocando a descondensação do DNA (ROHRBACH et al., 2012). Segundo, a degranulação e liberação das enzimas elastase e MPO, que são transportadas para o núcleo, onde agregam-se ao DNA (**Figura 5B**) (METZLER et al., 2011)

Por fim, ocorre o rompimento da membrana nuclear e interação do DNA com as enzimas citoplasmáticas, seguida da lise da membrana plasmática (**Figura 5B**) pela enzima Gasdermina D, cuja ativação é dependente da clivagem pela elastase, para liberação das NETs no meio extracelular (SOLLBERGER et al., 2018). Uma vez

liberadas, as NETs são capazes de aprisionar patógenos a partir da interação eletrostática entre os componentes de carga positiva da parede bacteriana com aqueles de carga negativa, a exemplo da cromatina. Além disso, as enzimas presentes nas NETs possuem atividades microbicidas, como a MPO, lisozima e elastase, que rompem a parede celular bacteriana (BRINKMANN et al., 2004).

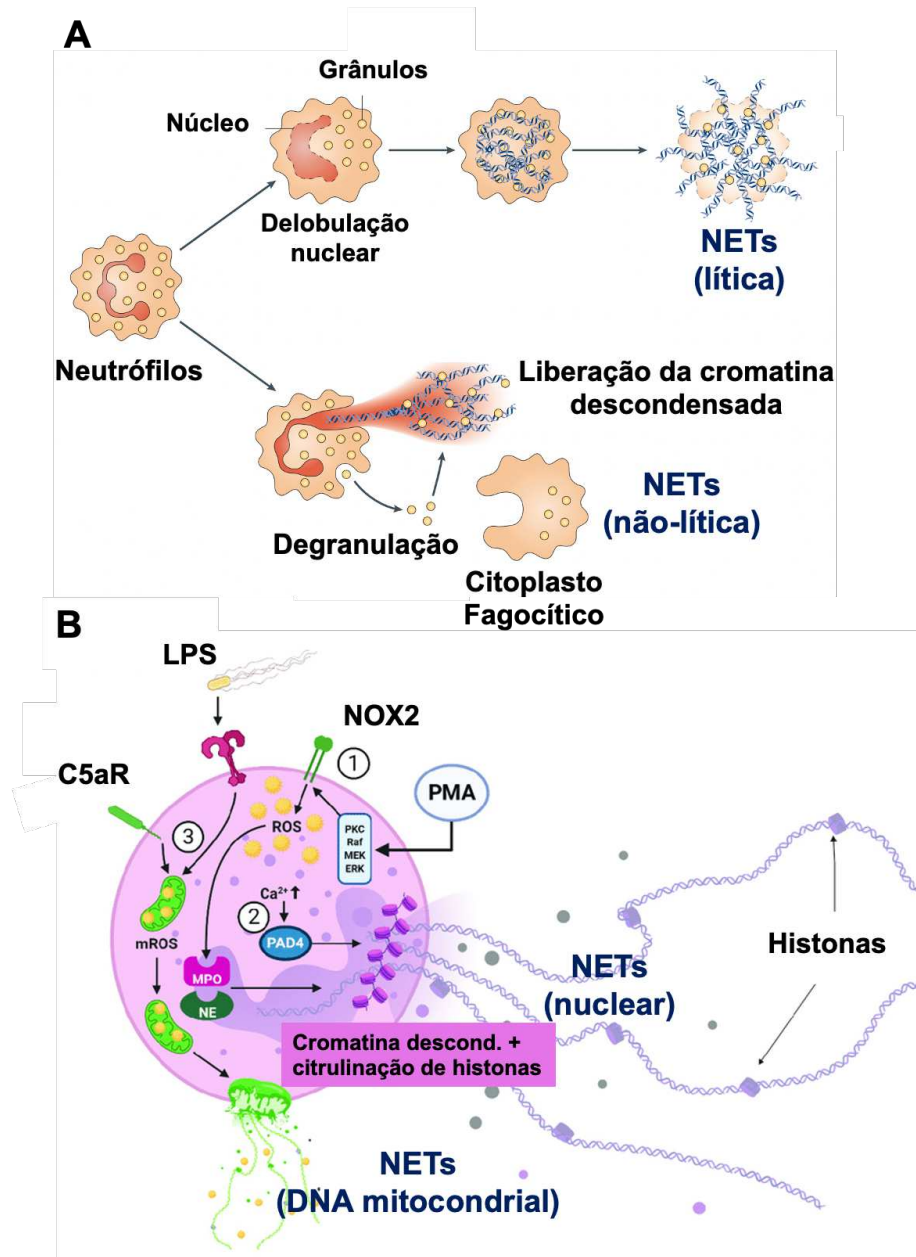


Figura 5. Mecanismos da formação de NETs. As NETs são estruturas extracelulares constituída de DNA e diversas enzimas antimicrobianas liberadas por degranulação. Existem dois tipos de NETose uma forma lítica com liberação de DNA nuclear e outra não-lítica a partir do DNA

mitocondrial (A). Diferentes estímulos como PMA, anticorpos ou cristais de colesterol induzem a NETose lítica, que ocorre em tempos mais tardios. Esses estímulos levam a ativação da NADPH oxidase, produção de EROs e atividade da enzima PAD4, o que resulta em descondensação da cromatina. Então, a elastase e MPO são translocadas para o núcleo onde promovem a citrulinização da cromatina e o desdobramento do DNA. Após o rompimento da membrana nuclear as NETs são liberadas e a célula morre. A NETose não lítica é induzida em minutos a partir da sinalização de TLR4 ou receptores para C5a. Nesse caso a enzima PAD4 é ativada e induz a descondensação da cromatina mitocondrial. Nesse caso, a elastase também é translocada para o núcleo para promover desdobramento da cromatina e ruptura da membrana nuclear. Contudo, a cromatina complexada a proteínas é expelida por vesículas e o neutrófilo continua como citoplasto fagocítico. NET = armadilhas extracelulares de neutrófilos; DNA = ácido desoxirribonucléico; PMA = phorbol-12-myristate-13-acetate; EROs = espécies reativas de oxigênio; PAD4 = protein-arginine deiminase 4; MPO = mieloperoxidase; TLR = receptores do tipo *toll* (Fonte: Adaptado de PAPAYANNOPOULOS, 2018; KLOPF et al., 2021)

Durante infecções as atividades efectoras de neutrófilos são potencializadas por fatores derivados do hospedeiro, como o G-CSF, interferon (IFN)- γ , TNF- α e/ou produtos derivados de patógenos, incluindo o LPS. Esses, por sua vez, aumentam significativamente a viabilidade e função efectora dos neutrófilos por meio da inibição da apoptose e/ou da indução de vias pró-inflamatórias (BORDON et al., 2013). A sobrevivência prolongada dos neutrófilos é benéfica para a ação microbicida. Porém, se desregulada, pode contribuir para a gênese de uma variedade de desordens, como sepse e a pneumonia, ou contribuir para doenças autoimunes, como as doenças inflamatórias intestinais e a artrite reumatoide (BORDON et al., 2013). Dessa forma, é importante explorar possíveis vias de regulação celular que limitem as ações citotóxicas dessas células e evitem os danos teciduais que contribuem para o desenvolvimento de doenças.

1.2 Regulação da atividade de neutrófilos e resolução da inflamação

1.2.1 Regulação via apoptose

A apoptose é a forma de morte celular programada não inflamatória mais bem descrita em neutrófilos, controlada por proteínas pertencentes à família homóloga Bcl-2 e mediada por proteases específicas conhecidas como caspases (CHIPUK et al., 2010). O processo apoptótico é caracterizado por uma cascata de eventos, que classicamente inclui a permeabilização da membrana externa mitocondrial, seguida da liberação do citocromo C e outras proteínas pró-apoptóticas no citosol, ativação de caspases,

fragmentação de DNA, condensação da cromatina, perda de assimetria da membrana, formação de corpos apoptóticos e, finalmente, geração de sinais que estimulam sua captação por fagócitos (RAVICHANDRAN, 2010).

Durante o processo de apoptose ocorre uma mudança significativa no fenótipo de neutrófilos humanos caracterizada pela regulação negativa dos membros da superfamília de imunoglobulinas PECAM-1 ou CD31, ICAM-3 ou CD50, CD66acde, CD66b, CD16 e as proteínas associadas à integrinas, alterando o potencial de adesão celular (FOX et al., 2010). As interações celulares podem ainda ser influenciadas pela redução da expressão de porções de carboidratos de superfície, como ácidos siálicos (SCHAUER, 2009). Além disso, a expressão reduzida de FcγRII (CD32), receptor de complemento tipo 1 (CD35) e receptores para mediadores pró-inflamatórios C5a (CD88) e TNFα (CD120b) durante a apoptose pode limitar a capacidade de resposta dos neutrófilos (FOX et al., 2010).

Neutrófilos ativados podem realizar suas funções efetoras e simultaneamente ativar mecanismos de morte celular em resposta a diferentes fatores intracelulares ou extracelulares. No entanto, mediadores inflamatórios derivados da infecção ou fatores endógenos relacionados, como o LPS ou o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), respectivamente, retardam a apoptose por promover a estabilidade mitocondrial e reduzir a atividade de caspases (WATSON et al., 1999; TURINA et al., 2005). Além disso, esses fatores também regulam negativamente a expressão gênica de Bax, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (DIBBERT et al., 1999).

Dessa forma, a apoptose constitui uma forma regulada de morte celular impedindo a liberação extracelular de conteúdos citotóxicos e proteolíticos. Uma melhor compreensão desse processo pode levar a novas terapias baseadas em estratégias para a resolução da inflamação com redução do dano tecidual.

Rossi et al. (2006) demonstrou o potencial do inibidor de cinases dependentes de ciclina (R-roscovitina, Seliciclib ou CYC202), que induz a apoptose dependente de caspases mesmo na presença de GM-CSF. Esse efeito foi acompanhado pela resolução da inflamação mediada em parte por neutrófilos em diferentes modelos animais de pleurisia aguda, injúria pulmonar e artrite (ROSSI et al., 2006). Além disso, a inibição farmacológica de ERK1/2 envolvida na sinalização de MAPK utilizando a ferramenta

farmacológica PD98059 acentuou a resolução da inflamação em um modelo de pleurisia, que também foi ligada a um aumento na apoptose de neutrófilos (SAWATZKY et al., 2006).

A sinalização da PI3K tem sido implicada na persistência da inflamação causada por neutrófilos e eosinófilos e, portanto, é reconhecida como um alvo para terapias anti-inflamatórias (PINHO et al., 2007). A caracterização de moléculas derivadas de lipídios encontradas endogenamente, a exemplo da 15-epi-lipoxina A4, também foi associada a apoptose de neutrófilos, suprimindo os mecanismos de sobrevivência induzidos pela MPO e mostrando um potencial promissor para os mecanismos de resolução da inflamação em modelos de lesão pulmonar (EL KEBIR et al., 2009).

Ainda, von Gunten et al. (2005) demonstrou que receptores com funções inibitórias em células imunes conhecidos como Siglecs (do inglês *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin*) também foram capazes de induzir a apoptose de neutrófilos dependente do microambiente de citocinas encontrado na circulação durante a sepse ou nos tecidos articulares de pacientes com artrite. Esses achados têm implicações importantes para a patogênese, diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias.

1.2.1 Regulação via receptores inibitórios

Os neutrófilos expressam vários receptores inibitórios que controlam especificamente suas funções. Esses receptores estão inseridos na membrana plasmática ou mesmo na membrana dos grânulos citoplasmáticos, e se mobilizam rapidamente para a superfície celular após um estímulo. Essa regulação positiva compõe uma maneira eficiente de aumentar rapidamente os sinais reguladores e limitar a ativação celular (FAVIER, 2016).

Os receptores inibitórios contendo domínios intracelulares ITIM (do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) são essenciais na regulação das respostas inflamatórias induzidas por infecções (LOWELL, 2011). Dentre eles destacam-se as proteínas CD300a e CD300f (ALVAREZ et al., 2008), os receptores de leucócitos semelhantes à imunoglobulina da subfamília B (LILRB2 e LILRB3) (COLONNA et al., 1998), o membro A da família 12 do domínio da lectina do tipo C (CLEC12A) (NEUMANN

et al., 2014), a imunoglobina emparelhada como o receptor alfa do tipo 2 (PILRA) (MOUSSEAU et al., 2000) e as lectinas Siglec-5 e Siglec-9 (RASHMI et al., 2009; ALI et al., 2014). Em especial esses receptores são ativados por ligantes expressos em células circunvizinhas, na própria membrana celular onde o receptor é encontrado ou na sua forma livre presente na circulação. Os ligantes mencionados incluem resíduos de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, glicoproteínas CEACAM1 (CD66a), proteínas do tipo angiopoetina, glicoproteínas associadas a mielina e os ácidos siálicos (FAVIER, 2016).

Uma vez ativados por esses ligantes, ocorre uma mudança conformacional do domínio intracelular dos receptores, que favorece à fosforilação de resíduos de tirosina presentes nos domínios ITIM por cinases da família Src. Isso leva ao recrutamento da região de homologia Src 2 contendo fosfatase 1 ou 2 (SHP-1 ou SHP-2) através de seus domínios SH2. SHP-1 e SHP-2, por sua vez, estão envolvidas com a rápida inibição da sinalização contínua das vias de ativação (LOWELL, 2011).

Em um estudo conduzido por Ali et al. (2014) a ativação de receptores Siglec-5 pela glicoproteína β de *Streptococcus* do grupo B leva a supressão da atividade de neutrófilos por inibir a via pró-inflamatória induzida pela p38 MAPK e AKT. Já Siglec-9 também já demonstrou inibição da ativação de neutrófilos devido à ligação às glicoproteínas sialiladas glicoforina na superfície dos eritrócitos (LIZCANO et al., 2017). Além disso, a regulação negativa promovida por Siglec-E, um ortólogo funcional de camundongos do Siglec-9 de humanos, inibiu o recrutamento de neutrófilos em modelos de inflamação pulmonar (MCMILLAN et al., 2013).

Entretanto, devido a capacidade de reduzir as funções de neutrófilos, os receptores inibitórios ativados por resíduos de ácidos siálicos são alvos atraentes para patógenos por meio da evasão das respostas imunes. Por exemplo, a bactéria *Streptococcus* do grupo B utiliza o seu conteúdo de ácidos siálicos para ativar receptores Siglec-9 na membrana de neutrófilos humanos resultando na diminuição da produção de EROs e da liberação de NETs (CARLIN et al., 2009). Já a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, uma das principais causas de infecções nosocomiais e um fator determinante para pacientes com fibrose cística, não é capaz de sintetizar ácidos siálicos. No entanto, ela pode adsorver glicoproteínas sialiladas encontradas no soro do hospedeiro e utilizá-

las para ativar receptores Siglec, evitando o reconhecimento e a resposta de neutrófilos para aumentar sua sobrevivência (KHATUA et al., 2012).

Essas evidências apontam para a sinalização celular mediada por ácidos siálicos como um componente interessante a ser estudado na perspectiva de modular a resposta desregulada do hospedeiro durante infecções.

1.3 Ácidos siálicos, neuraminidases e a modulação das funções biológicas

As membranas biológicas são decoradas com uma densa camada de carboidratos, dentre eles destacam-se os ácidos siálicos, um grupo de monossacarídeos formado por 40 derivados do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). O Neu5Ac (**Figura 6**) é o principal e mais abundante ácido siálico presente na porção terminal ou em parte de glicoproteínas e glicolípídios (VARKI et al., 2015), ou como descoberto mais recentemente, glicoRNAs de eucariotos (FLYNN et al., 2021). Uma segunda camada de complexidade desses glicoconjugados se dá a partir de diferentes ligações mediadas por sialiltransferases entre o carbono 2 (C-2) do Neu5Ac e carboidratos subjacentes (COHEN; VARKI, 2010; VARKI et al., 2015).

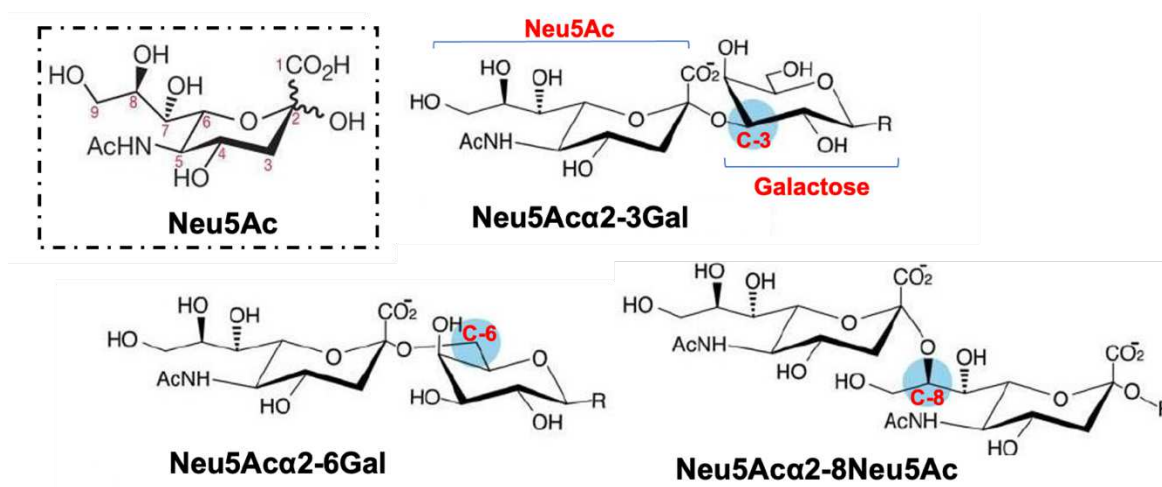


Figura 6. Neu5Ac e sua complexidade nos glicoconjugados. Estrutura do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) contendo um açúcar primário α -ceto ácido com 9 carbonos (A). Complexo secundário formado pela ligação entre Neu5Ac e uma galactose (α 2-3 e α 2-6) ou com outro Neu5Ac (α 2-8). Gal = galactose (Fonte: Adaptado de COHEN; VARKI, 2010; VARKI et al., 2015)

As sialiltransferases pertencem à família das glicosiltransferases 29 (CAZY GT_29) e compreendem enzimas que adicionam ácidos siálicos às porções terminais dos glicolipídios sialilados (gangliosídeos) ou às cadeias de açúcar N- ou O-ligadas a resíduos de Ser ou Thr. Essas enzimas catalisam a transferência de ácidos siálicos de moléculas doadoras ativadas para moléculas receptoras específicas, formando ligações glicosídicas (HARDUIN-LEPERS et al., 2001). A sialilação ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e é controlada pela disponibilidade de substrato, atividade enzimática, níveis de transcrição gênica e localização da enzima dentro das organelas (REILY et al., 2019). As ligações mais comuns ocorrem com o carbono 3 (C-3) ou 6 (C-6) de uma galactose, formando Neu5Ac α 2–3Gal e Neu5Ac α 2–6Gal, respectivamente, ou mesmo com o carbono 8 (C-8) de um outro ácido siálico (Neu5Ac α 2–8Neu5Ac) (**Figura 6**) (COHEN; VARKI, 2010; VARKI et al., 2015).

Os papéis funcionais dos ácidos siálicos nos sistemas biológicos de mamíferos são diversos e influenciados pelos compostos aos quais estão ligados, dessa forma, modificando, aprimorando ou diminuindo suas funções. As funções dos ácidos siálicos estão associadas à sua natureza eletronegativa levando a prevenção da agregação celular a partir da repulsão eletrostática ou facilitando a agregação por formar pontes de cálcio. Nas estruturas macromoleculares, os ácidos siálicos são importantes para manter a viscosidade de glicoproteínas e confere resistência proteolítica de várias sialoglicoproteínas, incluindo o fator intrínseco e sua capacidade de se ligar a vitamina D (SCHAUER, 1982; TRAVING; SCHAUER, 1998; GHOSH, 2020).

Além disso, o efeito anti-reconhecimento é uma das funções mais notáveis dos ácidos siálicos ao passo que essas moléculas mascaram os resíduos D-galactosil de glicoproteínas séricas e presentes na superfície membranar e a sua exposição é rapidamente reconhecida por receptores específicos na superfície dos hepatócitos seguida por rápida remoção das moléculas dessialiladas da circulação. Isso também inclui a base do reconhecimento de estruturas próprias e não próprias de acordo com seu padrão de expressão nas membranas e o seu papel na redução ou até impedimento a antigenicidade. Um exemplo disso é sua ação como determinantes antigênicos em diferentes ligações a outros açúcares presentes em antígenos de hemácias humanas, que auxiliam a determinar a especificidade dos grupos sanguíneos (SCHAUER, 1982;

TRAVING; SCHAUER, 1998; GHOSH, 2020). Mais recentemente a interação dos ácidos siálicos com receptores/lectinas têm sido cada vez mais associados como *checkpoints* moleculares direcionados ao sistema imunológico e a interação na patologia e terapia convencional de doenças (WIELGAT et al., 2020).

Neuraminidasas (NEU) ou sialidasas representam uma família de exoglicosidases (EC 3.2.1.18) que catalisam por hidrólise a clivagem de ligações α -glicosídicas, α -2-3, α -2-6 ou α -2-8, de ácidos siálicos presentes em cadeias de carboidratos em glicoproteínas, glicolipídios ou oligossacarídeos (MONTI et al., 2010). Sua estrutura típica está disposta em folhas-beta pregueadas organizadas em cadeias, cada uma composta de folhas-beta antiparalelas e um fragmento altamente conservado para sua atividade catalítica nos resíduos tyr334, glu111 e asp46 (CRENNELL et al., 1993; MOUSTAFA et al., 2004; MAURICE et al., 2016).

O papel mais notável das NEU se dá nas infecções virais, especialmente pelo vírus da influenza A e B. Foi demonstrado que os vírus da gripe exploram a dessialilação da proteína hemaglutinina presente na cápsula viral como uma âncora para se ligar em carboidratos de células hospedeiras do trato respiratório superior (**Figura 7**) (GLANZ et al., 2018).

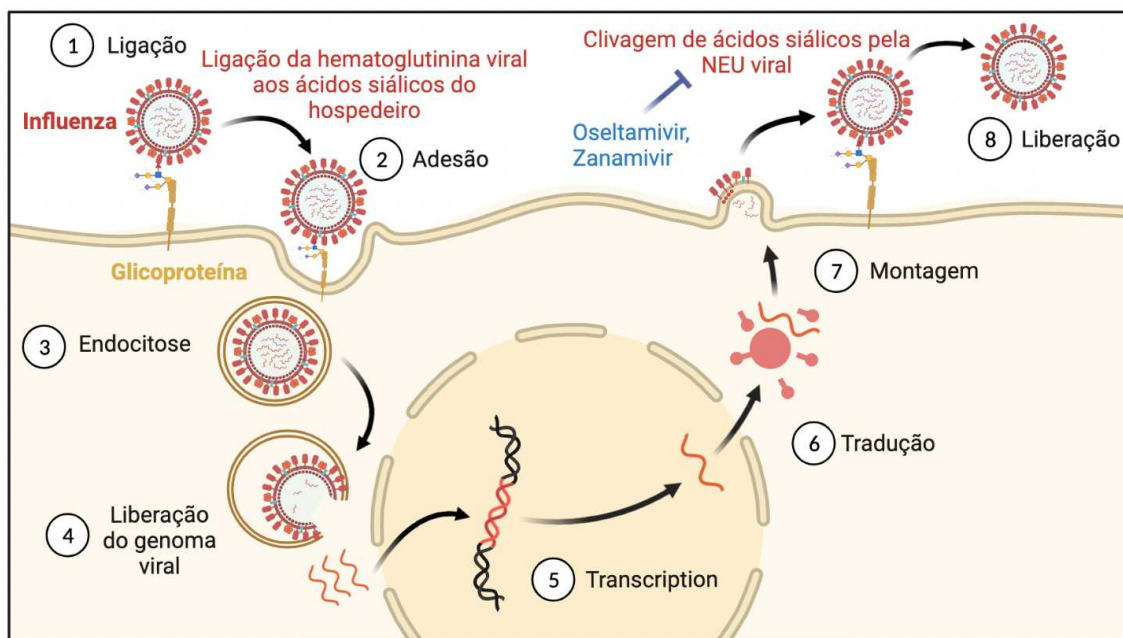


Figura 7. Ciclo do vírus influenza e o papel de NEU virais na infecção de células hospedeiras. O processo infeccioso começa a partir da ligação dos vírus às células hospedeiras

por meio da interação com receptores de superfície contendo resíduos de ácido siálico. Esses são então internalizados pela célula por endocitose seguido pela liberação do seu material genético para replicação. O novo RNA viral (ribonucleoproteína) e proteínas virais sintetizadas pela célula hospedeira se reúnem na superfície da célula constituindo novos vírions. Após o brotamento, esses vírions precisam ser separados da célula hospedeira pela NEU viral, sendo essa etapa o alvo dos inibidores da NEU anti-influenza usados na prática clínica. NEU = neuraminidases; RNA = ácido ribonucleico (Fonte: criado com Biorender)

Então, após formação das partículas virais na célula infectada os vírions recém-formados clivam essa molécula de carboidrato de ancoragem para fazer sua fuga e iniciar a infecção de outras células vizinhas (**Figura 7**) (GLANZ et al., 2018).

As primeiras tentativas de projetar inibidores específicos de NEU foram baseadas nos mecanismos de interação com o substrato. O composto sintético ácido 2-desoxi-2,3-didesidro-N- acetilneuramínico (Neu5Ac2en ou DANA), que é um análogo do Neu5Ac, inibe a liberação da progênie do vírus em cultura de tecidos, mas sem atividade antiviral. No início da década de 1990, a determinação cristalográfica da NEU do vírus influenza levou à descoberta do seu sítio ativo (VARGHESE et al., 1992; KIM et al., 1999). Isso forneceu a oportunidade de projetar novos inibidores mais efetivos e específicos para tratar a influenza, como o Zanamivir e o pró-fármaco fosfato de Oseltamivir, que ao ser biotransformado por esterases plasmáticas ou carboxilesterases hepáticas gera o carboxilato de oseltamivir (**Tabela 1**) (LINDEGARDH et al., 2006).

Tabela 1. Inibidores de NEU virais anti-influenza

	Zanamivir (Relenza®)	Oseltamivir (Tamiflu®)	Laninamivir (R-125489)	Peramivir (Rapiacta®)	TCN-032
Aprovação	1999 - Reino Unido/EUA	1999 - Reino Unido/EUA	2010 - Japão	2014 - Japão	Estudo de fase Clínica II
Via	Pó para inalação oral	Oral (pró-droga)	Inalação	Intravenosa	Intravenosa
Alvo	Influenza A e B	Influenza A e B	Influenza A e B	Influenza A e B	Influenza A e B
Especificações	Não recomendado para influenza severa Cepas resistentes (H1N1)	Cepas resistentes (H1N1) Forma ativa: Carboxilato de Oseltamivir	Eficácia comparável ao Zanamivir e Oseltamivir (H1N1, H1N3 e influenza B)	Aprovação emergencial (2009) para casos graves associados a resistência ao Oseltamivir	Mecanismo múltiplo por inibir o <i>budding</i> e a liberação das partículas virais

(Fonte: KIM et al., 1999; MOSCONA, 2005; LINDEGARDH et al., 2006; GRANDA et al., 2010; SUGAYA; OHASHI, 2010; ALAME et al., 2016)

Devido à alta taxa de mutações que ocorrem durante a replicação do genoma viral, as NEU são caracterizadas por uma alta variabilidade, que por sua vez, pode levar a resistência ao tratamento. Nesse sentido, muitos estudos tem mostrado o potencial promissor de novos inibidores de NEU, a exemplo do metadicol, um novo agonista inverso do receptor da vitamina D (RAGHAVAN; GV, 2019), bem como outros fármacos conhecidos como *non-sialic acid-like scaffolds*: N-acetilfenilalanilmetionina, ácido propanóico 3-[(2,5-dimetilfenil) carbamoil]-2-(piperazin-1-il), ácido 3-(propilaminossulfonil)-4- clorobenzóico, ácido ascórbico e a probenecida. Esses últimos foram capazes de inibir *in vitro* variantes resistentes H1N1 e H5N2 do vírus influenza A (MÁRQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2020).

Em mamíferos são conhecidos quatro subtipos de NEU (NEU1, NEU2, NEU3 e NEU4), cada uma diferindo da outra quanto a especificidade ao substrato, localização subcelular, propriedades cinéticas e funções celulares (**Tabela 2**) (MONTI et al., 2010; MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012). NEU1 é o subtipo que apresenta maior expressão em tecidos humanos comparado com NEU3 e NEU4, enquanto o nível de NEU2 é extremamente baixo (LIPNIČANOVÁ et al., 2020).

Tabela 2. Características gerais das quatro subtipos de NEU identificadas em mamíferos

Características	Subtipos de NEU			
	NEU1	NEU2	NEU3	NEU4
Localização	Lisossomos e membrana plasmática (sob estímulo)	Citosol	Membrana plasmática	Lisossomos, mitocôndria e membranas intracelulares
Substrato	Oligossacarídeos, e glicopeptídeos	Oligossacarídeos e glicoproteínas	Gangliosídeos	Oligossacarídeos, glicoproteínas e Gangliosídeos
pH ótimo	4,4 – 4,6	6,0 – 6,5	4,6 – 4,8	4,4 – 4,5
Função	Degradação em lisossomos, resposta imune, organização das fibras elásticas	Diferenciação de mioblastos e neural	Diferenciação neural, apoptose e adesão	Apoptose

(Fonte: Adaptado de MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012; LIPNIČANOVÁ et al., 2020)

O subtipo NEU1 apresenta um motivo de direcionamento lisossomal desempenhando papéis importantes na maturação e degradação dessa organela

(YOGALINGAM et al., 2008). Entretanto, estudos revelaram a localização subcelular da NEU1 na membrana plasmática sob condições de estimulação (LIANG et al., 2006; ABDULKHALEK et al., 2011), que parece estar conectada a novas funções fisiológicas. A atividade de NEU1 em linfócitos T ativados contribui para dessialilação de glicoconjugados específicos da superfície celular e para a produção de interferon (IFN)- γ (NAN et al., 2007). A NEU1 também parece contribuir para a regulação da fagocitose em macrófagos e células dendríticas através da dessialilação de receptores Fc para imunoglobulina G (SEYRANTEPE et al., 2010).

Já em plaquetas humanas de pacientes com trombocitopenia prolongada, uma complicação frequente em pacientes submetidos a transplante de células-tronco, também foi mostrado que a dessialilação mediada pelo aumento da expressão de NEU1 está associada à apoptose e fagocitose plaquetária (ZHANG et al., 2015). Por outro lado, a dessialilação do receptor do tipo toll (TLR)-4 pela NEU1 pode ser essencial para sua ativação bem como para manutenção dos seus sinais intracelulares via NF- κ B em células dendríticas e macrófagos (AMITH et al., 2010).

Ainda é incerto quais as funções de NEU2 em tecidos e células humanas devido ao seu baixo perfil de expressão. No entanto, evidências demonstram que NEU2 participa na diferenciação neuronal e de células musculares (FANZANI et al., 2004). Além disso, parecer estar implicada com o comportamento das células cancerígenas, influenciando na metástase a partir da modulação dos conteúdos de ácidos siálicos (KOSEKI et al., 2012).

Devido à sua especificidade de substrato e associação com a membrana plasmática, NEU3 é considerada uma molécula potencialmente importante para vários eventos que ocorrem na superfície celular. A NEU3 de murinos pode regular a apoptose em fibroblastos humanos (VALAPERTA et al., 2006), a proliferação e diferenciação em células de neuroblastoma (KOPITZ et al., 2001), na regulação e regeneração de neurônios do hipocampo de rato (DA SILVA et al., 2005). A regulação positiva de NEU3 também é observada em neoplasias, incluindo no câncer de cólon, renal, ovário e de próstata, embora a sua regulação negativa tenha sido observada na leucemia linfoblástica aguda ligada à progressão da doença (MANDAL et al., 2010).

A NEU4, por sua vez, dentre todos os subtipos de NEU é a que apresenta o maior espectro de substratos, chegando a hidrolisar até mesmo mucinas (SEYRANTEPE et al., 2004). Esse subtipo de NEU pode estar envolvido na apoptose de células neuronais (HASEGAWA et al., 2007) e de células de câncer de cólon humano (YAMANAMI et al., 2007).

Essas enzimas parecem desempenhar papéis importantes em diversas funções biológicas em humanos, incluindo funções imunes, e sua desregulação pode estar implicada na gênese de doenças. Levando isso em consideração, estudos buscam identificar inibidores seletivos para os 4 subtipos conhecidos da enzima. Em geral esses inibidores podem ser classificados como derivados não-carboidratos ou aqueles baseados na estrutura do Neu5Ac e do DANA (ALBOHY et al., 2013; CAIRO, 2014; GUO et al., 2018). Apesar dos avanços na formulação desses fármacos, poucos estudos são encontrados na literatura com sua avaliação e demonstrando suas propriedades terapêuticas.

Por outro lado, os inibidores de NEU virais apesar de serem extensamente estudados na terapia anti-influenza, agora estão sendo sugeridos e direcionados para agir nas enzimas dos hospedeiros. De fato, embora as NEU virais e de mamíferos não sejam completamente homólogas, elas compartilham uma porção catalítica semelhante, o que aumenta a possibilidade de inibição comum (BUSCHIAZZO; ALZARI, 2008; ALBOHY et al., 2011). Em um ensaio de inibição com as proteínas recombinantes humanas NEU2 e NEU3 foi mostrado que o Oseltamivir possui baixo efeito inibitório mesmo em concentrações milimolares, ao passo que o Zanamivir inibiu ambas na faixa micromolar (HATA et al., 2008).

Nesse contexto, a modulação da atividade sialidase do hospedeiro por fármacos inicialmente desenhados para inibir enzimas virais pode representar uma ferramenta útil na busca por novos alvos terapêuticos e o reposicionamento de fármacos para o tratamento de doenças.

1.4 Potencial terapêutico de inibidores de NEU do hospedeiro durante a inflamação sistêmica

1.4.1 Sepses

A sepsis corresponde a uma síndrome inflamatória com risco de vida, que tem como base uma infecção tecidual e sua disseminação para corrente sanguínea (GYAWALI et al., 2019). Diversas definições foram propostas ao longo dos anos a fim de melhor caracterizar a infecção grave, a exemplo da septicemia, síndrome séptica ou infecção generalizada. Atualmente a caracterização da sepsis se dá a partir do *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), que considera parâmetros clínicos envolvidos na função cardiovascular, respiratória, renal e hematológica, e avalia a disfunção orgânica por meio da presença de pelo menos 2 pontos de um escore que vai de 0 a 4. Já o choque séptico corresponde a uma anormalidade celular/metabólica secundária a sepsis caracterizada por hipotensão com necessidade de vasopressores após a falha da ressuscitação volêmica. Desde 2016 o termo “sepsis grave” está em desuso para simplificação da nomenclatura, sendo que o uso da palavra sepsis passa a estar restrito aos pacientes já com disfunção orgânica (JONES et al., 2009; ILAS, 2020; PAWAR et al., 2021).

Em um estudo observacional e retrospectivo conduzido entre 2010 e 2019 um total de 1.044.227 casos de sepsis (51,3/100 mil habitantes) foi relatado no Brasil. Ainda 463.000 óbitos (22,8 óbitos/100.000 habitantes) foram contabilizados, dos quais as maiores taxas ocorreram entre os idosos, da raça parda, sem diferença significativa entre os sexos. A região Sudeste foi responsável pelas maiores taxas de internação e óbitos (ALMEIDA et al., 2022). No mundo aproximadamente metade dos casos de sepsis ocorrem na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) onde um quarto dos pacientes que desenvolvem a forma grave morrerá durante a hospitalização, representando cerca de 19,7% de todas as mortes globais (RUDD et al., 2020).

A sepsis é frequentemente associada a ativação direta de células imunológicas residentes e células endoteliais pelos PAMPs, como o LPS. Esses PAMPs podem induzir por meio da interação com TLRs o recrutamento de neutrófilos e a liberação maciça de seus mediadores (GYAWALI et al., 2019). Apesar da sua função determinante no processo infeccioso, em pacientes com sepsis ocorre uma reprogramação de neutrófilos, manifestada por defeitos no seu recrutamento para os locais da infecção, porém com

migração e acúmulo anormal para tecidos não envolvidos. Associado a isso ainda pode ocorrer uma desregulação das respostas efetoras. À medida que a sepse evolui, eventos transcricionais são igualmente alterados, levando à uma modificação do padrão de expressão de genes pró-inflamatórios e imunomoduladores (KOVACH et al., 2012; SHEN et al., 2021).

Em geral durante uma infecção os microrganismos e seus PAMPs são eliminados por meio da resposta imune combinada ao uso de antibióticos, em geral de largo espectro, como piperacilina/tazobactam, ceftriaxona, cefepima, meropenem e imipenem/cilastatina (AHRQ, 2019). Entretanto, durante a sepse esses fármacos nem sempre são capazes de tratar propriamente a doença (SHORR et al., 2011; BASSETTI et al., 2018; PEETERS et al., 2019; HANCKOCK, 2020), sugerindo a resistência ao tratamento (MARTÍNEZ et al., 2020) e/ou a presença de outros fatores induzidos pela infecção que contribuem para o seu desenvolvimento.

Halbach et al., (2017) mostraram que a antibioticoterapia possui baixa efetividade em manter a sobrevivência de animais submetidos ao modelo experimental de sepse induzida pela ligação e punção do ceco (CLP). Entretanto, a inibição de NEU por meio dos inibidores DANA e ácido 2,3-desidro-2-desoxi-N-glicolilneuramínico (NeuGc2en) aumentou a sobrevivência dos animais no mesmo modelo, efeito esse potencializado pela adição do imipenem (CHEN et al., 2011). Esses resultados sugerem uma desregulação na atividade de NEU durante a infecção, e que a sua inibição pode ter efeito benéfico durante a sepse experimental. De fato, o aumento da presença de ácidos siálicos livres no soro de pacientes com sepse já foi demonstrada, e o monitoramento dos seus níveis podem ser considerados potenciais marcadores para o diagnóstico (YAO et al., 2020). Esses dados reforçam a hipótese do aumento da atividade de NEU durante esse contexto patológico.

Além disso, em animais deficientes para receptores que reconhecem ácidos siálicos (Siglec-G) ou para glicoproteínas que fornecem ácidos siálicos para esses receptores (CD24) apresentam uma menor taxa de sobrevivência durante a sepse induzida por CLP (CHEN et al., 2011). Diante desses achados, pode-se sugerir que a presença de ácidos siálicos, bem como, dos seus receptores também são importantes para manutenção da inflamação sistêmica durante a sepse.

No entanto, até então não se sabia se a clivagem de ácidos siálicos por NEU durante o curso da doença eram advindas do modelo de infecção, em outras palavras, por bactérias associadas a doença ou por enzimas derivadas do hospedeiro. Para tentar responder a esse questionamento Chen et al., (2014) conduziu um experimento de sepse induzida por LPS em animais deficientes para enzima NEU1 em células hematopoiéticas. Os resultados mostraram que a deficiência em NEU1 confere resistência dos animais após o desafio com o LPS, o que indica que a indução da atividade da enzima no hospedeiro é uma das fontes de clivagem de ácidos siálicos, e pode constituir um alvo terapêutico importante para a terapêutica.

Efeitos semelhantes foram encontrados por Yang et al., (2018) utilizando os modelos de sepse Gram-negativa induzidos pela administração sistêmica de uma cepa de *E. coli* que não expressa a NEU bacteriana. Esse estudo mostrou que a infecção induz o aumento da atividade de NEU1 e NEU3 de forma dependente de TLR4, que por sua vez, a partir da remoção dos ácidos siálicos acelera a depuração de glicoproteínas envolvidas na desintoxicação do LPS. Esse efeito foi inibido pelo tratamento com o inibidor de NEU viral zanamivir, reforçando mais uma vez o papel da enzima na progressão da doença.

Evidências tem mostrado que a regulação da função dos neutrófilos pode reduzir os danos teciduais, aprimorar a depuração bacteriana e melhorar o desfecho da sepse. Isso apoia a ideia de que ter como alvo os neutrófilos pode representar uma estratégia promissora para o tratamento da doença (SHEN et al., 2021). No entanto, até o presente momento não há estudos na literatura que correlacionem a ativação enzimática de NEU e a remoção de ácidos siálicos com a desregulação de neutrófilos durante a sepse.

1.4.2 COVID-19

A COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*), doença causada pelo SARS-CoV-2 (do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), tornou-se pandêmica, afetando mais de 579 milhões de pessoas em todo o mundo, com mais de 6,41 milhões mortes até agosto de 2022 (OUR WORLD IN DATA, 2022). Seu quadro clínico varia de pacientes assintomáticos, com sintomas leves e autolimitados, a sintomas

graves com desconforto respiratório agudo, que se desenvolve e pode progredir rapidamente para insuficiência respiratória (LAI et al., 2020). Nos casos mais graves ocorre a conhecida tempestade de citocinas, que parece ser responsável pela falência de múltiplos órgãos (WANG et al., 2020). Os pacientes com COVID-19 podem apresentar sinais e sintomas semelhantes aos observados na sepse, muitos dos quais resultam em microtrombose, disfunção orgânica e, eventualmente, no choque séptico (GUAN et al., 2020).

A fisiopatologia do COVID-19 grave é marcada por alterações na abundância, fenótipo e funcionalidade de neutrófilos. Após a infecção pelo SARS-CoV-2, foram observados números elevados de neutrófilos no epitélio nasofaríngeo e posteriormente nas partes mais distais do pulmão (CHUA et al., 2020). O aumento da contagem de neutrófilos também foi mostrado como uma característica da COVID-19 apresentando assinaturas transcricionais de ativação e relacionada aos casos mais graves da doença (MEIZLISH et al. 2021). Além disso, os níveis plasmáticos de RETN (do inglês *circulating myeloid cells produce the cytokine resistin*), HGF (do inglês *hepatocyte growth factor*) e LCN2 (do inglês *lipocalin-2*), tipicamente produzidos por neutrófilos, foram propostos como preditivos de doença crítica e de mortalidade (MEIZLISH et al. 2021).

Ainda, o aumento do número de neutrófilos circulantes se relaciona ao dano de órgãos mediado pela liberação de NETs (VERAS et al., 2020), EROs, citocinas e pela degranulação (LAFORGE et al., 2020; GUO et al., 2021). Por outro lado, a forma grave da doença também está implicada com um aumento significativo das populações de neutrófilos ativados, imaturos e com características de imunossupressão definidas pela expressão de CD11b, CD16, CD24, CD34, CD38, CD10, LOX-1 e PDL-1 e mostrando características de ativação recente, com aumento da expressão de CD64, RANK e RANKL, e expressão reduzida de CD62L (SILVIN et al. 2020).

Em função do papel fundamental do dano tecidual induzido por neutrófilos na patologia do COVID-19, direcionar as funções efetoras ou o extravasamento dessas células para os pulmões constitui uma oportunidade promissora de intervenção farmacológica. Devido à necessidade atual de opções terapêuticas adicionais para pacientes graves com COVID-19, várias estratégias estão sob investigação clínica

visando diferentes aspectos da resposta do hospedeiro à infecção por SARS-CoV-2 (CHIANG et al., 2020).

Com a chegada da vacina para COVID-19 resultados importantes foram alcançados, desde a redução da taxa geral de ataque, em especial entre os indivíduos com 65 anos ou considerados grupo de risco. Além disso, houve uma diminuição acentuada das hospitalizações dentro ou fora da UTI e óbitos diminuindo em mais de 50% (SHOUKAT et al., 2021; MOUTINHO, 2021; WATSON et al., 2022). No entanto, os efeitos da vacinação diminuem ao longo do tempo necessitando doses de reforço (EYRE et al., 2022), além da sua baixa efetividade em alguns indivíduos (MUNRO, 2021; PARKER et al., 2022).

Nos EUA a *Food and Drug Administration (FDA)* aprovou tratamentos medicamentosos para alguns casos de COVID-19, como o antiviral remdesivir e o imunomodulador baracitinib, e autorizou tantos outros para uso emergencial durante a pandemia. Além disso, muitas outras terapias ainda estão sendo testadas em ensaios clínicos para avaliar se são seguras e eficazes (FDA, 2022). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou uso emergencial do antiviral molnupiravir, um antiviral indicado a pacientes adultos que não requerem oxigênio suplementar e apresentam risco de progressão para a forma grave da doença (ANVISA, 2022).

Nosso grupo de pesquisa tem buscado entender a biologia de neutrófilos durante o curso de doenças inflamatórias sistêmicas na perspectiva de identificar possíveis alvos terapêuticos. Nesse sentido, decidimos investigar o papel da sialilação e a ativação de NEU em neutrófilos como possíveis fontes de desregulação e o dano de órgãos durante a COVID-19.

2. HIPÓTESE

A atividade aumentada de NEU do hospedeiro leva a clivagem de ácidos siálicos presentes em glicoconjugados da membrana plasmática de neutrófilos, a ativação celular e a exacerbação das suas funções em resposta ao LPS *in vitro*. *In vivo* essas enzimas podem constituir um alvo molecular para regulação das respostas celulares durante a sepse e a COVID-19.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a influência de NEU do hospedeiro na desregulação de neutrófilos avaliada a partir de abordagens *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

3.2 Específicos

- Avaliar a propriedade do LPS em estimular a atividade de NEU em leucócitos humanos e validar o uso de inibidores de NEU virais como ferramentas para inibir a enzima do hospedeiro;
- Estudar o papel das NEU em neutrófilos humanos estimuladas pelo LPS na clivagem de ácidos siálicos ($\alpha 2,3/2,6$) e alteração do fenótipo a partir da investigação de marcadores da ativação celular (CD66b, CD62L, CXCR2, CD11b);
- Identificar o papel das NEU de neutrófilos humanos estimuladas pelo LPS na clivagem de ácidos siálicos ($\alpha 2,3/2,6$) e alteração funcional da fagocitose, *killing* de bactéria, produção de EROs e liberação de NETs;
- Investigar os mecanismos de ativação de NEU em neutrófilos humanos estimulados pelo LPS;
- Avaliar o papel de NEU do hospedeiro nos modelos de sepse experimental induzida por peritonite e pneumonia em camundongos;
- Estudar a atividade de NEU em neutrófilos de pacientes com COVID-19;
- Avaliar o papel de NEU do hospedeiro em um modelo de inflamação pulmonar aguda semelhante a COVID-19 induzida por um betacoronavírus de murinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de sangue humano

Amostras de sangue foram coletadas de doadores saudáveis (25 a 45 anos) em tubos livres de endotoxinas contendo K₃EDTA (Labor Import, Brasil). Todos os participantes deram seu consentimento informado por escrito para coleta de sangue após serem informados sobre os procedimentos e declararem ausência de sintomas de doenças crônicas ou infecciosas (tosse, febre, fadiga, dores no corpo), estresse ou ingestão de álcool nas últimas 24 horas (tabela contendo características demográficas e laboratoriais encontrada em **ANEXOS**).

O projeto da pesquisa seguiu a Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob protocolo CAAE nº 82815718.2.0000.0121. Amostras de sangue também foram coletadas de pacientes com COVID-19 grave (n= 6; 25 a 89 anos) ou convalescentes (n= 8; 25 a 89 anos) internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Centro de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas - NUPAIVA do Hospital Universitário da UFSC de agosto a outubro de 2020. Amostras de pacientes graves com COVID-19 internados no Departamento de Pneumologia do Hospital Cochin (n= 10; 49 a 93 anos) e na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Bichat (n= 6; 66 a 76 anos), *Assistance Publique Hôpitaux de Paris*, França (fevereiro de 2021 a janeiro de 2022). Amostras de sangue de doadores saudáveis do mesmo sexo foram usadas como controles. Todos os pacientes, doadores ou familiares próximos deram consentimento para participação no estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CAAE nº 36944620.5.1001.0121) e do *Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV* (ID-RCB 2020-A02700-39). Uma tabela encontrada em **ANEXOS** resume os registros clínicos e laboratoriais dos pacientes.

Para o isolamento de neutrófilos ou monócitos foi utilizado o método de centrifugação utilizando o gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (WITKO-SARSAT et al., 2010) seguido ou não pelo kit de seleção positiva EasySep™ HLA Chimerism CD15 para neutrófilos ou kit de seleção positiva StemSep™ Human CD14 para monócitos de

acordo com às instruções do fabricante. Em seguida, células isoladas (99%) foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher) para realização dos experimentos *in vitro*.

4.2 Avaliação da resposta de neutrófilos *in vitro*

Os experimentos foram realizados com 1×10^6 neutrófilos isolados ou com um volume de sangue total contendo 1×10^6 leucócitos seguido de lise das hemácias. As células foram incubadas (37°C e 5% de CO₂) na presença ou ausência de LPS (1 µg/mL, *E. coli* 0127:b8, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA), proteína recombinante humana (rh) S100A8 (2 µM, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), Oseltamivir fosfato (100 µM, Sigma-Aldrich) ou Zanamivir (30 µM, Sigma-Aldrich) por 90 min, pré-incubado ou não com a lectina *Maackia amurensis* (MAL)-II (1 µg/mL, Vector Labs, San Diego, CA, EUA) ou o inibidor de metaloproteinase (MMP)-9 (CAS 1177749-58-4, 5 nM, Calbiochem) por 30 min. As concentrações de Oseltamivir (100 µM) e Zanamivir (30 µM) foram escolhidas a partir de curvas concentração-efeito (10-300 µM para o Oseltamivir e 1-100 µM para o Zanamivir) com efeito mínimo na apoptose/necrose celular (95% de viabilidade celular). As concentrações de Oseltamivir e Zanamivir utilizadas *in vitro* são semelhantes às encontradas no soro e tecidos humanos após a absorção dos fármacos (CASS et al., 1999; DAVIES, 2010).

Para evitar a competição entre proteínas sialilada presente no plasma e na superfície celular, apenas neutrófilos isolados ou leucócitos totais foram utilizados ao invés de sangue total para avaliar o efeito da neuraminidase exógena isolada de *Clostridium perfringens* (CpNEU). Neutrófilos isolados ou leucócitos totais foram incubados (37°C, 5% CO₂) na presença ou ausência de CpNEU (10 mU, Sigma-Aldrich), Oseltamivir (100 µM) ou Zanamivir (30 µM) por 60 min, após a pré-incubação (30 min) ou não com MAL-II (1 µg/mL).

4.2.1 Avaliação do conteúdo de ácidos siálicos e ativação de neutrófilos

Neutrófilos isolados ou leucócitos totais foram ressuspensos em tampão de citometria de fluxo (FACS) (2 mM EDTA/PBS). Então, as células foram marcadas com um *mix* de anticorpos contendo anti-CD66b (G10F5; BioLegend), CD62L (DREG-56; BioLegend), CD16 (3G8; BioLegend), CD11b (ICRF44; BioLegend), CXCR2 (5E8; BioLegend), ou seus respectivos isotipos, para avaliação dos marcadores da ativação celular.

Além disso, a lectina MAL-II (Vector Labs) foi utilizada para detecção de ácidos siálicos de superfície na conformação α 2,3, a lectina *Sambucus nigra* (Elderberry Bark) (SNA, Thermo Fisher) para detectar ácidos siálicos na conformação α 2,6, e a *peanut agglutinin* da *Arachis hypogaea* (PNA, Thermo Fisher) para o reconhecimento de resíduos terminais de β -galactose em glicoconjugados.

Monócitos humanos isolados (1×10^6) foram marcados com um *mix* de anticorpos anti-CD14 (M0Pg; BD Bioscience), CD11b, CD11c (3.9; BioLegend) ou CD64 (10.1; BD Bioscience), bem como com as lectinas MAL-II, SNA e PNA.

O anticorpo mouse anti-human NEU1 (Proteintech, UK) foi utilizado seguido da incubação com um anti-mouse Alexa Fluor 555 para avaliar a expressão de membrana de NEU1 em condições basais (sem estímulo) e após o estímulo com LPS, conforme descrito anteriormente.

Todas as marcações para citometria de fluxo aconteceram na presença do human BD Fc Block™ (BD Pharmingen™) e do Fixable Viability Stain (FVS, BD Horizon™, San Jose, CA, EUA) e incubados por 30 min a 4°C. Após a marcação as células foram lavadas, ressuspensas em tampão FACS, adquiridas no FACSVerse (BD Bioscience, Piscataway, NJ, EUA) ou Cytex Aurora (Cytex Biosciences, Fremont, CA, EUA). Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos em cada amostra e a análise foi realizada em células FVS/CD66b⁺/CD15⁺ utilizando o software FlowJo 10.8.1 (FlowJo LLC) e os resultados expressos como MFI (do inglês *median of fluorescence intensity*). A estratégia de *gate* utilizada para as análises por FACS encontra-se em **ANEXOS**.

4.2.2 Avaliação da fagocitose por neutrófilos

Leucócitos totais (1×10^6) foram incubados a 37°C (5% de CO₂) ou a 4°C (controle) com pHrodo™ Red *E. coli* BioParticles® (100 µg/mL; Thermo Fisher) por 60 min. Após o tempo de incubação as biopartículas fagocitadas emitiram fluorescência em meio ácido e a fluorescência avaliada em células FVS⁻/CD66b⁺ nos diferentes grupos e tratamentos por FACS e expressos como MFI. Além disso, leucócitos totais também foram incubados com 1×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC; 1:1) de *E. coli* viáveis (ATCC 25922) por 90 min (37°C, 5% CO₂). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes (2 mM EDTA/PBS), fixadas (tampão FACS/PFA 2%) e a porcentagem de neutrófilos com bactérias ou a porcentagem de neutrófilos com ≥ 3 bactérias foi analisada por microscopia de luz usando o Diferencial Quick Stain Kit (Laborclin, Brasil).

4.2.3 Avaliação do *killing* de *E. coli*

Leucócitos totais (1×10^6) foram incubados (37°C, 5% CO₂) com 1×10^6 UFC (1:1) de *E. coli* viáveis (ATCC 25922) por 180 min. As amostras foram centrifugadas (270 g, 7 min, 4°C) e 10 µL do sobrenadante foram diluídos de forma seriada e semeados em ágar cerebral - infusão cardíaca (BHI, Kasvi, Brasil) para quantificar as bactérias extracelulares viáveis na forma de UFC. Então, as células foram lavadas duas vezes com PBS/2 mM EDTA (270 g, 7 min, 4 °C), os leucócitos foram lisados com 2% Triton-X, lavados (PBS, 2000 g, 15 min, 4 oC), ressuspensos em PBS e 10 µL de amostras foram diluídas de forma seriada até 10^6 e semeadas em ágar BHI para contagem das UFC. Os dados foram expressos como UFC/mL.

4.2.4 Avaliação da ativação da NADPH-oxidase e produção de ROS

Leucócitos totais ou neutrófilos isolados (1×10^6) foram incubados a 37°C (5% CO₂) com 10 µM de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA, Thermo Fisher) por 5 min. Em seguida, as células foram estimuladas ou não com 0,1 µg/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por 10 min, fixadas, lavadas duas vezes com PBS/2 mM EDTA (270 g, 7 min, 4°C) e analisadas por FACS, como descrito anteriormente. Neutrófilos isolados (1×10^5) foram lavados e ressuspensos com 0,1 mL de HBSS

contendo 10 μM do luminol e estimulados ou não com PMA (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), zimosan opsonizado (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou f-MLF (1 μM). A quimioluminescência (CL) foi registrada a 37°C em um luminômetro (Berthold-Biolumat LB937) em duplicata durante 40 min e expressa como contagens totais integradas.

4.2.5 Avaliação da liberação de NETs

A quantificação de NETs foi realizada no sobrenadante de neutrófilos isolados em função dos tratamentos descritos anteriormente. Para essa avaliação um anticorpo anti-MPO ligado a uma placa de fundo plano de 96 poços capturou a enzima MPO (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Abcam Plc, UK), e a quantidade de DNA ligado à enzima foi quantificada usando o kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade de fluorescência (Ex 488 nm/Em 525 nm) foi quantificada em um Leitor de Microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram expressos por nanograma (ng) por mililitro (mL) do complexo DNA/MPO.

4.3 Avaliação da cinética da atividade de neuraminidase

Neutrófilos isolados ou leucócitos totais ($0,5 \times 10^6$) foram ressuspensos em HBSS e adicionados a uma placa escura de fundo plano de 96 poços (SPL Life Sciences, Coréia do Sul) em gelo. Em seguida, foi adicionado substrato da enzima o ácido 4-metilumbeliferil-N-acetil- α -D-neurâmico (4-MU-NANA, 0,025 mM; Sigma-Aldrich) seguido de meio HBSS, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rh S100A8 (2 μM), Oseltamivir (100 μM), Zanamivir (30 μM), MAL-II (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou MMP-9i (5 μM). CpNEU (10 mU) com ou sem Oseltamivir ou Zanamivir foram usados como controles positivos do ensaio. O volume foi completado para 200 μL com HBSS, seguido de leitura no Leitor de Microplacas Spectramax® Paradigm® ou Tecan® Fluorescence, iniciando 3 min após e a cada 5 min por 30 ou 55 min a 37 °C. A atividade da sialidase também foi avaliada em neutrófilos isolados, inativados pelo calor ou plasma fresco de pacientes graves com COVID-19 na presença ou ausência de Oseltamivir (100 μM) ou Zanamivir (30 μM) usando o multileitor Tecan

Infinite 200. A formação do substrato fluorescente 4-MU-NANA foi detectada em ex 350 nm/em 450 nm. Os resultados foram expressos em fluorescência em função do tempo e pelos valores de área sobre a curva (AUC, do inglês *area under de curve*).

4.4 Ensaio de Imunofluorescência e Duolink Protein Ligation Assay (PLA)

Neutrófilos isolados ($0,3 \times 10^6$ /lâmina) foram fixados com paraformaldeído a 2% por 30 min e bloqueados com BSA/PBS a 5%. As células foram então incubadas por 1 h a 37°C com MAL-II (15 µg/mL) ou com mouse anti-human NEU1 (1:50; Proteintech, UK) diluído em 1% BSA/PBS. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com estreptavidina Alexa Fluor 555 (1:1000; s32355 Life) ou com um goat anti-mouse Alexa Fluor 555 (1:500; ThermoFisher) por 30 min a 37°C.

Para o ensaio Duolink PLA (Sigma Aldrich), as células foram primeiro incubadas com um mouse anti-human NEU1 (1:100) e com um rabbit anti-human MMP-9 (1:100; Invitrogen). Os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, que envolveu a incubação com as probes anti-mouse MINUS e anti-rabbit PLUS, seguida pelas etapas de ligação, amplificação e detecção.

Então, as lâminas foram preparadas e os núcleos corados com meio de montagem contendo o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma Aldrich). As lâminas foram examinadas com um microscópio de fluorescência Widefield Zeiss (magnificação 100x) e as imagens foram importadas para o software ImageJ para posterior análise. As imagens foram capturadas em diferentes campos e a imunomarcação avaliada a partir do MFI de cada campo normalizada pelo número de células DAPI⁺. Os controles internos para cada técnica encontram-se em **ANEXOS**.

4.5 Análise de dados públicos de *Single-Cell RNA sequencing* (scRNA-seq)

Dados de scRNA-seq publicamente disponíveis foram obtidos a partir de *swabs* nasofaríngeos, escovas de espécimes brônquicas (PSBs) e lavados brônquicos (BLs) de doadores saudáveis e pacientes com COVID-19. Os dados foram obtidos do estudo inicial conduzido por Chua et al., (2020) e obtido de banco de dados:

https://figshare.com/articles/dataset/COVID-19_severity_correlates_with_airway_epithelium-immune_cell_interactions_identified_by_single-cell_analysis/12436517.

Dados brutos de contagem, dados normalizados e coordenadas UMAP geradas pelos autores da publicação original foram importados para o CellRouter para análise (Lummertz da Rocha et al., 2018).

4.6 Avaliação das respostas da incubação do plasma de pacientes com COVID-19 com neutrófilos de doadores saudáveis

Amostras de sangue total de doadores saudáveis do mesmo sexo (n= 7) foram incubadas por 2 horas (37°C, 5% CO₂) com 7% de plasma fresco de doadores saudáveis, pacientes graves ou convalescentes com COVID-19. Além disso, a incubação com plasma inativado pelo calor (56°C, 30 min) de pacientes graves com COVID-19 na presença ou ausência de Oseltamivir (100 µM) ou Zanamivir (30 µM) também foi conduzida. Os níveis de superfície de ácidos siálicos α2-3, CD66b e a produção de ROS foram avaliados por FACS e os resultados expressos como MFI.

4.7 Camundongos e experimentos *in vivo*

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 (25-30 g) e *Swiss* (35-40 g) foram fornecidos pelo Biotério do departamento MIP ou pelo Biotério Central da UFSC, respectivamente, e utilizados nos modelos experimentais de sepse induzida por peritonite ou por pneumonia. Camundongos C57BL/6 fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados no modelo de lesão pulmonar induzida pelo coronavírus murino *Mouse Hepatitis Virus 3* (MHV-3). Os camundongos foram pré-tratados aleatoriamente e/ou pós-tratados por via oral (PO, 12/12 h) com solução salina/carboximetil celulose (CMC) 5% ou fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, Eurofarma, Brasil). Os animais foram mantidos em uma sala ambientalmente controlada (20-22°C, 40-60% de umidade relativa e 12 horas alternando ciclo claro/escuro com livre acesso a água e comida). A análise de todas as amostras de animais foi realizada de forma duplo-cega. Todos os esforços foram feitos para minimizar

o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados. Os animais foram sacrificados em uma câmara de CO₂ se os pontos finais humanitários fossem atingidos (perda de peso $\geq 20\%$ do peso corporal pré-experimental). O bem-estar animal e os procedimentos experimentais foram realizados estritamente de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, EUA). Todos os procedimentos com animais seguiram as diretrizes ARRIVE (KILKENNY et al., 2012). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA #8278290818) e da UFMG (CEUA #8278290818).

4.8 Modelo de sepse induzida por *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e ligação e punção do cécum (CLP)

Cepas de *E. coli* (ATCC 25922, Manassas, VA, EUA) ou *K. pneumoniae* (ATCC 700603) foram utilizadas para indução da sepse por peritonite ou pneumonia em camundongos.

Camundongos foram desafiados por via intraperitoneal (IP) com 100 μL de 1×10^7 UFC de uma suspensão de *E. coli*. Um grupo de camundongos sépticos foi pré-tratado aleatoriamente (2 h antes da infecção) e pós-tratado por via oral (PO, 12/12 h) com solução salina ou fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, Eurofarma, Brasil) por 4 dias para análise de sobrevivência. Outro grupo foi pré-tratado 2 horas antes da infecção com uma dose única de fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, PO) e a resposta fisiopatológica foi analisada 4 e 6 horas após a infecção. Camundongos sépticos também foram aleatoriamente pós-tratados (6 h após a infecção, 12/12 h) com solução salina ou fosfato de oseltamivir (PO, 10 mg/kg) por 4 dias para análise de sobrevivência. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) da sobrevivência em cada grupo.

Para sepse induzida por pneumonia, camundongos foram anestesiados com isoflurano (3-5% vol; BioChimico, Brasil) e colocados em posição supina. Uma pequena incisão foi feita no pescoço onde a traqueia poderia ser localizada, e uma suspensão de *K. pneumoniae* (4×10^8 UFC/50 μL de PBS) foi injetada na traqueia com uma agulha estéril de calibre 30. A pele dos animais foi suturada e os animais foram deixados para recuperação em uma gaiola aquecida. Após 6 horas de infecção e depois 12/12 horas,

os camundongos foram tratados com fosfato de oseltamivir (PO, 10 mg/kg) para análise de sobrevivência. Em outro conjunto de experimentos, a pneumonia foi induzida e os camundongos foram tratados 6 horas após a infecção com uma dose única de fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, PO) para coleta de material e análise da resposta fisiopatológica 24 horas após a infecção.

Para o modelo de sepse induzida por CLP, os camundongos foram anestesiados com xilazina (2 mg/kg, IP, Syntec, Brasil) seguido de isoflurano (3-5% vol), e uma incisão na linha média de 1 cm foi feita no abdome anterior. Então, o ceco foi exposto e ligado abaixo da junção ileocecal. Além disso, o ceco foi perfurado duas vezes com uma agulha de calibre 18 e suavemente pressionado para permitir que seu conteúdo fosse liberado pelas punções. Animais Sham-operados (Sham) foram submetidos a laparotomia idêntica, mas sem ligadura cecal e punção. O ceco foi reposicionado no abdome e a parede peritoneal foi suturada. Todos os animais receberam 1 mL de soro fisiológico 0,9% subcutâneo (SC) e 100 µL de tramadol (5 mg/kg, SC, Vitalis, Brasil) imediatamente após a cirurgia. Camundongos sépticos foram tratados aleatoriamente (começando 6 h após a infecção, PO) com 100 µL de solução salina ou fosfato de Oseltamivir (10 mg/kg, 12/12 h) por 36 h. Em outro conjunto de experimentos, camundongos sépticos foram tratados aleatoriamente IP (6 h após a infecção, 12/12 h) durante 4 dias com 100 µL de metronidazol (15 mg/kg, Isofarma, Brasil), ceftriaxona (40 mg/kg, Eurofarma, Brasil) e fosfato de oseltamivir (10 mg/kg) ou apenas soro fisiológico por via oral para análise da sobrevivência. Os animais também foram tratados para análise da resposta 48 horas após CLP.

4.8.1 Análise da migração de neutrófilos

Após a eutanásia os lavados broncoalveolar (LBA) e peritoneal (LP) foram coletados e o número de neutrófilos foi determinado 4 e 6 horas após a administração de *E. coli*, 24 horas após infecção por *K. pneumoniae* ou 48 horas após CLP. Em seguida, os camundongos foram perfundidos com PBS/EDTA (1 mM) e os pulmões foram coletados, macerados e passados por filtros de células de nylon de 40 µm. As suspensões celulares foram centrifugadas em solução de Percoll® a 35% (315 mOsm/kg,

Sigma-Aldrich) por 15 min a 700 g para enriquecer as populações de leucócitos. O número de células foi determinado utilizando um contador de células (Coulter ACT, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) ou um hemocítômetro. As contagens diferenciais também foram determinadas em esfregaços corados usando o kit Differential Quick Stain (Laborclin, Brasil). Amostras de sangue também foram coletadas por punção cardíaca em tubos contendo heparina para posterior análise. Os neutrófilos no LP ou BAL foram marcados com anti-Ly-6G/Ly-6C (GR-1, RB6-8C5; BioLegend) e MAL-II para serem posteriormente analisados por FACS, conforme descrito anteriormente. A análise foi realizada em células SSC^{high}/GR-1^{high} e os resultados expresso como MFI.

4.8.2 Contagens de UFC no sangue, lavado peritoneal e broncoalveolar

O LBA, LP ou sangue foram coletados e 10 µL de amostras foram semeadas em placas de ágar Muller-Hinton (Difco Laboratories, Waltham, MA, EUA) e incubadas por 24 horas a 37°C. As amostras do LP ou BAL foram diluídas de forma seriada até 10⁶. Os resultados foram expressos como UFC por mL considerando a contagem das UFC e o fator de diluição das amostras.

4.8.3 Determinação dos níveis TNF e IL-17

Os níveis de TNF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e IL-17 (XpressBio Life Sciences Products, Frederick, MD, EUA) no plasma, LP ou BAL foram determinados por kits de ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como picograma (pg) por mL.

4.8.4 Análise de marcadores bioquímicos de lesão tecidual

As atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL) e os níveis de bilirrubina total foram determinados em amostras de plasma por *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica, Brasil). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados para atividade

de AST e ALT foram expressos em unidade (U) por mL e da FAL em U por litro (L). Já os níveis de bilirrubina total foram expressos em mg por decilitro (dL).

4.9 Modelo de inflamação pulmonar aguda induzida pelo betacoronavírus murino MHV-3

Antes da infecção, a cepa MHV-3 fornecida e sequenciada (número de acesso GenBank MW620427.1) por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil) foi propagada em meio contendo células L929 (ATCC CCL-1), conforme descrito anteriormente (ANDRADE et al., 2021). Camundongos (6-7 semanas de idade) foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) IP e inoculados por via intranasal com 30 μ L de solução estéril de NaCl 0,9% (*mock*), contendo ou não o MHV-3 (3×10^3 PFUs, do inglês *Plaque-Forming Units*). Em seguida, os camundongos foram tratados ou não com fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, PO) diluído em CMC 5% (v/v) iniciando 24 horas após a inoculação (12/12 h). No terceiro dia pós-inoculação, que corresponde ao pico da infecção (Andrade et al., 2021), todos os animais foram eutanasiados para coleta de pulmões para posterior análise. Os pulmões foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido ou fixados com solução de formalina tamponada neutra 10% (v/v) para análise histopatológica.

4.9.1 Análise indireta da migração de neutrófilos

Os tecidos de pulmão provenientes do modelo de inflamação pulmonar aguda induzida pela infecção por MHV-3 foram descongelados, pesados e homogeneizados em PBS gelado (100 mg de tecido/1 mL de tampão). As amostras foram então centrifugadas (10.000 x g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica de hemácias utilizando 1 mL de NaCl 0,2% por 30 segundos e, em seguida, adicionando 1,0 mL de NaCl 1,6%. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi homogeneizado em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 100 mg de tecido/1 mL de tampão) e submetido a sessões de congelamento-descongelamento por três vezes usando nitrogênio líquido

seguido de centrifugação. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio enzimático com tampão HTAB (diluição 1:3) a temperatura ambiente e 25 μ L foi utilizado de cada amostra adicionados a 25 μ L do substrato para a MPO e incubados por 5 minutos a 37°C em duplicatas em uma placa de 96 poços. Então, 25 μ L de H₂O₂ 0,002% foram adicionados a cada poço e incubado por 5 min a 37°C. A reação foi parada adicionando 25 μ L de H₂SO₄ 1 M e a leitura realizada a 450 nm. Os resultados foram expressos como média da absorbância (mOD) por miligrama (mg) de tecido.

4.9.2 Análise da carga viral de MHV-3 em pulmões

Para determinação da carga viral 30 mg de tecido pulmonar de cada camundongo foram pesados e homogeneizados em 300 μ L de meio DMEM suplementado com 7% de soro e centrifugados (2000 x g por 5 min a 4°C). Os sobrenadantes foram coletados e adicionados a uma placa de 24 poços contendo células L929 (1,5 x 10⁵ por poço), que foram semeadas e cultivadas até a confluência. As camadas de células foram incubadas com 0,1 mL dos sobrenadantes diluídos de forma seriada durante 1 hora e sobrepostas com 1,6% de metilcelulose mais meio DMEM com 2% de soro. As placas foram incubadas por 2 dias a 37°C, fixadas em formaldeído 10% e coradas com cristal violeta a 1% em água por 30 min para contagem das PFUs. O título viral foi expresso como Log PFUs por grama (g) de tecido.

4.9.3 Análise histopatológica

Tecidos pulmonares fixados em formalina e embebidos em parafina de camundongos foram seccionados (5 μ m de espessura), tratados e corados com hematoxilina e eosina (H&E). A aquisição e análise das imagens foram realizadas usando um microscópio Olympus BX (Olympus). A avaliação histopatológica foi realizada por um patologista de forma cega, utilizando um sistema de pontuação que abrange inflamação das vias aéreas (até 4 pontos), inflamação vascular (até 4 pontos), inflamação do parênquima (até 5 pontos) e infiltração geral de neutrófilos (até 5 pontos), conforme descrito anteriormente (ANDRADE et al., 2021). Os resultados foram expressos como

escore histopatológico obtido a partir da média das pontuações obtidos em cada parâmetro.

4.10 Análise estatística

Os dados foram obtidos de três a sete experimentos independentes usando pelo menos $n = 5$ para amostras humanas. Foi utilizado 5 camundongos por grupo experimental, exceto para análises de sobrevivência em que 12 a 20 camundongos por grupo foram utilizados. Os valores médios ou medianos para os diferentes grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-testes de Dunnett e/ou Tukey. As contagens bacterianas foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste t não pareado usando um teste paramétrico com correção de Welch. As curvas de sobrevida foram traçadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método log-rank e teste de Gehan-Wilcoxon. Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism versão 8.00 (GraphPad Software, EUA). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 LPS induz a atividade de neuraminidases endógenas resultando na remoção de ácidos siálicos e a ativação de neutrófilos humanos

O primeiro passo do presente estudo foi avaliar os níveis de ácidos siálicos em neutrófilos após sua ativação. A resposta de neutrófilos *in vivo* envolve uma rede complexa de interação com outras células e ação de mediadores solúveis. Portanto, utilizar o sangue total seguido da lise de hemácias como um sistema *in vitro* para estudar a ativação celular proporciona um ambiente fisiológico mais próximo quando comparado a experimentos com células isoladas (DUFFY et al., 2014; MESSERER et al., 2020). A incubação do LPS com o sangue de doadores saudáveis reduziu significativamente a ligação da lectina MAL-II aos ácidos siálicos $\alpha 2-3$ na membrana plasmática de neutrófilos quando comparado a células não estimuladas ou sem tratamento (ST) (**Figura 8**).

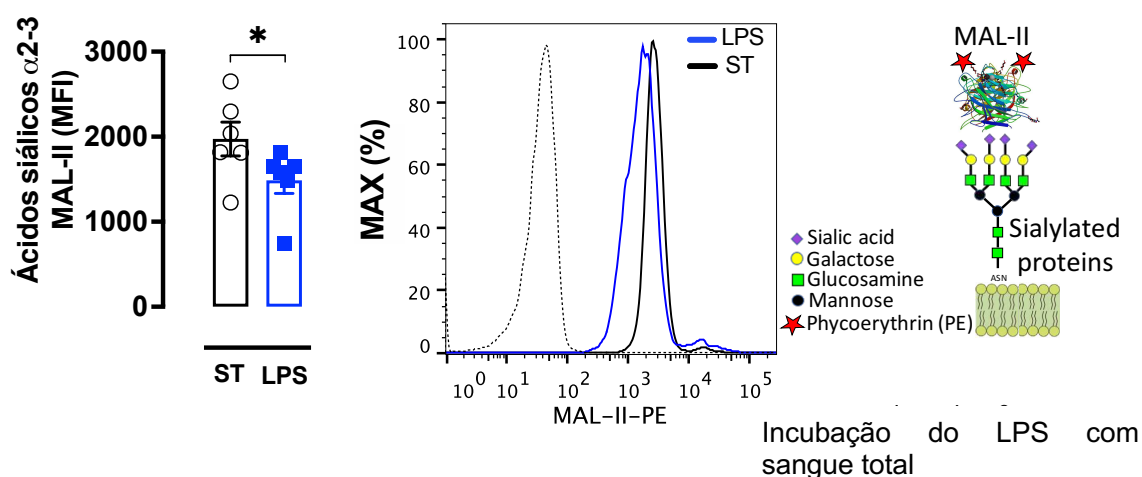


Figura 8. LPS incubado no sangue total induz a clivagem de ácidos siálicos na superfície de neutrófilos humanos. Sangue total contendo 1×10^6 leucócitos de doadores saudáveis foi incubado ou não com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 90 min e os níveis de ácidos siálicos $\alpha 2,3$ foram reconhecidos pela lectina MAL-II biotinizada seguida da incubação com estreptavidina fluorescente ($n = 6$). O MFI foi analisado em células CD66b^+ . Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos ao Teste t de Student ($*P < 0,05$) comparando o grupo sem tratamento (ST) ao grupo estimulado pelo LPS. MAL-II = lectina *Maackia amurensis* II; LPS = lipopolissacarídeo; Linha pontilhada = células sem marcação; Siglec = do inglês *Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Para testar essa hipótese, foi realizada um ensaio de cinética enzimática medindo a atividade de NEU em leucócitos humanos utilizando o reagente 4-MU-NANA, um substrato que se torna fluorescente após a sua clivagem pela NEU (AMITH et al., 2009). Para esse experimento foi utilizado leucócitos totais ao invés do sangue total, pois fatores plasmáticos podem interferir na atividade da enzima. Além disso, a retirada de ácidos siálicos de hemácias pode favorecer a agregação e alteração das respostas celulares (KEMP, 1968). Nessa avaliação também foi realizada uma triagem de dois inibidores de NEU viral, o Oseltamivir e Zanamivir, ambos disponíveis na clínica para o tratamento da gripe, e testados aqui para inibir as enzimas do hospedeiro (**Figura 9A-B; 9F-G**). Além disso, uma NEU purificada de bactéria (CpNEU) foi utilizada como controle positivo da atividade da enzima.

Os resultados demonstraram um aumento progressivo da fluorescência em função do tempo relacionada a atividade de CpNEU (**Figura 9A-B**). A incubação da enzima CpNEU com leucócitos totais também levou a uma diminuição nos conteúdos de ácidos siálicos α 2-3 (**Figura 9C**) e α 2-6 (**Figura 9D**), bem como a um aumento da exposição dos resíduos de galactose (**Figura 9E**) presentes na superfície de neutrófilos. A atividade de CpNEU e os seus efeitos sobre os ácidos siálicos de membrana foram drasticamente diminuídos na presença dos inibidores de NEU (**Figura 9A-E**), indicando a capacidade dos fármacos em também inibir a enzima bacteriana.

Após isso foi verificado que o estímulo com o LPS no sangue total é capaz de induzir a atividade endógena de NEU em leucócitos humanos (**Figura 9F-G**), e que essa atividade leva a clivagem de ácidos siálicos (**Figura 9H-J**) e a um estado de ativação celular, avaliado a partir da expressão dos marcadores de membrana CD62L (**Figura 9K**) e CD66b (**Figura 9L**). Esses eventos também foram inibidos de forma significativa por ambos Oseltamivir e Zanamivir, indicando fortemente que os efeitos do LPS em neutrófilos se dão, pelo menos em parte, devido a indução da atividade de NEU.

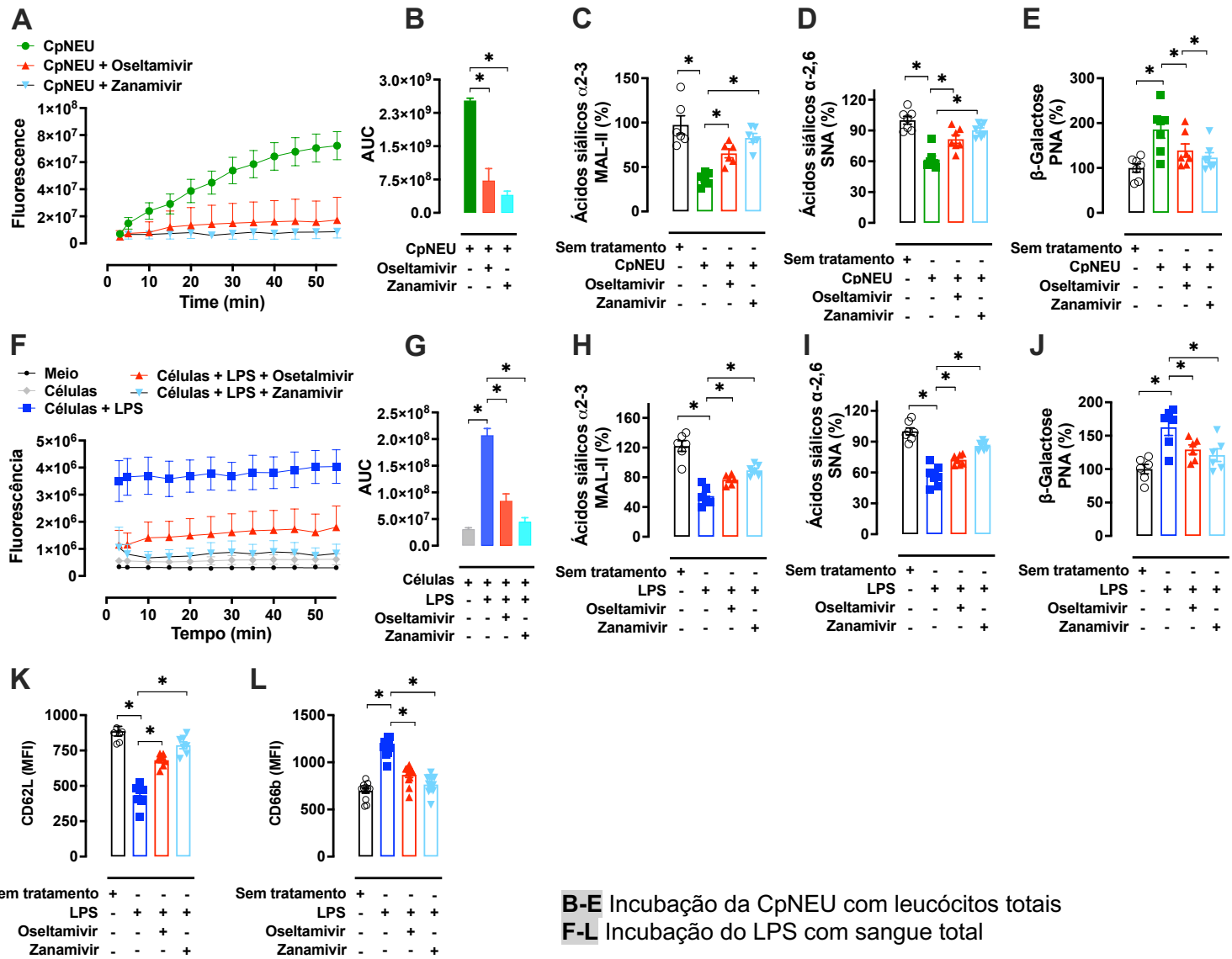


Figura 9. LPS estimula a atividade NEU em leucócitos humanos, induz a clivagem de ácidos siálicos e ativação de neutrófilos.

CpNEU (0,012 UI) em HBSS foi incubada em uma placa escura de 96 poços de fundo plano sob o gelo na presença ou ausência do oseltamivir (100 μ M) ou Zanamivir (30 μ M). Em seguida, o substrato 4-MU-NANA (0,025 mM) foi adicionado a placa e o produto fluorescente resultante lido a 37°C por 55 min (**A**). Os valores da área sob a curva (AUC) são mostrados em **B**. Leucócitos totais (1×10^6 ; n= 6) de doadores saudáveis foram estimulados ou não com CpNEU (0,012 UI, 60 min, 37°C, 5% CO₂) na presença ou ausência de Oseltamivir (100 μ M) ou Zanamivir (30 μ M). Ácidos siálicos α 2-3 (**C**), α 2-6 (**D**) e resíduos de β -galactose (**E**) foram detectados usando por citometria de fluxo. Leucócitos totais ($0,5 \times 10^6$; n = 5) em HBSS foram adicionados em uma placa sob o gelo e o substrato 4-MU-NANA (0,025 mM) foi adicionado seguido pela adição ou não do LPS (1 μ g/mL, 60 min, 37°C, 5% CO₂) na presença ou ausência de Oseltamivir (100 μ M) ou Zanamivir (30 μ M) (**F**). Os valores de AUC são mostrados em **G**. A propriedade do LPS em estimular a neuraminidase endógena incubada (90 min, 37°C, 5% CO₂) no sangue total (1×10^6 leucócitos; n = 6). Ácidos siálicos α 2-3 (**H**), α 2-6 (**I**) e resíduos de β -galactose (**J**), e os marcadores de ativação CD62L (**K**) e CD66b (**L**) foram avaliados por citometria de fluxo. O MFI foi analisado em células CD66b⁺. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (*P < 0,05). LPS = lipopolissacarídeo; 4-MU-NANA: ácido 4-metilumbeliferil N-acetil-D-neuramínico; MAL-II = lectina da *Maackia amurensis*; SNA = lectina da *Sambucus nigra*; PNA = do inglês *peanut agglutinin*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Uma vez verificado que leucócitos totais na presença do LPS apresentam um aumento da atividade de NEU com efeitos subsequentes na ativação celular, o próximo passo do estudo foi verificar a influência da enzima agora em neutrófilos e monócitos isolados e ultrapuros. Essa abordagem também serviu para definir a influência de outros tipos celulares ou de fatores plasmáticos para ativação da enzima em neutrófilos. Para os experimentos com neutrófilos purificados ainda foram realizadas curvas concentração-efeito para o Oseltamivir (10, 30, 100 e 300 μ M) e Zanamivir (1, 10, 30 e 100 μ M) na perspectiva de validar as concentrações utilizadas nos experimentos com sangue total encontradas anteriormente no laboratório.

Tanto em neutrófilos (**Figura 10A-F**) quanto monócitos (**Figura 10G-L**) a incubação com o LPS levou ao aumento da atividade endógena de NEU, remoção de ácidos siálicos e ativação celular, efeito esse inibido pelo Oseltamivir e Zanamivir, no caso dos neutrófilos de forma dependente de concentração. Dessa forma, as concentrações de 100 μ M para o Oseltamivir e 30 μ M para o Zanamivir foram confirmadas para os experimentos posteriores.

Juntos esses achados sugerem que no sangue total a presença de tipos celulares distintos, a exemplo dos monócitos, além dos fatores plasmáticos podem contribuir de forma global para a indução da atividade endógena de NEU em neutrófilos humanos. Por

outro lado, de forma isolada e independente ambos neutrófilos e monócitos também são capazes de apresentar atividade sialidase após a incubação com o LPS.

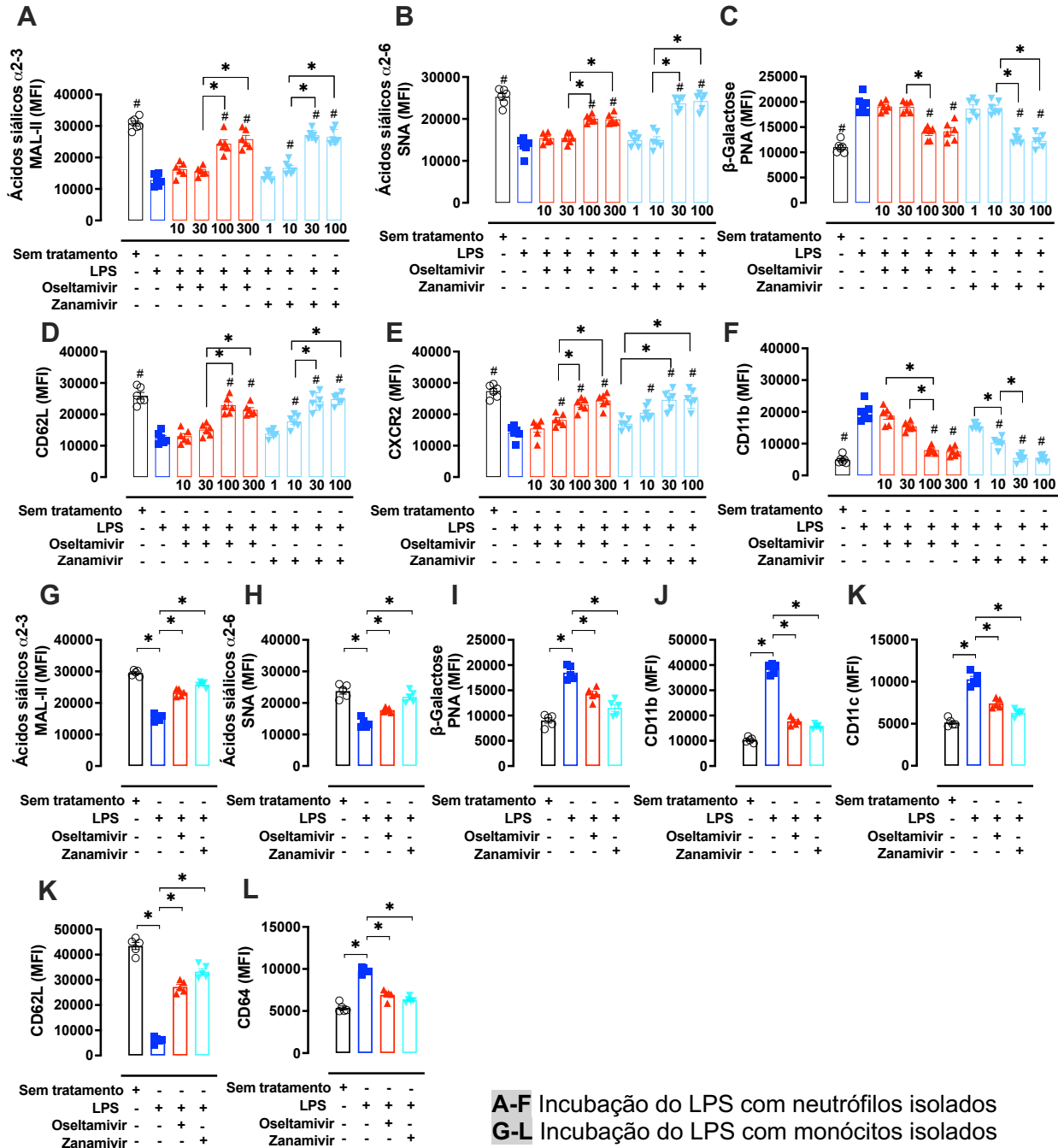


Figura 10. LPS estimula a atividade NEU em neutrófilos e monócitos isolados induzindo a clivagem de ácidos siálicos e a ativação celular. Neutrófilos ou monócitos ultrapuros (1×10^6 ; $n = 5-6$) foram incubados ou não com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$, 90 min, 37°C , 5% CO_2). Para o estudo com neutrófilos isolados o estímulo aconteceu na presença ou ausência de diferentes concentrações de Oseltamivir (10-100 μM) ou Zanamivir (1-100 μM), enquanto com monócitos apenas uma

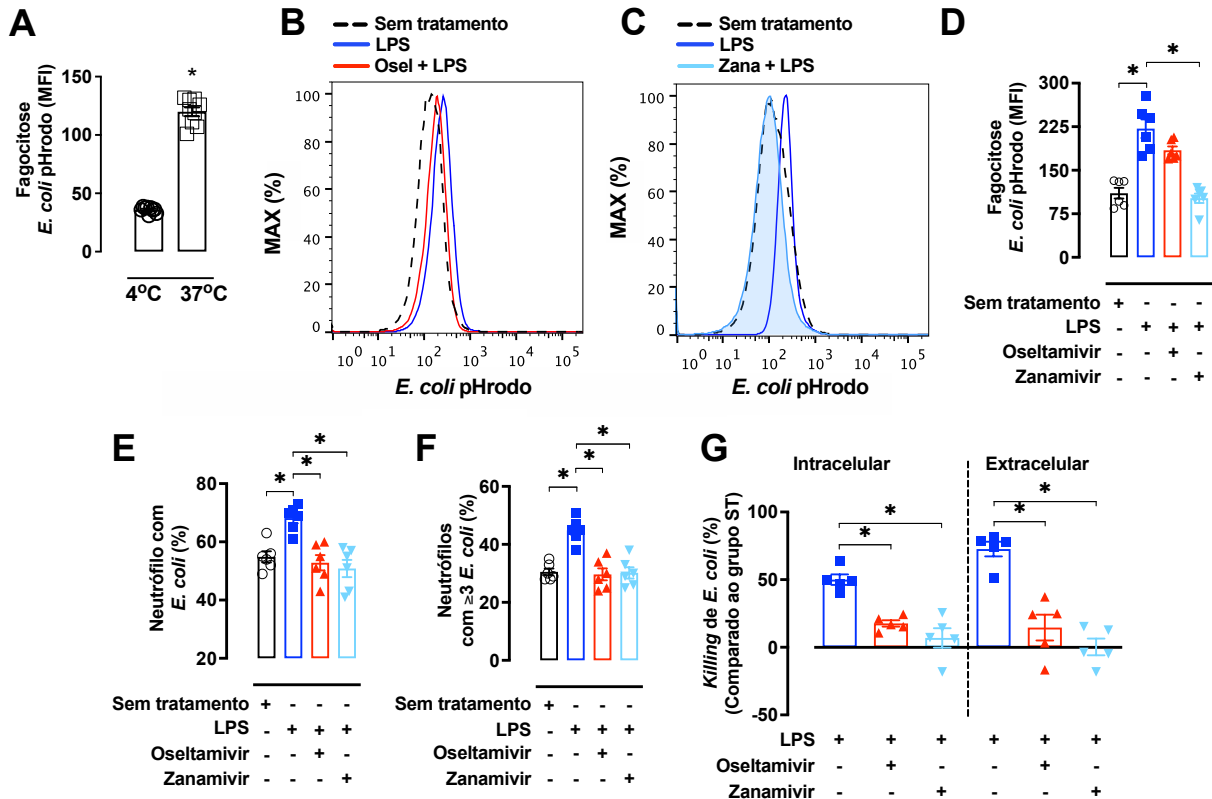
concentração foi avaliada (100 e 30 μ M, respetivamente). Ácidos siálicos α 2-3 (**A;G**), α 2-6 (**B;H**) e resíduos de β -galactose (**C;I**) foram avaliados em neutrófilos e monócitos isolados. Os marcadores de ativação CD62L (**D**), CXCR2 (**E**), CD11b (**F**) em neutrófilos ou CD11b (**J**), CD11c (**K**), CD62L (**L**) e CD64 (**M**) em monócitos foram avaliados por citometria de fluxo. O MFI foi analisado em células CD66b⁺. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (*P < 0,05 comparação entre grupos; #P < 0,05 comparação com o grupo LPS). LPS = lipopolissacarídeo; MAL-II = lectina da *Maackia amurensis*; SNA = lectina da *Sambucus nigra*; PNA = do inglês *peanut agglutinin*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

5.2 A atividade de NEU induzida pelo LPS estimula a fagocitose, *killing* de *E. coli*, produção de EROs e liberação de NETs em neutrófilos humanos

Uma vez verificado que a atividade de NEU induzida pelo LPS é responsável por uma alteração do fenótipo de neutrófilos humanos, em seguida, foi investigado se esses eventos também levam a alterações funcionais, a exemplo durante a fagocitose e os mecanismos responsáveis pelo *killing* bacteriano.

Primeiramente foi investigado se a NEU do hospedeiro regula a fagocitose e o *killing* de *E. coli* por neutrófilos humanos. Para isso, o sangue total de doadores saudáveis foi pré-incubado com LPS (90 min), e então, biopartículas de *E. coli* sensíveis ao pH foram incubadas juntamente com às células por 60 min. Uma vez fagocitadas essas biopartículas geram fluorescência devido as alterações do pH no interior dos fagolisossomos, que pode ser então analisada por citometria de fluxo. Um aumento significativo no MFI de células não estimuladas e incubadas com as biopartículas foi observado a 37°C em comparação com células a 4°C (**Figura 11A**). O pré-tratamento de células com LPS exacerbou tanto a quantidade de biopartículas de *E. coli* fagocitadas (**Figura 11B-D**) quanto o número de células contendo bactérias ou o número de bactérias por célula (**Figura 11B-D**). Do mesmo modo, o LPS também aumentou a expressão de membrana de receptores fagocitários, como o CD11b em neutrófilos (**Figura 10F**) e CD11b/CD11c em monócitos isolados (**Figura 10J-K**). Todos esses efeitos foram reduzidos quando os inibidores de NEU Oseltamivir e Zanamivir foram adicionados às culturas celulares (**Figura 11B-F**). Além disso, o tratamento com LPS também aumenta o *killing* intra e extracelular de *E. coli*, ao passo que, o pré-tratamento com Oseltamivir ou

Zanamivir leva esse efeito para próximo dos níveis basais quando comparado ao grupo sem tratamento (Figura 11G).

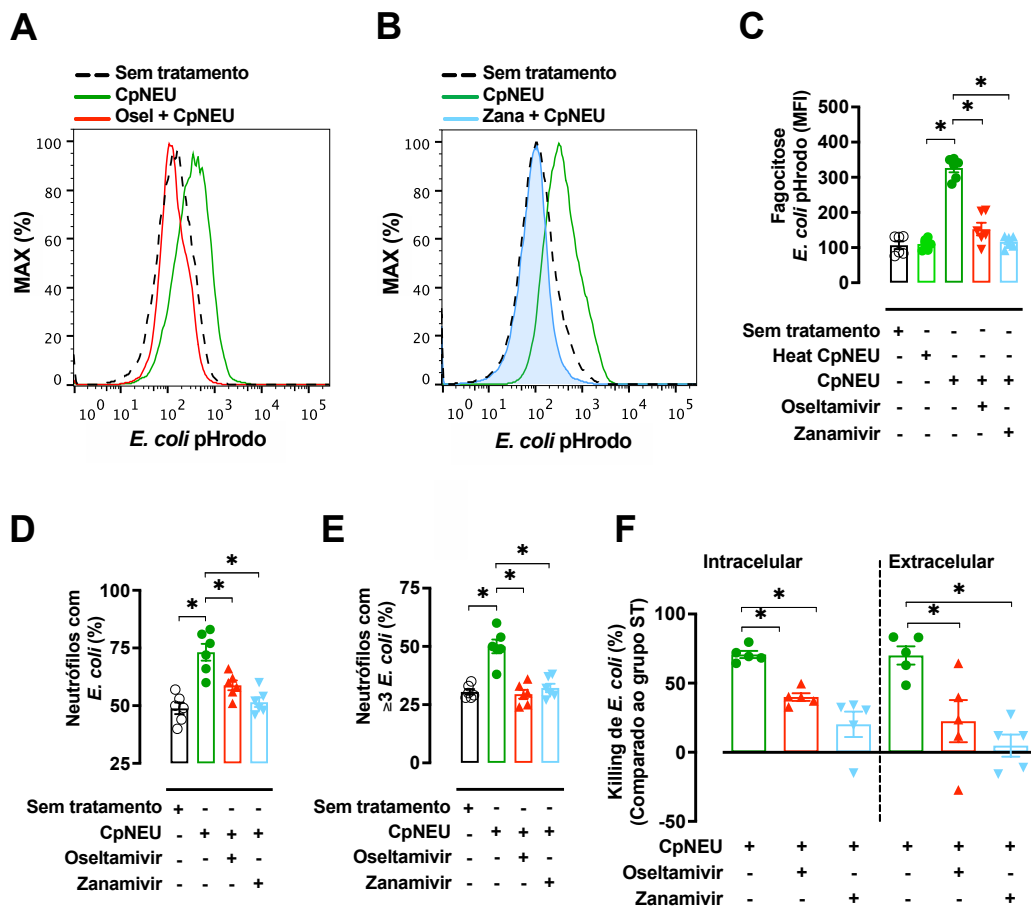


A-G Incubação do LPS com sangue total

Figura 11. LPS aumenta a fagocitose e o killing de *E. coli* por neutrófilos de forma dependente de NEU. Sangue total (1×10^6 leucócitos; $n = 6$) foram incubados ou não com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$, 90 min, 37°C , 5% CO_2) na presença ou ausência de Oseltamivir ($100 \mu\text{M}$) ou Zanamivir ($30 \mu\text{M}$). *E. coli* pHrodo BioParticles® ($100 \mu\text{g/mL}$) foram incubadas com as células por 60 min a 37°C para avaliar a fagocitose por citometria de fluxo. Grupos de células não estimuladas incubados com as biopartículas a 4°C ou 37°C foram utilizados como controles (A). Histogramas representativos foram usados para mostrar o efeito de Oseltamivir (B) e Zanamivir (C) ou por meio dos valores de MFI (D) em células viáveis e CD66b^+ . *E. coli* viáveis foram utilizadas para avaliar a fagocitose por microscopia de luz ou para investigar o killing bacteriano por neutrófilos ou leucócitos estimulados ou não por LPS, respectivamente, na presença ou ausência dos inibidores de NEU. As células foram estimuladas como descrito acima e 1×10^6 leucócitos foram incubados a 37°C com *E. coli* (1×10^6 UFC) por 90 min para fagocitose ($n = 6$) ou por 180 min para o ensaio de morte ($n = 5$). A porcentagem de células com bactérias ingeridas (E) e o número de partículas bacterianas por célula ≥ 3 partículas por célula foram avaliadas (F). O killing de *E. coli* foi estudado semeando $10 \mu\text{L}$ de sobrenadante (killing extracelular) ou do conteúdo intracelular/aderido à membrana em ágar BHI para contagem das UFC. A porcentagem de killing foi expressa em função do grupo de células sem tratamento (ST) (G). Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de

Dunnett e Tukey (* $P < 0,05$). LPS = lipopolissacarídeo. UFC = unidades formadoras de colônias; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Experimentos conduzidos com a CpNEU também foram utilizados como um controle positivo e validação dos resultados obtidos com NEU endógena induzida pelo LPS. Semelhante ao LPS, a CpNEU ao clivar ácidos siálicos de membrana estimulou a fagocitose (**Figura 12A-E**) e *killing* de *E. coli* (**Figura 12F**), efeitos esses bloqueados na presença dos inibidores de NEU. Esses resultados sugerem que a NEU endógena de neutrófilos contribui para a regulação positiva da fagocitose e do *killing* bacteriano em resposta ao LPS e nos mecanismos de contenção contra infecções.



A-G Incubação de CpNEU com leucócitos totais

Figura 12. CpNEU tem efeitos semelhantes ao LPS e aumenta a fagocitose e o *killing* de *E. coli* por neutrófilos. Leucócitos totais (1×10^6 ; $n = 6$) foram incubados ou não com CpNEU (0,012 UI, 60 min, 37°C , 5% CO_2) na presença ou ausência de Osetamivir (100 μM) ou Zanamivir (30 μM). *E. coli* pHrodo BioParticles® (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubadas com as células por 60 min a 37°C para avaliar a fagocitose por citometria de fluxo. Grupos de células não estimuladas

incubados com as biopartículas a 4°C foram utilizados como controles (A). Histogramas representativos foram usados para mostrar o efeito de Oseltamivir (B) e Zanamivir (C) ou por meio dos valores de MFI (D) em células viáveis e CD66b⁺. *E. coli* viáveis foram utilizadas para avaliar a fagocitose por microscopia de luz ou para investigar o *killing* bacteriano por neutrófilos ou leucócitos estimulados ou não por CpNEU, respectivamente, na presença ou ausência dos inibidores de NEU. As células foram estimuladas como descrito acima e 1 x 10⁶ leucócitos foram incubados a 37°C com *E. coli* (1 x 10⁶ UFC) por 90 min para fagocitose (n= 6) ou por 180 min para o ensaio de morte (n= 5). A porcentagem de células com bactérias ingeridas (E) e o número de partículas bacterianas por célula ≥3 partículas por célula foram avaliadas (F). O *killing* de *E. coli* foi estudado semeando 10 µL de sobrenadante (*killing* extracelular) ou do conteúdo intracelular/aderido à membrana em ágar BHI para contagem das UFC. A porcentagem de *killing* foi expressa em função do grupo de células sem tratamento (ST) (G). Os dados estão representados como média ± SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (*P < 0,05). CpNEU = neuramidase purificada de *Clostridium perfringens*. UFC = unidades formadoras de colônias; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Em seguida, foi investigado se as NEU endógenas também influenciam a produção de EROs e a liberação de NETs desencadeadas pelo LPS. Neutrófilos do sangue total incubados com o LPS e estimulados com PMA produziram maiores quantidades de EROs quando comparados a células não estimuladas (Figura 13A-C). Tanto o Oseltamivir (Figura 13A;C) quanto o Zanamivir (Figura 13B-C) inibem a liberação de EROs em níveis semelhantes aos das células do grupo sem tratamento (Figura 13A-C). Além disso, ambos os inibidores reduzem significativamente a liberação de NETs induzida pelo LPS nos sobrenadantes das culturas com neutrófilos isolados (Figura 13D).

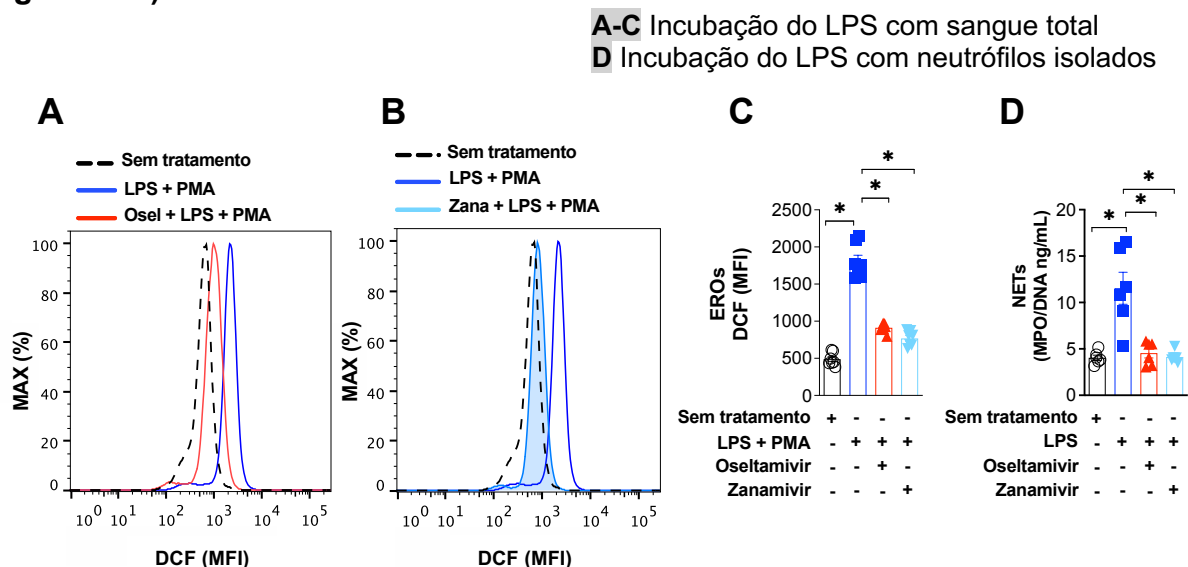


Figura 13. LPS aumenta a produção de EROs e a liberação de NETs por neutrófilos de forma dependente de NEU. Sangue total (1 x 10⁶ leucócitos; n= 7) foram incubados ou não com LPS (1 µg/mL, 90 min, 37°C, 5% CO₂) na presença ou ausência de Oseltamivir (100 µM) ou

Zanamivir (30 μM). Então, leucócitos foram incubados com 5 μM da sonda fluorescente CM-H2DCFDA por 15 min e PMA (10 μM) foi utilizado para estimular a produção de EROs por 10 min **(A-C)** e leitura da molécula fluorescente DCF por citometria de fluxo. O MFI foi analisado em células CD66b⁺. Para avaliação da liberação de NETs, um protocolo semelhante ao descrito anteriormente foi utilizado. Para o estímulo neutrófilos isolados (1×10^6 leucócitos; n= 7) foram pré-incubados por 1h com os inibidores de NEU e estimulados com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 h. A concentração de NETs foi avaliada pelo ensaio MPO-DNA PicoGreen nos sobrenadantes das culturas celulares **(D)**. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (*P < 0,05). CMH2DCFDA = diacetato de 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína diéster acetilo; LPS = lipopolissacarídeo; PMA = acetato miristato de forbol; NETs = armadilhas extracelulares de neutrófilos; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

5.3 A interação NEU1-MMP-9 está envolvida na ativação de neutrófilos humanos induzida por LPS

Para entender os mecanismos de ativação de NEU em neutrófilos, foi investigada a expressão de NEU1, pois este subtipo parece regular as respostas celulares através do engajamento com receptores de membrana em outras células imunes (AMITH et al., 2009).

A partir de experimentos de imunofluorescência e citometria de fluxo foi observado que NEU1 está expressa em baixos níveis na superfície de neutrófilos humanos não estimulados, e sua expressão aumenta na membrana após o estímulo com LPS **(Figura 14A-C)**. Em seguida, foi avaliada a interação de MMP-9 e NEU1, pois a ligação entre essas duas proteínas parece favorecer a sinalização de TLRs em outros tipos celulares (Abdulkhalek et al., 2011). A partir do ensaio Duolink® *proximity ligation essay* (PLA) foi mostrado que o LPS aumentou a interação NEU1/MMP-9 na superfície de neutrófilos em comparação com neutrófilos sem estímulo **(Figura 14D-E)**.

Além disso, utilizando o inibidor seletivo para MMP-9 (MMP-9i) foi mostrado a dependência desta molécula na indução da atividade de NEU **(Figura 14F-G)**. A pré-incubação de neutrófilos isolados com o MMP-9i também bloqueou a remoção de ácidos siálicos de superfície **(Figura 14H-J)** e as alterações fenotípicas induzidas pelo LPS em neutrófilos **(Figura 14K-N)**. Esses achados sugerem que a atividade de MMP-9 com interação física na membrana celular é essencial para os mecanismos de ativação de NEU1 em neutrófilos humanos.

A-N Incubação do LPS com neutrófilos isolados

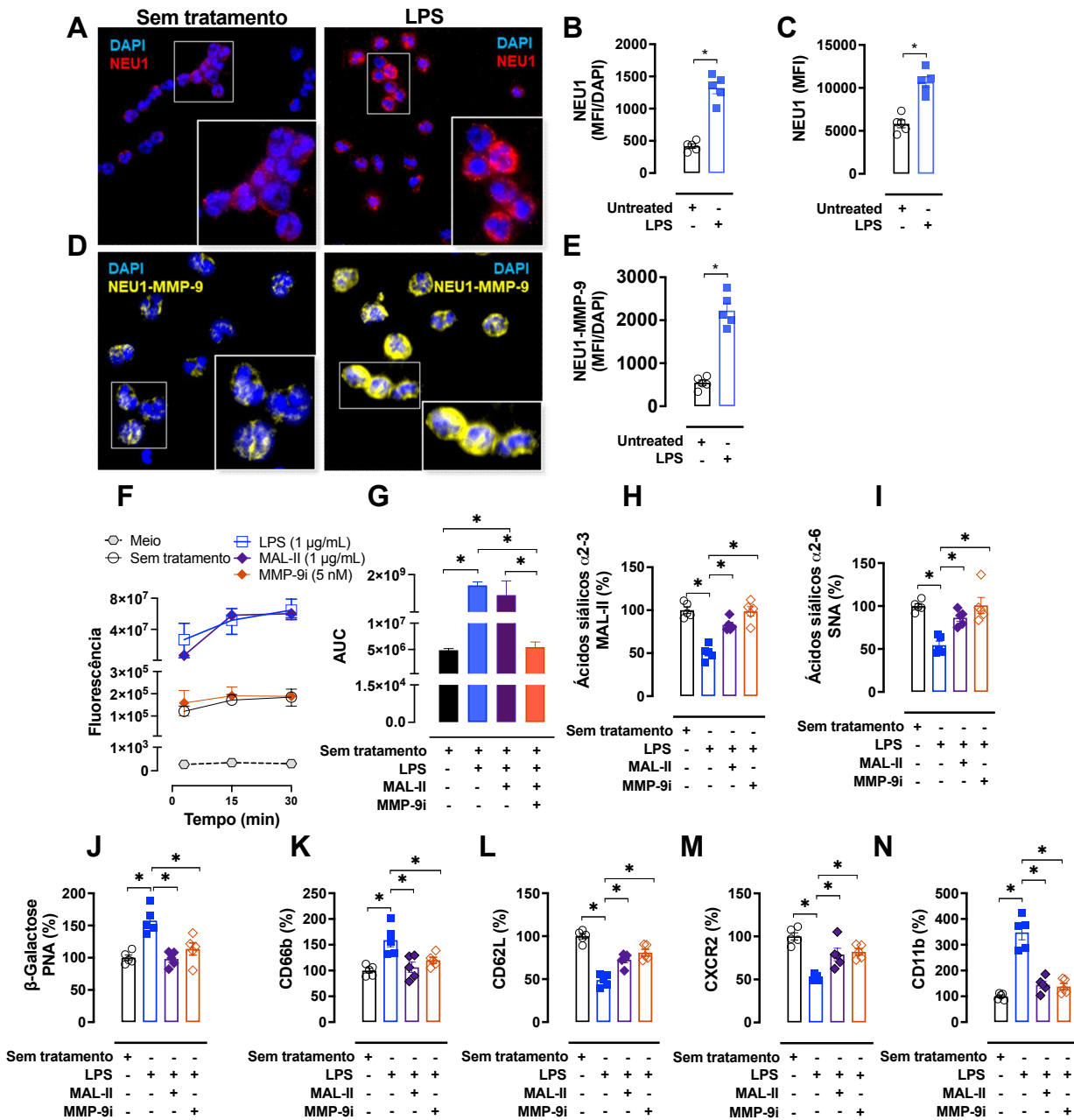


Figure 14. A atividade de NEU1 induzida pelo LPS é dependente de MMP-9 em neutrófilos humanos. Neutrófilos isolados (1×10^6 ; $n = 5$) foram estimulados ou não com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$, 90 min, 37°C , 5% CO_2) e lâminas contendo $0,3 \times 10^6$ células foram confeccionadas para detectar a expressão de NEU1 na membrana de neutrófilos (vermelho) e o DAPI para a detecção de DNA (azul) por imunofluorescência indireta (**A-B**). Uma abordagem semelhante foi realizada mostrando os níveis de NEU1 na membrana de neutrófilos isolados por citometria de fluxo (**C**). A interação de superfície NEU1/MMP-9 (amarelo) foi avaliada usando o ensaio de ligação de proximidade Duolink® PLA (**D-E**). Fotos representativas (ampliação de 100 \times) foram capturadas de pelo menos 3 campos diferentes e analisadas usando o software ImageJ® 1.53J. O MFI foi avaliado em cada campo capturado (cada ponto corresponde à média de um doador diferente) e

normalizado pelo número de células positivas para DAPI (**B e E**). Neutrófilos estimulados por LPS (1×10^6 ; n = 5) na presença ou ausência de MAL-II (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou MMP-9i (5 nM) foram adicionados 30 min antes da incubação com LPS. A atividade da neuraminidase derivada de neutrófilos foi avaliada usando substrato 4-MU-NANA (**F**) como destricto anteriormente. Os valores da área sob a curva (AUC) são mostrados em **G**. Em neutrófilos (1×10^6 ; n = 5) nas condições descritas acima também foram avaliados os níveis de ácidos siálicos α 2-3 (**H**), α 2-6 (**I**) e resíduos de β -galactose bem como os marcadores de ativação celular CD66b (**K**), CD62L (**L**), CXCR2 (**M**) e CD11b (**N**) por citometria de fluxo. A porcentagem (%) em relação ao grupo não estimulado foi analisada em células CD66b⁺. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste T de Student, Dunnett e/ou Tukey (*P < 0,05). LPS = lipopolissacarídeo; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*; SNA = lectina purificada da *Sambucus nigra*; PNA = aglutinina de amendoim; MMP-9 = metaloproteinase 9; 4-MU-NANA = ácido 4-metilumbeliferil N-acetil-a-D-neuramínico. DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol; DNA = ácido desoxirribonucleico; PNA = do inglês *peanut agglutinin*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Experimentos também foram conduzidos utilizando a pré-incubação de neutrófilos isolados com MAL-II como uma ferramenta para prevenir a hidrólise de ácidos siálicos α 2-3 através do impedimento estérico do sítio de clivagem da NEU (AMITH et al., 2010). Os resultados mostraram que apesar da pré-incubação de neutrófilos isolados com MAL-II não inibe a atividade enzimática da NEU estimulada pelo LPS (**Figura 14F-G**), ela evita a remoção de ácidos siálicos de superfície (**Figura 14H-J**) e a ativação de neutrófilos (**Figura 14K-N**).

O efeito do Oseltamivir, Zanamivir, MAL-II ou MMP-9i também foi avaliado na função da NADPH-oxidase em neutrófilos isolados incubados com LPS e estimulados com diferentes agonistas. O LPS embora não ative diretamente a atividade da NADPH-oxidase torna os neutrófilos mais responsivos a outros estímulos (*priming*) (DELEO et al., 1998). Dessa forma, foi utilizado o PMA como um agonista sintético, que ativa a produção de EROs intra e extracelularmente, bem como agonistas que mimetizam eventos infecciosos, como o zimosan opsonizado com IgG (Zo) para investigação da via dependente de receptores Fc γ ou com o fMLP para ativar diretamente receptores metabotrópicos FPR1 e FPR2 (NGUYEN et al., 2017).

Todas as ferramentas avaliadas foram capazes de inibir a produção de EROs em células sensibilizadas com LPS associada a estimulação com o PMA (**Figura 15A-C**) ou Zo (**Figura 15D-F**), mas não em células estimuladas com fMLP (**Figura 15G-I**). Esses dados indicam que o estímulo para produção de EROs mediada por NEU em neutrófilos é seletiva para alguns estímulos. Além disso, esses dados mostram que inibir a atividade

de NEU por Oseltamivir, Zanamivir ou MMP-9i ou bloquear a hidrólise de ácidos siálicos α 2-3 é suficiente para inibir a resposta de neutrófilos humanos induzida por LPS.

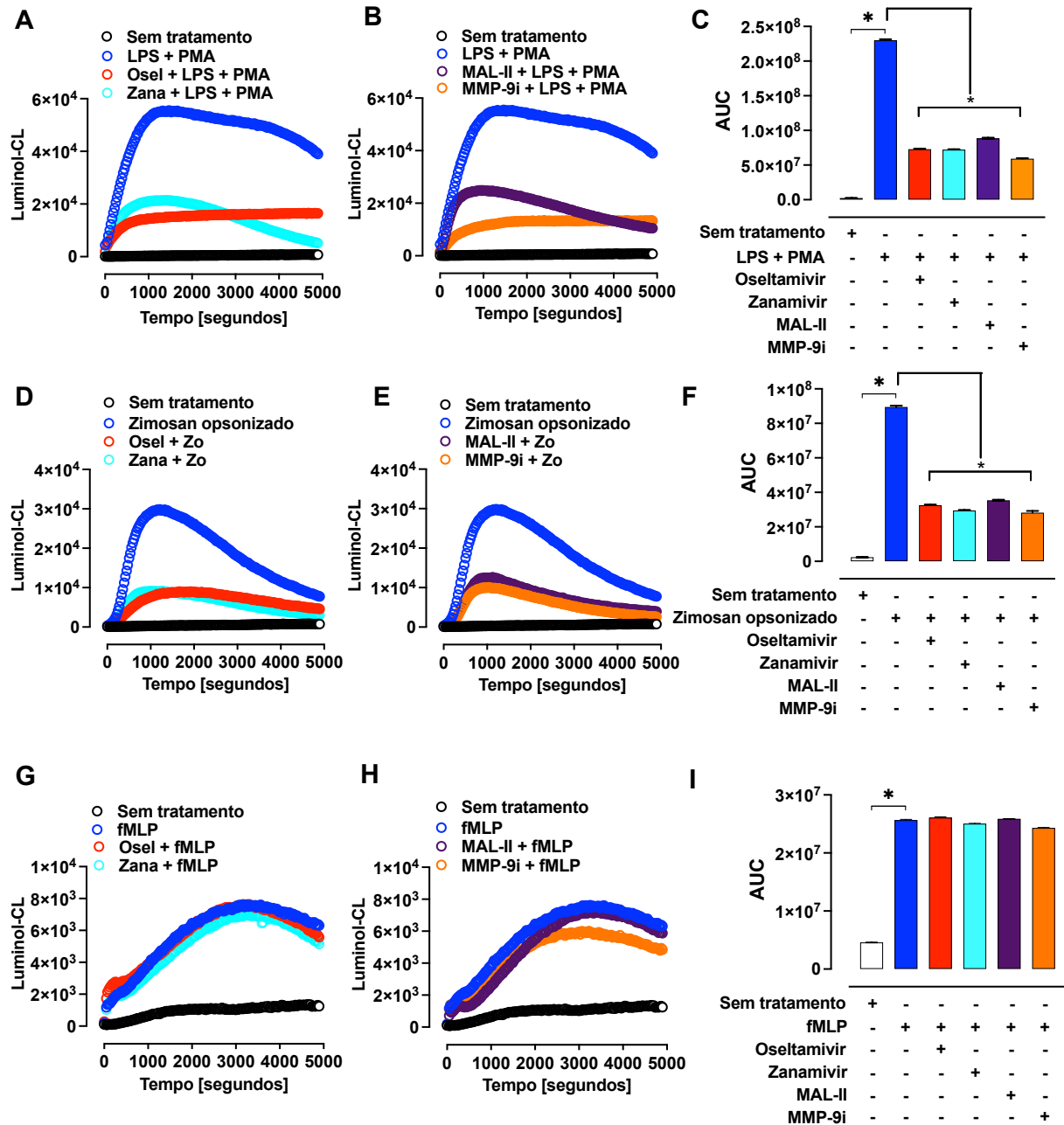


Figura 15. A ativação da NADPH oxidase em neutrófilos humanos é induzida pela atividade NEU via estímulos distintos, um efeito dependente da MMP-9. Neutrófilos isolados (1×10^6 ; $n = 5$) foram estimulados ou não com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$, 90 min, 37°C , 5% CO_2) na presença ou ausência de Oseltamivir ($100 \mu\text{M}$) ou Zanamivir ($30 \mu\text{M}$). Os experimentos também foram conduzidos usando pré-tratamento com MAL-II ($1 \mu\text{g/mL}$) ou o inibidor seletivo de MMP-9 (5 nM) adicionado 30 min antes para incubação LPS. As células foram lavadas e ressuspensas em HBSS contendo luminol e estimuladas ou não com PMA ($0,1 \mu\text{g/mL}$), zimosan opsonizado (Zo;

0,5 µg/mL) ou fMLP (1 µM) para detecção da quimioluminescência (CL). A análise cinética de luminol-CL foi expressa como contagens totais integradas para Oseltamivir e Zanamivir (**A; D; G**) ou seguiu o pré-tratamento com MAL-II ou MMP-9i (**B; E; H**). Os valores da área sob a curva (AUC) são mostrados em **C, F e I**. Os dados estão representados como média ± SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste Dunnett e Tukey (*P < 0,05). LPS = lipopolissacarídeo; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*; MMP-9 = metaloproteinase 9; PMA = acetato miristato de forbol; fMLP = N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina.

5.4 A inibição da NEU endógena melhora a taxa de sobrevivência de camundongos em diferentes modelos experimentais de sepse

Até aqui foi demonstrado que o LPS estimula a atividade endógena de NEU em neutrófilos humanos levando a remoção de ácidos siálicos, ativação celular e exacerbação de suas funções. As respostas exacerbadas de neutrófilos com aumento da produção de EROs, liberação de NETs e da degranulação, já foram associadas a lesão tecidual e disfunção orgânica evidenciadas durante a sepse (ALVES-FILHO et al., 2010; SPILLER et al., 2010, 2012). Dessa forma, o próximo passo desse estudo teve como alvo avaliar a importância da ativação de NEU na inflamação sistêmica agora induzida *in vivo* utilizando modelos animais.

Primeiramente foi induzida a sepse a partir da administração intraperitoneal (IP) da bactéria Gram-negativa *E. coli* (ATCC 25922), que não possui o gene *nanA* que codifica a expressão de NEU em seu genoma (VIMR; TROY, 1985), garantindo que toda atividade de NEU é proveniente do hospedeiro. Foi administrado por via oral (PO) aos animais 10 mg/kg de Oseltamivir, que corresponde a dose equivalente usada em humanos (~7,5 mg/kg) (BUTLER et al., 2020). O pré-tratamento com Oseltamivir (2h antes da infecção) mais o pós-tratamento (6h após a infecção, e após 12/12h durante 4 dias) aumentaram a sobrevivência dos animais quando comparado ao grupo não tratado (**Figura 16A**). Além disso, apenas uma dose única de Oseltamivir 2 horas antes da infecção é suficiente para diminuir significativamente o número de neutrófilos no lavado bronco alveolar (LBA) e no tecido pulmonar 4 ou 6 horas após a infecção (**Figura 16B-C**). O pré-tratamento também regulou a migração de neutrófilos para o foco infeccioso a partir da avaliação da sua contagem no lavado peritoneal (LP) (**Figura 16D**). Esses dados

foram associados a um controle da infecção mais eficiente, visualizado a partir da avaliação da carga bacteriana no LP e no sangue (Figura 16E-F).

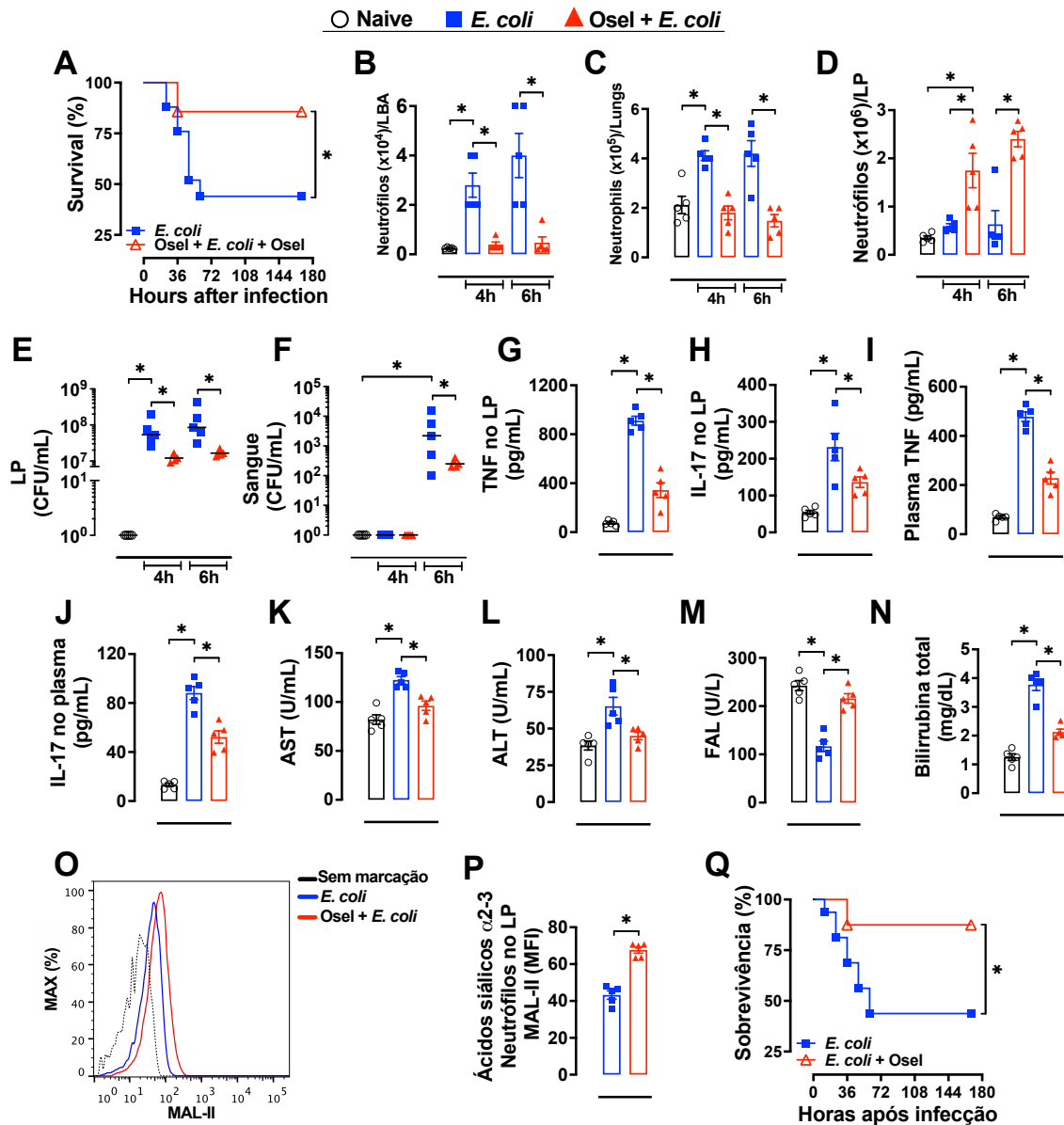


Figura 16. A inibição de NEU do hospedeiro melhora o resultado da sepse induzida por *E. coli*. A sepse foi induzida pela administração intraperitoneal (IP) de 1×10^7 UFC/camundongo de *E. coli* (ATCC 25922). Os camundongos foram pré-tratados aleatoriamente por via oral (PO) (2 horas antes da infecção) e pós-tratados (6 horas após a infecção, 12/12 horas, PO, por 4 dias) com fosfato de oseltamivir (Osel, 10 mg/kg) ou solução salina e suas taxas de sobrevivência foram monitoradas ao longo de 168 horas (A, n = 16). Em outro conjunto de experimentos (n = 5 por grupo), os camundongos foram pré-tratados aleatoriamente (2 horas antes da infecção) com fosfato de oseltamivir (10 mg/kg, PO) e o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA, B) e no tecido pulmonar (C) e no lavado peritoneal (LP) foram contados (D). Os níveis de TNF

(G) e IL-17 (H), e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) no LP (E) ou sangue (F) foram determinados 4 ou 6 h após a infecção. Os níveis plasmáticos de TNF (I), IL-17 (J), AST (K), ALT (L), FAL (M) e bilirrubina total (N) foram avaliados. A quantidade de ácidos siálicos α 2-3 de superfície também foi avaliada em células no PL SSC^{high}/Gr-1^{high} como mostrado pelos histogramas representativos (O) ou MFI (P); linha pontilhada = células sem marcação. Os camundongos também foram aleatoriamente pós-tratados (começando 6 h após a infecção, 12/12 h, PO, por 4 dias) com solução salina ou fosfato de oseltamivir (10 mg/Kg) e suas taxas de sobrevivência foram monitoradas ao longo de 168 h (Q). Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência (n = 16), média ou mediana (somente para dados FACS) \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste T de Student, Dunnett e/ou Tukey (*P < 0,05). AST = alanina aminotransferase; ALT = aspartato aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*.

Além disso, o pré-tratamento com Oseltamivir diminuiu os níveis de TNF e IL-17 no LP e no plasma (**Figura 16G-H**) bem como os marcadores de lesão tecidual AST, ALT, fosfatase alcalina (FAL) e bilirrubina total (**Figura 16A**). Interessantemente, o Oseltamivir bloqueou *in vivo* a redução de ácidos siálicos na superfície de neutrófilos (células SSC^{high}/GR-1^{high}) contidos no LP (**Figura 16O-P**).

Do mesmo modo, a eficácia apenas do pós-tratamento com Oseltamivir (10 mg/kg após 6h da infecção, PO, 12/12h por 4 dias) também foi avaliada na sobrevivência de camundongos desafiados IP com *E. coli*. Nessa avaliação, o Oseltamivir também forneceu uma melhora significativa na taxa de sobrevivência de camundongos sépticos (**Figura 16Q**).

Em seguida, foi empregado o modelo ligação e punção do cécum (CLP do inglês *cecal ligation and puncture*), protocolo esse considerado o padrão ouro na sepse pré-clínica (RITTIRSCH et al., 2009). Nesse modelo de sepse polimicrobiana grave, o pós-tratamento com Oseltamivir 6h após a CLP levou a um pequeno atraso na taxa de mortalidade de camundongos sépticos (**Figura 17A**).

Utilizando o mesmo modelo os animais agora foram tratados com antibióticos, que constitui uma das intervenções clínicas padrão usadas para o tratamento da sepse (RHODES et al., 2017). Em comparação com os animais controle tratados por via oral apenas com solução salina 0,9% mais antibióticos, o uso terapêutico do Oseltamivir associado a antibióticos melhorou de forma significativa as taxas de sobrevivência de camundongos (87,5% *versus* 25% do grupo controle) (**Figura 17B**).

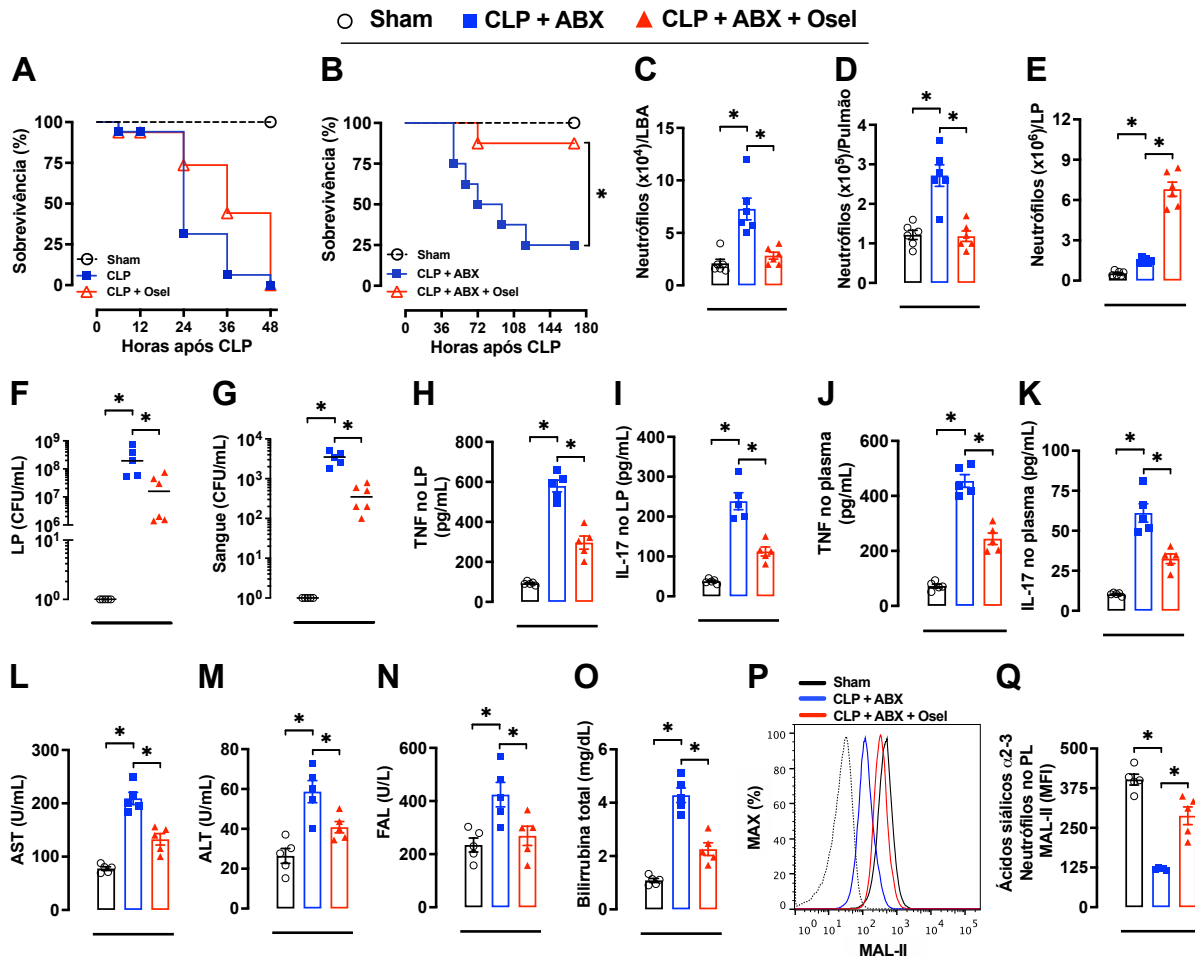


Figura 17. A inibição de NEU do hospedeiro melhora o resultado da sepse induzida por CLP. Um modelo de sepse foi induzido a partir da ligação e punção do cécum (CLP). Camundongos foram tratados aleatoriamente (começando 6 h após a infecção, 12/12 h, PO, por 48 h, n = 16) com solução salina ou fosfato de Osetamivir (10 mg/kg) e suas taxas de sobrevivência foram monitoradas ao longo de 48 h (A). Em outro conjunto de experimentos, camundongos foram tratados aleatoriamente IP (iniciados 6 h após a infecção, 12/12 h) com 100 μ L de metronidazol (15 mg/kg)/ceftriaxona (40 mg/kg) (ABX) mais solução salina 0,9% ou fosfato de Osetamivir (10 mg/kg) PO durante 4 dias e suas taxas de sobrevivência (n = 12) foram monitoradas ao longo de 168 horas (B). Além disso, camundongos foram submetidos a CLP e tratados com ABX + solução salina 0,9% ou ABX + Osetamivir conforme descrito em B e sacrificados 48 horas após a cirurgia para avaliar o número de neutrófilos no LBA (C), tecido pulmonar (D) e LP (E). Os níveis de TNF (H), IL-17 (I) e UFC (F) também foram determinados no LP. As UFC (G) no sangue e os níveis plasmáticos de TNF (J), IL-17 (K), AST (L), ALT (M), FAL (N) e bilirrubina total (O) também foram avaliados 48 horas após a cirurgia. A quantidade de ácidos siálicos $\alpha 2-3$ de superfície foi avaliada em células SSC^{high}/Gr-1^{high} no LP e analisada por FACS, conforme mostrado pelos histogramas representativos (P) e MFI (Q); linha pontilhada = células sem marcação. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência (n=16), média ou mediana (somente para dados FACS) \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste T de Student, Dunnett e/ou Tukey (*P < 0,05). ABX = antibióticos; Sham = sham-operado. AST = alanina aminotransferase; ALT = aspartato aminotransferase; FAL = fosfatase alcalina; UFC = unidades formadoras de colônias.

Em um novo conjunto de experimentos, 48h após a cirurgia, camundongos sépticos pós-tratados com Oseltamivir apresentaram uma redução significativa de neutrófilos no LBA e pulmões (**Figura 17C-D**), regulação da migração de neutrófilos para o foco da infecção (**Figura 17E**) e carga bacteriana reduzida no LP e no sangue (**Figura 17F-G**). Os níveis de TNF e IL-17 no LP e os marcadores plasmáticos de lesão tecidual também foram reduzidos em camundongos tratados com Oseltamivir (**Figura 17H-O**). Além disso, o Oseltamivir também leva a uma maior expressão de ácido siálicos α 2-3 em células SSC^{high}/GR-1^{high} (sugestivo de neutrófilos) no LP (**Figura 17P-Q**).

Como as infecções do trato respiratório, particularmente a pneumonia, são os focos iniciais mais comuns na sepse (CHOU et al., 2020), também foi realizado nesse estudo um modelo de sepse induzido pela administração intratraqueal de *K. pneumoniae* (ATCC 700603) em camundongos com protocolos de tratamento semelhante aos anteriores. O pós-tratamento de camundongos com o fosfato de Oseltamivir (10 mg/kg, melhorou significativamente a sobrevivência de camundongos sépticos desafiados com *K. pneumoniae* (**Figura 18A**).

O aumento da sobrevivência do hospedeiro foi acompanhado por uma diminuição da migração massiva de neutrófilos para o LBA (**Figura 18A**), níveis reduzidos de TNF e IL-17 bem como dos marcadores de lesão tecidual (**Figura 18A**). O oseltamivir também previne a redução de ácidos siálicos α 2-3 em células SSC^{high}/GR-1^{high} contidas no LBA (**Figura 18A**).

Juntos esses resultados sugerem o aumento da atividade de NEU *in vivo* em função da inflamação sistêmica desencadeada pela sepse, e demonstram que a inibição da sua atividade pelo Oseltamivir melhora o desfecho da doença.

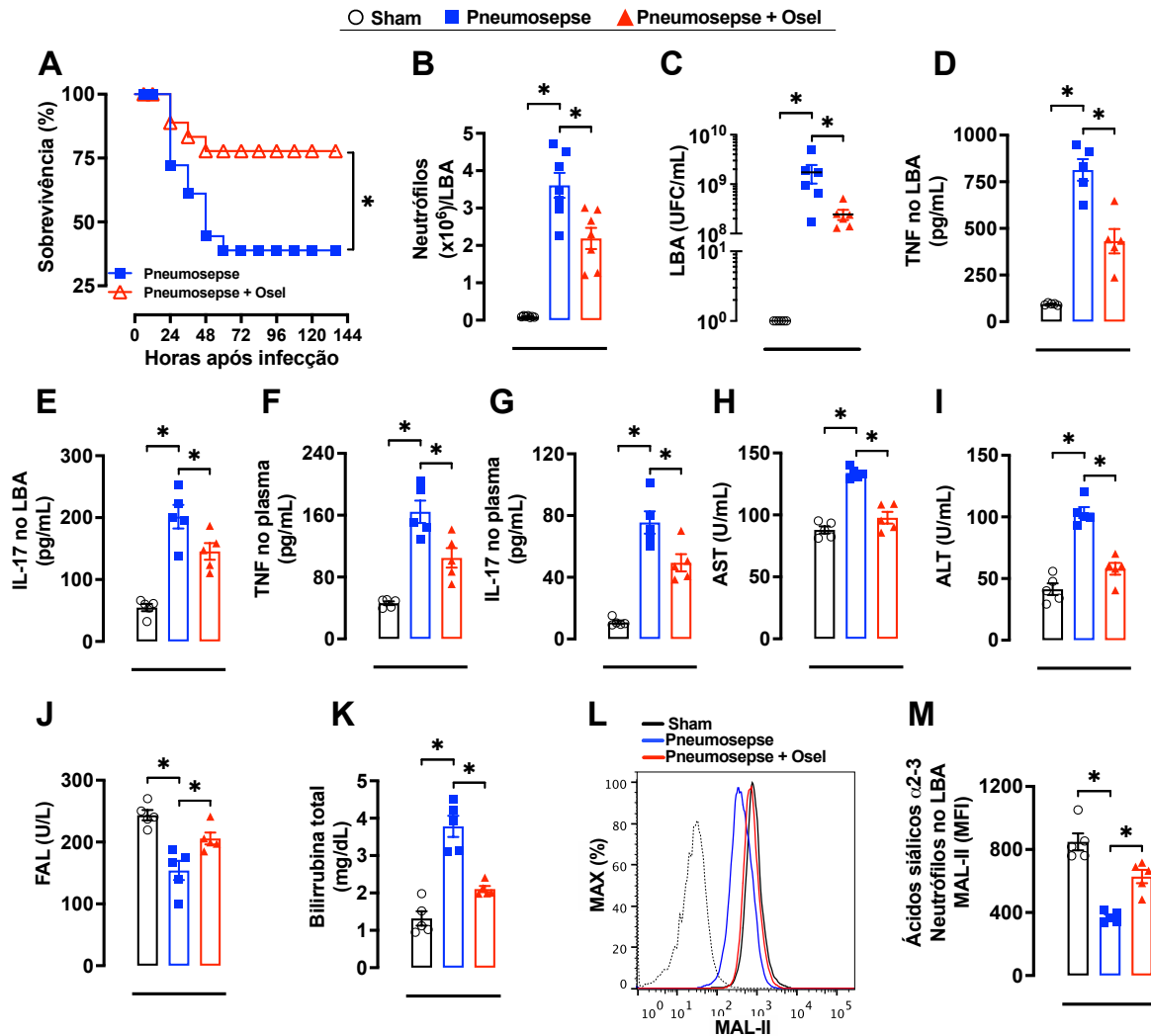


Figura 18. A inibição de NEU melhora o resultado da sepse induzida por *K. pneumoniae*. A sepse foi induzida pela administração intratraqueal (1×10^8 CFU/camundongo) de *K. pneumoniae* (ATCC 700603) e os camundongos foram tratados aleatoriamente (começando 6 h após a infecção, 12/12 h, PO, n = 20) com solução salina 0,9% ou fosfato de Osetamivir (10 mg/kg) e as taxas de sobrevivência foram monitoradas por 144 horas (A). Em um conjunto semelhante de experimentos, camundongos sépticos (n = 5 - 7) foram tratados 6 horas após a infecção com uma dose única de fosfato de Osetamivir (10 mg/kg, PO) e os camundongos foram sacrificados 24 horas após a infecção para determinar o número de neutrófilos (B) e UFCs (C), os níveis de TNF (D) e IL-17 (E) no LBA. Os níveis plasmáticos de TNF (F), IL-17 (G), AST (H), ALT (I), FAL (J) e bilirrubina total (K) também foram avaliados 24 horas após a infecção. A quantidade de ácidos siálicos α -2-3 de superfície foi avaliada em células $SSC^{\text{high}}/Gr-1^{\text{high}}$ presentes no LBA e analisada por FACS, como mostrado pelos histogramas representativos (L) e MFI (M); linha pontilhada = células sem marcação. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência, média ou mediana (somente para dados FACS) \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste T de Student, Dunnett e/ou Tukey (* $P < 0,05$). LBA = lavado broncoalveolar; UFC = unidade formadora de colônia; AST = alanina aminotransferase; ALT = aspartato aminotransferase; FAL = fosfatase alcalina; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*.

5.5 A atividade de NEU está envolvida na desregulação de neutrófilos de pacientes com COVID-19

Semelhante a sepse bacteriana, os neutrófilos contribuem para resposta inflamatória exacerbada durante a infecção grave por SARS-CoV-2 (KURI-CERVANTES et al., 2020; VERAS et al., 2020; WILK et al., 2021). Estudos empregando sequenciamento de RNA *single cell* (scRNA-seq) de amostras do trato respiratório superior e inferior de pacientes com COVID-19 indicaram um aumento significativo de neutrófilos ligados a um programa transcricional inflamatório associado a danos nos tecidos em células epiteliais e imunes (CHUA et al., 2020). A partir do presente estudo foi realizada uma reanálise desses dados públicos de scRNA-seq (**Figuras 19A-C**).

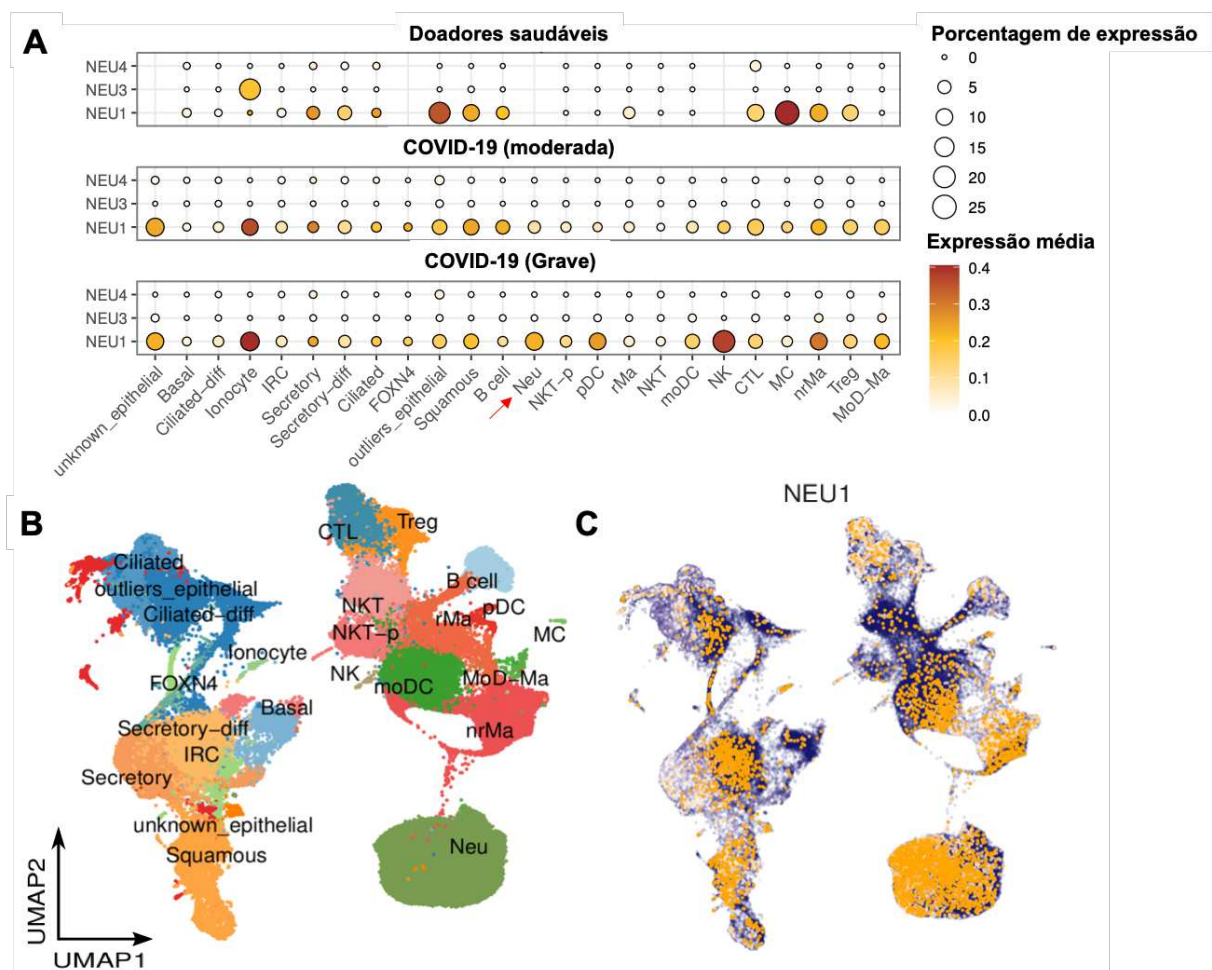


Figura 19. Expressão de NEU1 em neutrófilos e outras células infiltradas no trato respiratório superior de pacientes com COVID-19. Expressão gênica de NEU1, NEU3 e NEU4

em diversos tipos celulares (infiltradas ou residentes) provenientes do trato respiratório superior de doadores saudáveis e pacientes com COVID-19 moderados ou graves. O tamanho do círculo é proporcional à porcentagem de células que expressam os genes relatados em um nível de expressão normalizado superior a um. Neutrófilos infiltrados estão destacados com a seta vermelha (→) (A). Análise UMAP codificada por cores mostrando diferentes tipos de células em amostras de *swabs* nasofaríngeos/faríngeos de doadores saudáveis e pacientes com COVID-19 (B). Expressão normalizada de NEU1 sobreposta nos espaços UMAP (C). UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*. NEU = neuraminidase; Neu = neutrófilos.

Os resultados mostraram um aumento da expressão média e porcentagem de expressão de NEU1, mas não de NEU3 ou NEU4, em neutrófilos infiltrados no trato respiratório de pacientes com COVID-19 grave em relação aos pacientes com a forma moderada da doença (Figuras 19A-C). Do mesmo modo, apenas a expressão de NEU1 foi detectada em neutrófilos infiltrados no trato respiratório inferior provenientes de pacientes com COVID-19 grave (Figuras 20A-C).

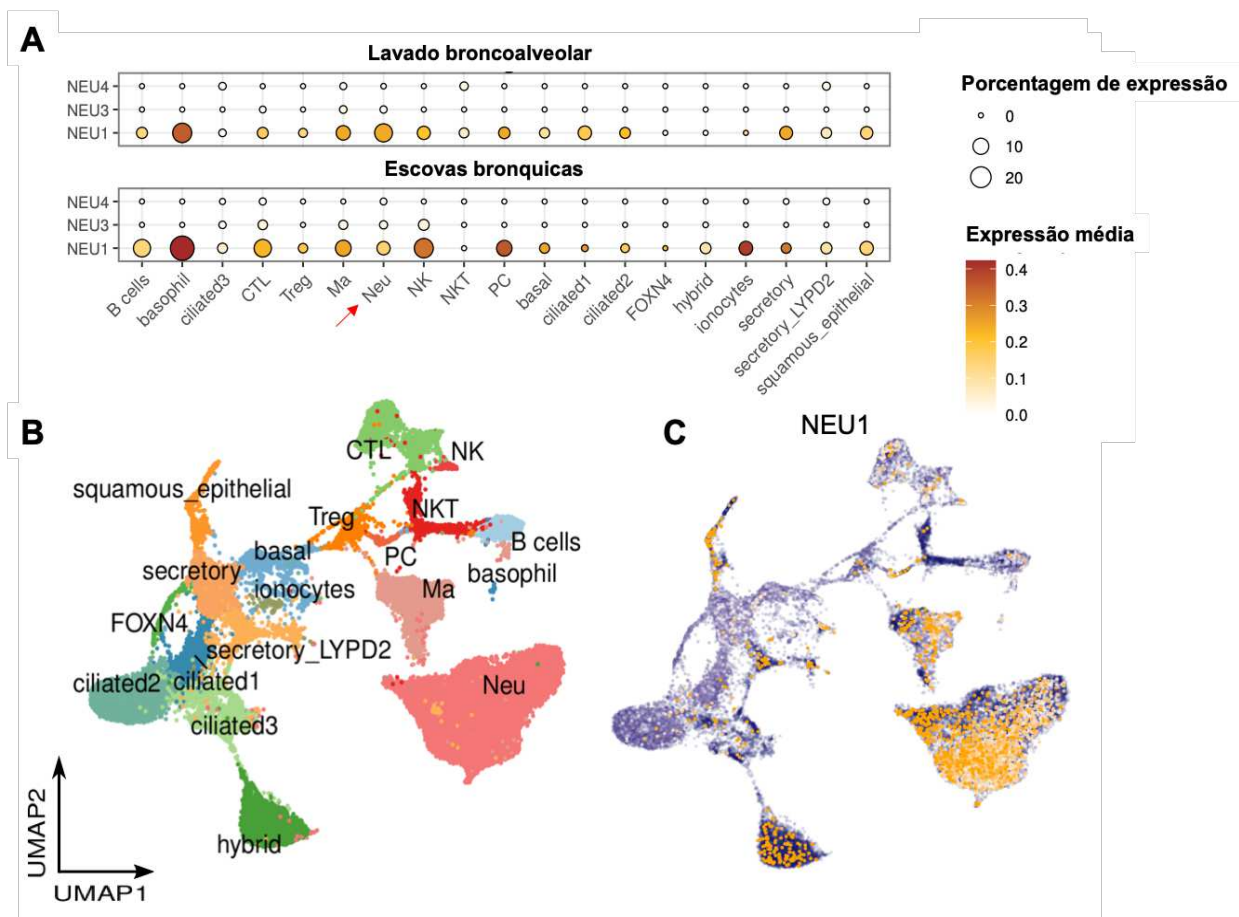


Figura 20. Expressão de NEU1 em neutrófilos e outras células infiltradas no trato respiratório inferior de pacientes com COVID-19 grave. Expressão gênica de NEU1, NEU3 e

NEU4 em diversos tipos celulares (infiltradas ou residentes) provenientes do trato respiratório inferior de pacientes com COVID-19 grave. O tamanho do círculo é proporcional à porcentagem de células que expressam os genes relatados em um nível de expressão normalizado superior a um. Neutrófilos infiltrados estão destacados com a seta vermelha (\rightarrow) (A). Análise UMAP codificada por cores mostrando diferentes tipos de células em amostras de lavado broncoalveolar e escovas brônquicas protegidas de pacientes com COVID-19 grave (B). Expressão normalizada de NEU1 sobreposta nos espaços UMAP (C). UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*; NEU = neuraminidase; Neu = neutrófilos.

Além disso, um aumento na atividade de NEU derivada de neutrófilos isolados foi verificado quando células de doadores saudáveis (controles) foram comparadas as células de pacientes com COVID-19 grave ou na forma crítica da doença. Pacientes críticos correspondem aos indivíduos internados na UTI e que necessitavam uma maior quantidade de oxigênio. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas quando pacientes considerados grave e críticos foram comparados (Figura 21A-B).

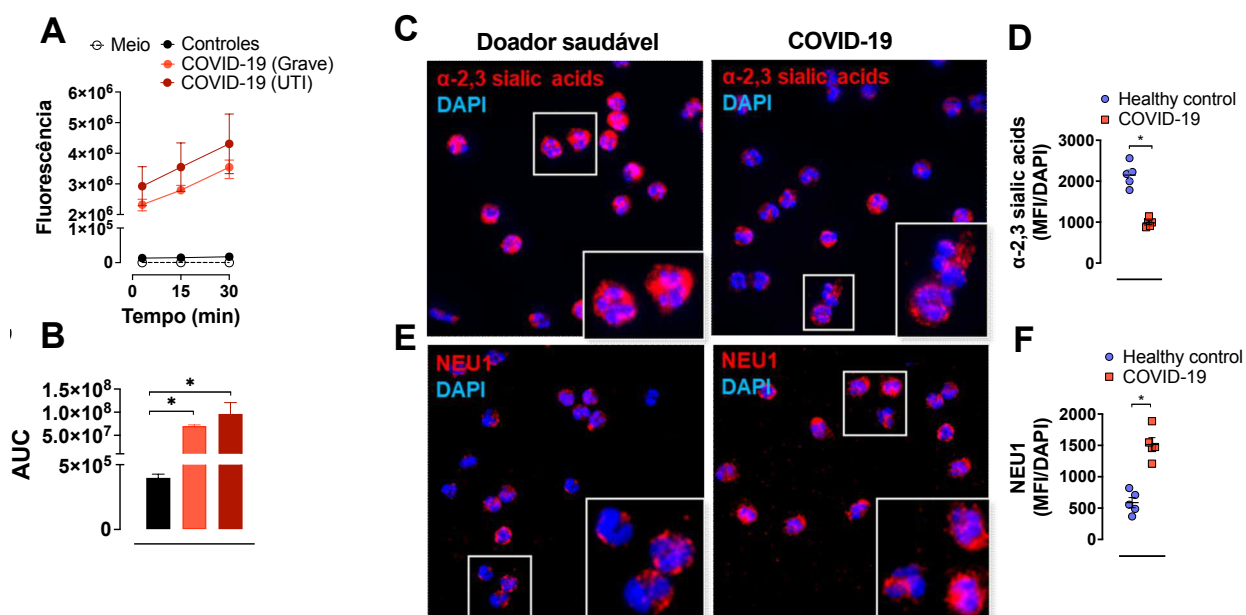


Figura 21. Atividade aumentada de NEU1 em neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave e crítica. Neutrófilos isolados ($0,5 \times 10^6$) de controles saudáveis ($n = 5$), pacientes graves ($n = 6$) ou críticos internados na UTI com COVID-19 ($n = 5$) foram adicionados em uma placa escura de fundo plano de 96 poços sob o gelo. Em seguida, o substrato 4-MU-NANA ($0,025 \text{ mM}$) foi adicionado e o produto fluorescente resultante lido a 37°C por 30 min (A). Os valores da área sob a curva (AUC) são mostrados em lâminas de B. Lâminas contendo $0,3 \times 10^6$ neutrófilos foram confeccionadas para detectar a expressão de siálicos α 2-3 (C) ou NEU1 (D) na membrana de neutrófilos (vermelho) e o DAPI para a detecção de DNA (azul) por imunofluorescência indireta. Fotos representativas (ampliação de $100\times$) foram capturadas de pelo menos 3 campos diferentes e analisadas usando o software ImageJ 1.53J. O MFI foi avaliado em cada campo capturado (cada ponto corresponde à média de um doador diferente) e normalizado pelo número de células

positivas para DAPI (**D; F**). Os resultados estão expressos como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste T de Student (* $P < 0,05$). UTI = Unidade de Terapia Intensiva; NEU = neuraminidase; DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol; DNA = ácido desoxirribonucleico; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Esses resultados foram confirmados por experimentos de imunofluorescência nos quais células de pacientes com COVID-19 grave apresentaram uma menor marcação para ácidos siálicos $\alpha 2,3$ (**Figura 21C-D**) e maiores níveis de NEU1 (**Figura 21E-F**) quando comparado a marcação em neutrófilos de doadores saudáveis (**Figura 21C-F**).

Conforme demonstrado anteriormente, os neutrófilos circulantes apresentam alterações fenotípicas e características de ativação celular em pacientes com COVID-19 ativa, mas não em convalescentes (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, no qual não foi possível observar diferenças significativas entre doadores saudáveis e pacientes convalescentes (**Figura 22A-C**).

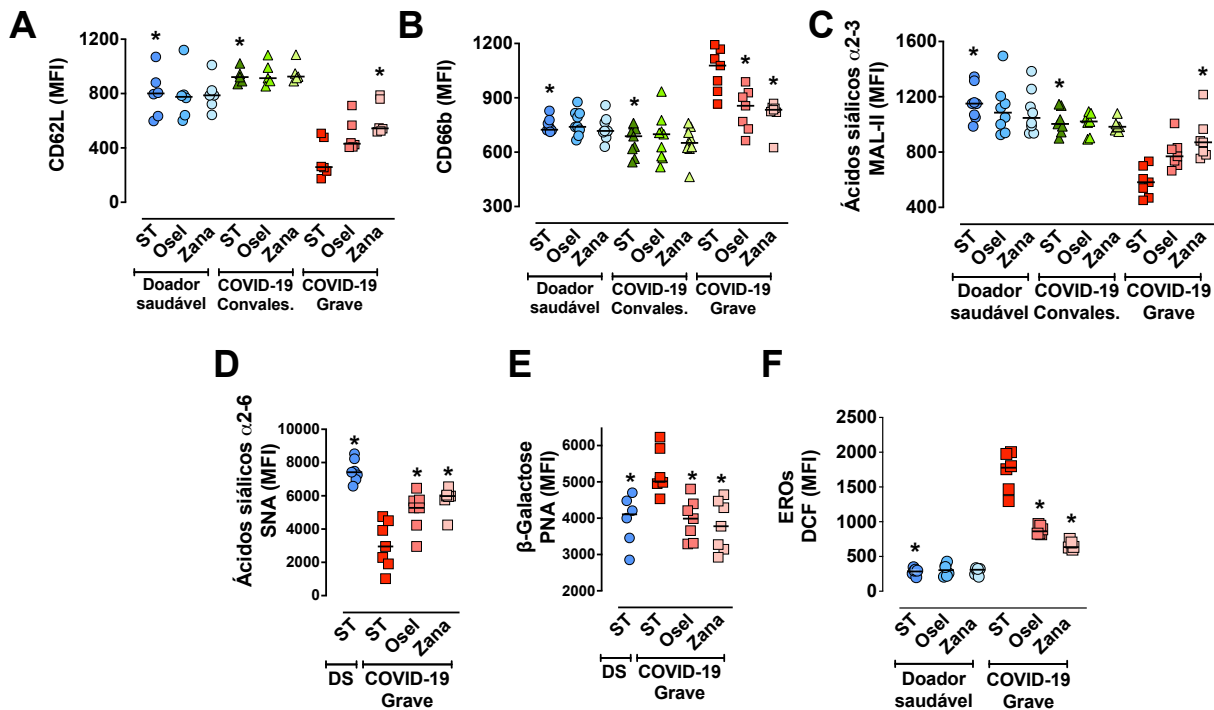


Figura 22. Ativação e clivagem de ácidos siálicos em neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave ativa, mas não em convalescentes. Sangue total de doadores saudáveis, pacientes com COVID-19 grave e pacientes convalescentes foram tratados ou não com Osetamivir (100 μ M) ou Zanamivir (30 μ M) e os leucócitos totais (1×10^6 ; $n = 6-7$ por grupo) foram avaliados

quanto aos marcadores de ativação celular CD62L **(A)**, CD66b **(B)** e aos níveis de ácidos siálicos α 2-3 **(C)**, α 2-6 **(D)** e resíduos de β -galactose **(E)**. A produção total de EROs foi avaliada em neutrófilos isolados de doadores saudáveis (n = 6) ou pacientes graves com COVID-19 (n = 6) usando a sonda CM-H2DCFDA (5 μ M) para a leitura da molécula fluorescente DCF por citometria de fluxo. O MFI foi analisado em células CD66b⁺ **(F)**. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (*P < 0,05 comparado ao grupo ST COVID-19 grave). CMH2DCFDA = diacetato de 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína diéster acetil; ST = sem tratamento; Osel = Oseltamivir; Zana = Zanamivir; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*; SNA = lectina purificada da *Sambucus nigra*; PNA = aglutinina de amendoim; EROs = espécies reativas de oxigênio; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

No entanto, neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave apresentaram uma diminuição de CD62L **(Figura 22A)** e uma regulação positiva dos níveis de CD66b **(Figura 22B)**, que foi acompanhada por uma redução de ácidos siálicos α 2-3 **(Figura 22C-E)** e do aumento da produção de EROs **(Figura 22F)**. Essas alterações foram diminuídas na presença dos inibidores de NEU **(Figura 22A-F)**.

Como a NEU pode ser liberada no meio extracelular e encontrada na sua forma solúvel no plasma durante condições de inflamação sistêmica (YANG et al., 2018), em seguida foi investigado se o plasma de pacientes com COVID-19 grave possui atividade de NEU aumentada, e, se por si só, é capaz de induzir a resposta de neutrófilos de doadores saudáveis. Primeiramente, foi observada a atividade de NEU no plasma de pacientes com COVID-19 grave, atividade essa reduzida na presença dos inibidores Oseltamivir e Zanamivir **(Figura 23A)** ou quando o plasma foi inativado pelo calor **(Figura 23B)**. Além disso, a estimulação no sangue total de doadores saudáveis com plasma fresco de pacientes com COVID-19 grave, mas não de convalescentes ou de doadores saudáveis, levou a redução de ácidos siálicos **(Figura 23C)**, ativação de neutrófilos **(Figura 23D)**, e produção de EROs **(Figura 23E)**. Esses efeitos foram significativamente reduzidos na presença do Oseltamivir ou Zanamivir, chegando próximo aos níveis encontrados nas células de doadores saudáveis ou pacientes convalescentes **(Figura 23C-E)**. Entretanto, foi observado que a incubação de neutrófilos de doadores saudáveis com o plasma inativado ainda é capaz de mimetizar, mesmo que parcialmente, os efeitos do plasma fresco **(Figura 23C-E)**. Esses dados sugerem que outros fatores solúveis encontrados no plasma de pacientes com COVID-19 grave podem favorecer a estimulação de neutrófilos.

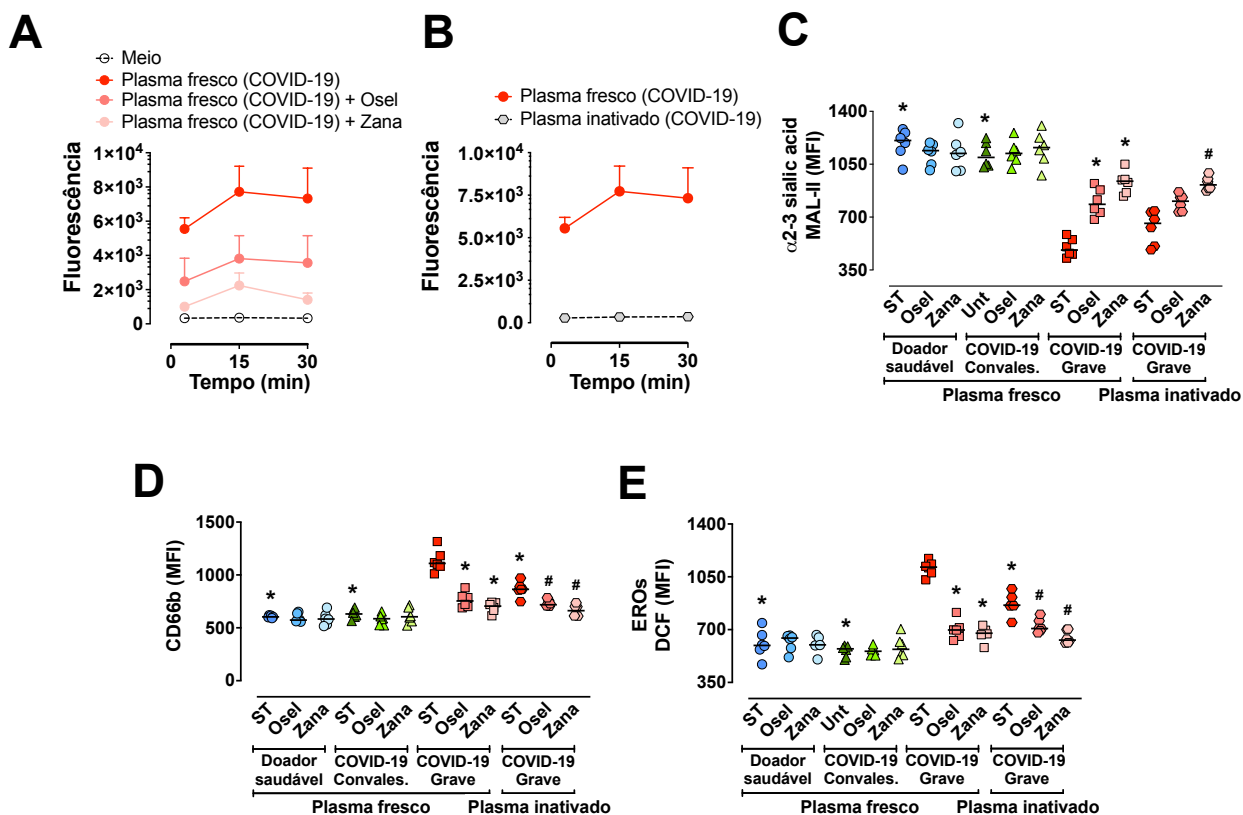


Figura 23. Atividade de NEU e de outros fatores solúveis no plasma de pacientes com COVID-19 grave. A atividade de NEU foi avaliada no plasma fresco de pacientes com COVID-19 grave COVID-19 ($n = 7$) na presença ou ausência de Osetamivir ($100 \mu\text{M}$) ou Zanamivir ($30 \mu\text{M}$) (**A**). A atividade NEU também foi avaliada no plasma inativado pelo calor ($n = 7$) (**B**). As amostras de plasma foram adicionadas em uma placa escura de fundo plano de 96 poços sob o gelo e o substrato 4-MU-NANA ($0,025 \text{ mM}$) foi adicionado a reação resultando em um produto fluorescente lido a 37°C por 30 min. Leucócitos totais de doadores saudáveis (1×10^6 ; $n = 7$) foi incubado (2h, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$) com 7% de plasma fresco obtido de controles saudáveis, pacientes graves com COVID-19 ou pacientes convalescentes. Além disso, células de doadores saudáveis também foram incubados na presença ou não de plasma de pacientes graves inativados pelo calor. As incubações aconteceram com pré-tratamento ou não com Osetamivir ($100 \mu\text{M}$) ou Zanamivir ($30 \mu\text{M}$). Os níveis de CD66b (**C**), ácidos siálicos (**D**) e a produção de EROs (**E**) foram avaliados por FACS. O MFI foi analisado em células CD66b⁺. Os dados estão representados como média \pm SEM e submetidos a ANOVA de uma via seguido por teste de Dunnett e Tukey (* $P < 0,05$ comparado ao grupo ST COVID-19 grave estimulado com plasma fresco; # $P < 0,05$ comparado ao grupo ST COVID-19 grave estimulado com plasma inativado). ST = sem tratamento; Osel = osetamivir; Zana = zanamivir; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Neutrófilos isolados de doadores saudáveis também foram estimulados com a proteína recombinante humana S100A8 (rh S100A8) (**Figura 24A-H**). S100A8 é uma das proteínas mais abundantes no citosol de neutrófilos, e pode ser liberada no meio

extracelular para atuar como uma alarmina e como agonista de TLR4 (VOGL et al., 2018). Na COVID-19, os níveis plasmáticos de S100A8 estão aumentados e se correlacionam com a severidade da doença (CHEN et al., 2020). Dessa forma, foi demonstrado que a rh S100A8 possui efeitos semelhantes ao LPS, sendo capaz de estimular a atividade NEU em neutrófilos isolados, mediar a clivagem de ácidos siálicos, desencadear a ativação celular e a produção EROs. Os efeitos da rh S100A8 foram diminuídos na presença do Oseltamivir e Zanamivir (**Figura 24A-H**).

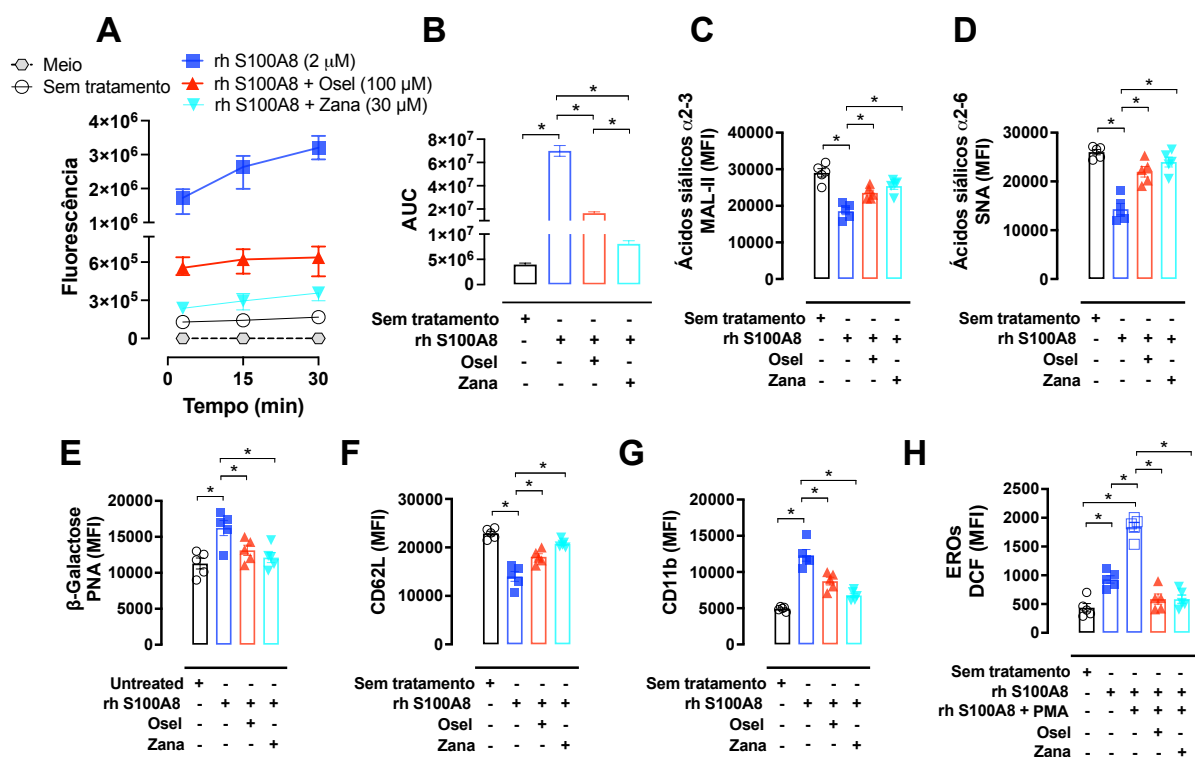


Figura 24. rh S100A8 mimetiza os efeitos do LPS e induz a ativação de NEU em neutrófilos humanos. Neutrófilos isolados de doadores saudáveis (1×10^6 ; $n = 5$) foram ressuspensos em HBSS e adicionados em placa de 96 poços escura sob o gelo. Então, a proteína rh S100A8 (2 µM, 37°C, 5% CO₂) foi adicionada a reação na presença não de Oseltamivir (100 µM) ou Zanamivir (30 µM). O substrato 4-MU-NANA (0,025 mM) foi usado para detectar a atividade da neuraminidase derivada de neutrófilos (**A**). Os valores de AUC são mostrados em **B**. Os níveis de ácidos siálicos α2-3 (**C**), α2-6 (**D**) e resíduos de β-galactose (**E**) e os marcadores de ativação celular CD62L (**F**), CD11b (**G**) e produção total de EROs (**H**) foram avaliados por citometria de fluxo em células CD66⁺. rh = proteína recombinante humana; Oselt = oseltamivir; Zana = zanamivir; MAL-II = lectina purificada da *Maackia amurensis*; SNA = lectina purificada da *Sambucus nigra*; PNA = do inglês *peanut agglutinin*; MFI = do inglês *Median fluorescence intensity*.

Esses resultados sugerem que a NEU intracelular, a NEU liberada no plasma bem como mediadores solúveis, a exemplo da proteína S100A8, podem representar fatores que desencadeiam a desregulação de neutrófilos na COVID-19 grave.

Por fim, o efeito da inibição da NEU em um modelo *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida pela administração intranasal do betacoronavírus murino MHV-3 foi avaliada. Esse modelo leva a uma resposta inflamatória local, dano tecidual e comprometimento das funções pulmonares, seguido por manifestações sistêmicas, que se assemelham a muitas características da COVID-19 grave (ANDRADE et al., 2021). O pós-tratamento com Oseltamivir em camundongos infectados diminuiu significativamente a carga viral (**Figura 8A**) e reduziu a infiltração de neutrófilos para os pulmões (**Figura 8B**).

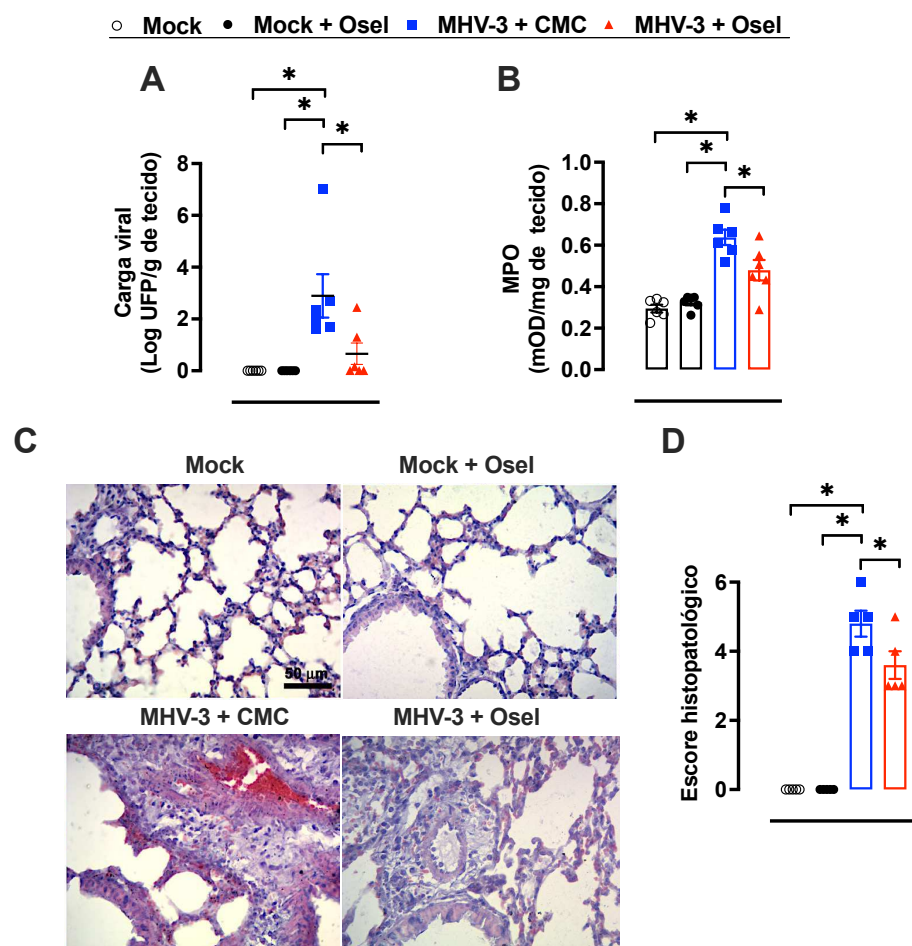


Figura 25. A inibição de NEU do hospedeiro regula as respostas de neutrófilos na inflamação pulmonar aguda induzida pelo betacoronavírus murino MHV-3. Camundongos C57BL/6 (n = 6) sob anestesia com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) foram inoculados por via intranasal com meio de cultura (*Mock*) ou o coronavírus murino MHV-3 (3×10^3 PFU).

Após 24 horas da inoculação, os camundongos foram tratados ou não com fosfato de oseltamivir (10 mg/kg) ou carboximetilcelulose de sódio 0,5% (CMC) (v/v) iniciando 24 horas após a infecção, 12/12 horas, PO. Três dias após a infecção, todos os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados para análise posterior. A carga viral foi avaliada em lisados pulmonares por ensaio de placa e os resultados expressos como log₁₀ PFU por grama (g) de tecido pulmonar **(A)**. A infiltração de neutrófilos nos pulmões foi determinada indiretamente pela atividade de MPO usando um ensaio colorimétrico e os resultados expressos como mOD por miligrama (mg) de pulmões **(B)**. A análise histológica do pulmão foi feita usando tecidos corados com hematoxilina e eosina (H&E) e os resultados expressos por imagens representativas (ampliação de 40x; Escala: 50 µm) dos diferentes grupos **(C)** e por uma análise do escore histopatológico **(D)**. Os resultados estão expressos como média ± SEM. *P < 0,05. MHV = vírus da hepatite de camundongo; Osel = Oseltamivir; PFU = plaque-forming units; MPO = mieloperoxidase; mOD = densidade óptica média.

A análise histológica do tecido pulmonar também revelou que o tratamento diminuiu o infiltrado inflamatório na região perivascular e peribronquiolar relacionada a um escore histopatológico significativamente menor **(Figura 8C-D)**, o que indica proteção da arquitetura pulmonar. Em conjunto esses dados sugerem o envolvimento de NEU na inflamação pulmonar aguda avaliada em modelo murino que se assemelha a COVID-19 em humanos, e sua inibição como um possível alvo terapêutico para regular os danos induzidos por neutrófilos na doença.

6. DISCUSSÃO

O papel dos neutrófilos na defesa do hospedeiro está baseada na sua resposta rápida e efetiva contra agentes infecciosos. No entanto, as estratégias citotóxicas desempenhadas por essas células não são capazes de diferenciar eficientemente os antígenos microbianos e os do próprio hospedeiro. Durante a inflamação sistêmica essa resposta pode ocorrer de forma sustentada e desregulada compreendendo um mecanismo pelo qual os neutrófilos podem induzir danos aos tecidos e contribuir para disfunção orgânica. Portanto, é essencial entender como essas células se tornam desreguladas, na perspectiva de encontrar novos alvos terapêuticos para reduzir a ativação celular, todavia, mantendo suas propriedades microbicidas.

A diminuição do conteúdo de ácidos siálicos presente nos glicoconjugados da membrana celular parecem influenciar fortemente na ativação de leucócitos frente a estímulos microbianos (HENRICKS ET AL., 1982; SUZUKI ET AL., 1982; ARORA; HENRICHON, 1994; CHANG et al., 2012). Estudos demonstram que a incubação *in vitro* de neutrófilos com NEU purificadas de *Streptococcus pneumoniae* ou *Clostridium perfringens* induz suas funções, como a fagocitose e a produção de EROs (SUZUKI et al., 1982; CHANG et al., 2012). No entanto, o entendimento da influência das NEU endógenas e sua contribuição para a desregulação de neutrófilos ainda é pouco estudada.

Os quatro subtipos de NEU descritos em mamíferos (NEU1, NEU2, NEU3 e NEU4) removem ácidos siálicos de glicoconjugados com preferências específicas de substrato (SMUTOVA et al., 2014). A NEU1 cliva preferencialmente ácidos siálicos na conformação α 2,3 e parece ser o subtipo mais importante em células imunes, estando expressa primariamente nos lisossomos (MIYAGI et al., 2012), mas também na superfície celular (SAKARYA et al., 2004; AMITH et al., 2010; ABDULKHALEK et al., 2011; FENG et al., 2012). Estudos apontam que em neutrófilos humanos incubados com PMA, ionóforo de cálcio A23187, IL-8 e com o LPS ocorre uma redistribuição de NEU1 dos compartimentos intracelulares e sua mobilização para a membrana plasmática (CROSS; WRIGHT, 1991; CROSS et al., 2003; AMITH et al., 2009). Na membrana essas enzimas podem regular a

função de vários receptores, como o receptor Fc γ , o receptor de insulina e a integrina β -4 (GLANZ et al., 2019). Além disso, em macrófagos estimulados pelo LPS apenas o subtipo NEU1 forma complexos com TLR2, TLR3 ou TL4 na superfície celular (AMITH et al., 2009).

Os mecanismos de ativação de NEU1 ainda não são completamente conhecidos, porém, em neurônios (JAYANTH et al., 2010), macrófagos (PSHEZHETSKY; HINEK, 2011; ABDULKHALEK et al., 2012; ABDULKHALEK; SZEWCZUK, 2013) e células tumorais hepáticas (HAXHO et al., 2018) a ativação de NEU1 envolve a formação de um complexo enzimático junto com outras duas hidrolases, a β -galactosidase (β -Gal) e a proteína protetora/Catepsina A (PPCA) (VINOGRADOVA et al., 1998). Esta associação é essencial para a estabilidade e ação de todas as três enzimas, particularmente NEU1, estando diretamente ligada à sua atividade catalítica nos lisossomos (BONTEN et al., 2009). Sob estímulo PPCA e outras proteínas agem como chaperonas e proteínas transportadoras de NEU1 na etapa de translocação para membrana plasmática. Esse evento envolve a adição da proteína ligante de elastina (do inglês *elastin-binding protein*, EBP) a β -Gal formando a subunidade β -Gal-EBP (BONTEN et al., 2009; KHAN; SERGI, 2022).

Em neurônios a ativação do receptor tirosina cinase TrkA induzida pela neurotrofina induz a atividade de NEU para clivar resíduos de ácidos siálicos na conformação α 2,3 presentes na própria estrutura dos receptores Trk. Isso parece ser um fator facilitador para sua dimerização, internalização e ativação subsequente em outras células e neurônios corticais primários (WORONOWICZ et al., 2007). Posteriormente foi descoberto que a sinalização da neurotrofina em receptores TrkA também desencadeia a resposta de receptores acoplados a proteína G, especialmente a partir da subunidade G α i, induzindo a atividade da MMP-9 para ativação de NEU1 em neurônios primários e linhagens celulares que expressam TrkA e TrkB. Nessas células o complexo NEU1/MMP-9 interage com a TrkA na superfície celular (JAYANTH et al., 2010).

Do mesmo modo, já foi demonstrado que o desafio de macrófagos e células dendríticas com o LPS leva à ativação da MMP-9 para induzir a atividade membranar de NEU1. Esses eventos contribuem para a clivagem de ácidos siálicos α 2-3 presentes na estrutura do TLR4, permitindo sua dimerização e transdução do sinal (AMITH et al., 2010;

ABDULKHALEK et al., 2011; FENG et al., 2012). Mais recentemente mecanismos semelhantes foram relatados em células de hepatocarcinoma contendo o receptor para insulina (HTC-IR), um outro exemplo de receptor catalítico, tal qual o TrkA e o TLR4. Agonistas, antagonistas e moduladores alostéricos podem se ligar a receptores acoplados a proteína G de diferentes maneiras, criando conformações que modulam diferencialmente a sinalização através de uma ou mais proteínas G. Isso cria uma plataforma de sinalização e transdução, que controla o complexo NEU1/MMP-9 e a ativação do receptor de insulina através da modificação da sua glicosilação (HAXHO et al., 2018).

Um fenômeno semelhante foi encontrado no presente estudo com neutrófilos humanos incubados na presença do LPS. Primeiramente foi mostrado que essa incubação tanto no sangue total quanto em células isoladas foi capaz de estimular a atividade de NEU em neutrófilos de doadores saudáveis. Além disso, o LPS induziu a translocação de NEU1 para a superfície de neutrófilos, aumentando sua associação com a MMP-9. Esse efeito foi acompanhado do aumento da clivagem de ácidos siálicos em diferentes conformações e marcada por alterações fenotípicas e funcionais. Por outro lado, a pré-incubação das células com Oseltamivir, Zanamivir, MAL-II ou a inibição seletiva da MMP-9, reduziu a atividade de NEU e os efeitos desencadeados pelo LPS.

É possível que a interação NEU1/MMP-9 também exerça funções importantes na manutenção dos níveis de ácidos siálicos expressos em receptores de membrana de neutrófilos, em especial o TLR4, como observado em outras células (AMITH et al., 2010; FENG et al., 2012). Estudos demonstram que o TLR4 é altamente glicosilado apresentando um conteúdo abundante de ácidos siálicos na sua estrutura (CORREIA; ULEVITCH, 2002). Em diversos contextos a clivagem de ácidos siálicos presentes no TLR4 é um fator potencializador dos efeitos pró-inflamatórios mediados pelo LPS (FENG et al., 2012; ALLENDORF et al., 2020; SUNDARARAJ et al., 2021). Em células de linhagem de macrófagos RAW-blue o tratamento com Oseltamivir, um inibidor seletivo MMP9i ou com o antagonista BIM-23127 inibem o recrutamento da molécula adaptadora MyD88 para o TLR7 e interfere com sua sinalização (ABDULKHALEK; SZEWCZUK, 2013). Junto esses dados reforçam a hipótese do controle da atividade de receptores catalíticos por meio de mudanças da sua glicosilação.

Possivelmente ainda essa perda de ácidos siálicos em glicoproteínas de membrana resulte em uma falha da sinalização de receptores inibitórios ativados por ácidos siálicos, a exemplo dos receptores Siglecs (CARLIN et al., 2009; MCMILLAN et al., 2013; ALI et al., 2014; LIZCANO et al., 2017). Chen et al. (2014) mostrou que a ativação do TLR4 desencadeia a mobilização de NEU1 para a superfície celular e interrompe a partir da clivagem de ácidos siálicos de membrana a interação TLR4-Siglec-E. Essa interação é sugerida como um importante mecanismo inibitório das respostas induzidas pelo LPS em células dendríticas de camundongos (CHEN et al., 2014).

Juntos, esses dados sugerem que a ativação de NEU pode estar envolvida na formação de uma resposta pela qual os neutrófilos mobilizam rapidamente seus mediadores microbicidas durante uma infecção. Caso esses mecanismos sejam desregulados podem representar potenciais fontes de danos aos tecidos durante infecções graves. Nesse sentido, foi evidenciado aqui que a inibição da atividade de NEU *in vitro* é capaz reduzir as respostas de neutrófilos desencadeada pela cultura celular na presença de altas concentrações do LPS. Nesse sentido, o próximo passo do estudo compreendeu relacionar os dados encontrados *in vitro* e os possíveis efeitos benéficos da inibição de NEU nas desordens inflamatórias mediada por neutrófilos, a exemplo da sepse.

As infecções sustentadas desencadeiam à granulopose de emergência na medula óssea e posteriormente à liberação de formas maduras e imaturas de neutrófilos no sangue periférico (MANZ; BOETTCHER, 2014). O excesso de neutrófilos imaturos na periferia e infiltrados nos tecidos está relacionada à deterioração clínica em pacientes sépticos (DAIX et al., 2018). Além disso, defeitos na migração para o local da infecção e a atividade funcional aumentada, como a presença prolongada de EROs e NETs na vasculatura ou nos tecidos, foram identificadas durante a doença, o que também é considerado um fator crítico para a sua progressão (CAMICIA et al., 2014; SHEN et al., 2017). Nesse sentido, buscar alvos moleculares baseados nos aspectos funcionais da resposta celular de neutrófilos pode configurar possíveis alternativas terapêuticas.

Diferentes modelos animais têm sido utilizados para estudar a patogênese da sepse, e, por conseguinte, avaliar a eficácia de novos fármacos. Dentre esses modelos destacam-se os que utilizam a toxemia induzida pela administração sistêmica do LPS,

infecções bacterianas via inoculação intraperitoneal, intravenosa ou pulmonar, e a ruptura da barreira do hospedeiro por meio da CLP com infecção polimicrobiana (BURAS et al., 2005; SORDI et al., 2013; YANG et al., 2018). Nenhum desses protocolos de forma individual representa uma plataforma perfeita para testes de terapias medicamentosas, e o uso de modelos complementares ou combinados se faz necessário para o desenvolvimento de novos fármacos (BURAS et al., 2005; LEWIS et al., 2016).

O modelo de sepse induzida por CLP se assemelha à progressão e características da sepse humana podendo reproduzir diferentes graus de severidade da infecção (RUIZ et al., 2016). Camundongos submetidos a CLP e a uma infecção sem disfunção orgânica não apresentam deficiências no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Entretanto, durante a sepse ocorre uma falha acentuada na infiltração neutrofílica para o peritônio mesmo algumas horas após a CLP. Como esperado, a carga bacteriana não é eficientemente controlada e a disseminação de patógenos para o sangue é observada (BENJAMIM et al., 2000). Da mesma forma, foi demonstrado que ratos desafiados sistemicamente com LPS demonstraram defeitos no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (TAVARES-MURTA et al., 2001). Já no protocolo de sepse induzida por pneumonia, após 24 horas da administração intratraqueal de *K. pneumoniae*, foi observado o pico da infiltração massiva de neutrófilos para os pulmões (SORDI et al., 2013). Esses dados indicam que mecanismos distintos contribuem para migração celular, mecanismos esses influenciados tanto pela severidade quanto pelo foco inicial da infecção.

A remoção de ácidos siálicos na membrana de neutrófilos altera sua adesividade, quimiotaxia e migração para os focos infecciosos (CROSS et al., 2003; SAKARYA et al., 2004; FENG et al., 2011). Apesar de não ter abordado o efeito *in vivo* do Oseltamivir diretamente em neutrófilos, foi observado que nos modelos de sepse induzida por peritonite ou pneumonia em camundongos, esse fármaco diminui a infiltração de neutrófilos nos espaços broncoalveolares ou tecidos pulmonares, sugerindo que a regulação da migração a partir da redução da atividade de NEU contribui para a sobrevivência de camundongos durante a doença.

Curiosamente, o tratamento com o Oseltamivir produziu efeitos opostos em relação a migração de neutrófilos para o foco de infecção. Isso pode ser explicado pelos

diferentes mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e pulmões. Embora a expressão de CD62L e o rolamento de neutrófilos pelo endotélio sejam necessários para sua migração para a cavidade peritoneal, esse efeito não parece ser necessário para a migração para os pulmões (PETRI et al., 2008; ALVES-FILHO et al., 2010). Além disso, a ativação sistêmica de neutrófilos leva ao enrijecimento e deformidades celulares, resultando na retenção de neutrófilos nos pequenos capilares dos pulmões (WORTHEN et al., 1989).

Park et al. (2019) demonstrou que na sepse induzida pela administração intraperitoneal de LPS inicialmente a motilidade dos neutrófilos nos capilares pulmonares aumenta e progressivamente diminui até parar durante o desenvolvimento da doença. Então, os neutrófilos obstruem os vasos e liberam EROs *in situ* contribuindo para a disfunção endotelial. Esses neutrófilos sequestrados no pulmão possuem uma alta expressão na membrana plasmática de CD11b/CD18 (Mac-1) quando comparados aos da circulação. Já o tratamento com um inibidor de Mac-1 reduz a infiltração de neutrófilos para os vasos do pulmão e o dano vascular.

Um outro aspecto importante é a transmigração de neutrófilos do compartimento vascular para o local da infecção, que é impulsionada pela interação entre quimioatraentes e o CXCR2 na membrana de neutrófilos, que é regulado negativamente durante o curso da sepse (LEFKOWITZ et al., 2005; RIOS-SANTOS et al., 2006; LEE et al., 2015). Estudos mostram que a estimulação prolongada ou repetida leva à internalização de CXCR2, um receptor acoplado à proteína G, de maneira dependente de GRKs (do inglês *GPCR kinases*), β -arrestina e clatrina (LEFKOWITZ; SHENOY, 2005; LEE et al., 2015). Assim, reguladores negativos que podem impedir a internalização do CXCR2 são sugeridos como alvos promissores para regular a migração celular durante a sepse (RIOS-SANTOS et al., 2006; MARTIN et al., 2010; SHEN et al., 2021). Por outro lado, o CCR2, não encontrado comumente na superfície de neutrófilos em condições basais, começa a ser expresso após a indução da sepse e contribui para o recrutamento de neutrófilos para órgãos distantes do local da infecção (SOUTO et al., 2011).

Dessa forma, a diminuição da migração de neutrófilos para os pulmões após o tratamento com o Oseltamivir evidenciada aqui parece ser um fator determinante para impedir a injúria tecidual tanto quando o foco inicial da infecção foi a cavidade peritoneal

quanto o trato respiratório superior. Nos experimentos *in vitro* foi verificado que a inibição de NEU reduziu a perda de CD62L e CXCR2 bem como o aumento de CD11b induzido pelo LPS, sugerindo um mecanismo que favorece o redirecionamento ou regulação da migração de neutrófilos na sepse. Esse efeito foi acompanhado do reestabelecimento dos conteúdos de ácidos siálicos na superfície de neutrófilos pulmonares nos três modelos avaliados.

Em termos funcionais tanto a atividade oxidante quanto a capacidade de fagocitose por neutrófilos estão prejudicadas durante a sepse (DELANO et al., 2011; MISHRA et al., 2012; DEMARET et al., 2015). A atividade de cinases, que medeiam às cascatas de sinalização da função dos neutrófilos, também foi apontada como amplamente prejudicada em pacientes com a doença (HOOGENDIJK et al., 2019). Os neutrófilos matam os patógenos invasores por meio de proteases digestivas contidas no fagolisossomo, que é regulado pelo pH do fagossomo (LEVINE et al., 2015). Durante a inflamação, a produção de EROs por neutrófilos leva à acidificação do fagossomo levando a destruição dos microrganismos ingeridos (KOVACH; STANDIFORD, 2012). Consistente com isso, a acidificação dos neutrófilos peritoneais foi associada à mortalidade em um modelo animal de sepse induzida por peritonite (CHISWICK et al., 2015). Além disso, as serinoproteases liberadas por neutrófilos podem clivar os receptores do complemento, como o C5aR, levando a um defeito na fagocitose, em parte devido à sua capacidade de encontrar alvos opsonizados (MORRIS et al., 2011).

Nos experimentos *in vitro* demonstrados aqui foi possível observar um efeito contrário com relação a fagocitose relatada durante a sepse. Foi evidenciado um aumento da capacidade fagocítica e incorporação de *E. coli* por neutrófilos estimulados, provavelmente relacionado ao também aumento da expressão de receptores fagocíticos CD11b na membrana. O estímulo da fagocitose devido o aumento da atividade sialidase, em especial de NEU1, em outras células também já foi estudado por outros grupos (SEYRANTEPE et al., 2010; ALLENDORF; BROWN, 2022). Possivelmente os defeitos na fagocitose durante a sepse ocorrem em estágios mais intermediários e tardios da infecção, em que também é encontrado estágios de imunossupressão (PILLAY et al., 2012; DE KLEIJN et al., 2013).

A manutenção da geração de EROs também é fundamental para o desfecho da sepse. Em pacientes com sepse fatal, observou-se um aumento acentuado da produção de EROs por neutrófilos (SANTOS et al., 2012). Essa produção descontrolada pode se acumular nos leitos vasculares contribuindo para a perda da integridade da barreira endotelial e subsequente vazamento vascular, levando a lesões orgânicas, como a lesão pulmonar aguda (FOX et al., 2013; ZHAO et al., 2020). Os níveis excessivos de EROs também podem induzir a NETose lítica. Assim como as EROs, as NETs podem proteger o hospedeiro devido suas propriedades antimicrobianas, enquanto a NETose excessiva durante a sepse também demonstrou ser prejudicial ao hospedeiro por induzir trombose intravascular, coagulação intravascular disseminada e disfunção de múltiplos órgãos (KIMBALL et al., 2016; DELABRANCHE et al., 2017).

Nesse contexto, fazendo um paralelo entre os dados *in vitro* e *in vivo* encontrados nesse estudo, a inibição da NEU endógena regulou a fagocitose, a produção de EROs e a liberação de NETs por neutrófilos, sugerindo que durante a sepse a inibição dessa enzima é um fator benéfico. O papel da ativação de neutrófilos induzida por NEU sugerido aqui concorda com um estudo anterior no qual a deleção de NEU1 em células hematopoiéticas conferiu resistência à endotoxemia (CHEN et al., 2014). No mesmo estudo, o inibidor de NEU Neu5Gc2en aumentou a sobrevivência de camundongos sépticos (CHEN et al., 2014). Em um outro estudo, a inibição de NEU no sangue também aumentou a sobrevivência de animais submetidos a sepse induzida por *E. coli*. O aumento da atividade de NEU solúvel no soro leva a uma redução dos conteúdos de ácidos siálicos presentes em glicoproteínas e a sua depuração na circulação, como no caso da fosfatase alcalina (FAL) intestinal, envolvida na desintoxicação pelo LPS circulante (YANG et al., 2018). Portanto, o tratamento de camundongos com inibidores de NEU parece levar a uma inibição sistêmica da enzima, que está amplamente distribuída e pode contribuir para desregulação celular e interferir na atividade de proteínas envolvidas na remoção de PAMPs do organismo.

A ativação desregulada de NEU endógenas na sepse é reforçada indiretamente pelo fato de que ácidos siálicos na sua forma livre podem ser encontrados na circulação de pacientes com a doença. Juntamente com a dosagem de outros marcadores importantes para o diagnóstico, em especial a procalcitonina, a determinação dos níveis

séricos desse carboidrato no soro se mostrou como uma alternativa de alta eficácia, principalmente em casos de sepse viral (YAO et al., 2020).

A infecção pelo SARS-CoV-2 em indivíduos não vacinados desencadeia doença leve na maioria dos pacientes, porém uma parcela pode evoluir para doença grave com muitas características semelhantes à sepse, incluindo síndrome do desconforto respiratório agudo, a tempestade de citocinas e a desregulação de neutrófilos (GUAN et al., 2020; WANG et al., 2020). Os programas de transcrição encontrados em subconjuntos de neutrófilos do sangue e pulmões de pacientes graves com COVID-19 estão relacionados à disfunção celular, coagulação e formação de NETs (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020; VERAS et al., 2020).

No presente estudo foi observado que neutrófilos de pacientes com COVID-19 grave estão ativados conforme relatado anteriormente (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). Também foi mostrado que NEU1 tem uma alta percentagem de expressão em neutrófilos do trato respiratório de pacientes com COVID-19 crítica, mas não nos convalescentes. O aumento da presença de NEU1 na membrana plasmática de neutrófilos também foi identificada. Ainda neutrófilos circulantes desses pacientes também apresentaram níveis diminuídos de ácidos siálicos de superfície, sugerindo um papel relevante de NEU para a patologia da COVID-19.

Interessantemente, o tratamento *ex vivo* com os inibidores da NEU Oseltamivir e Zanamivir regularam a densidade de ácidos siálicos e a superativação de neutrófilos de pacientes com COVID-19. Esses dados podem indicar que a inibição de NEU permitiu que sialiltransferases endógenas restaurem os resíduos desses carboidratos nos glicoconjugados de superfície. Mudanças rápidas do conteúdo de ácidos siálicos por sialidases e sialiltransferases parecem ser um mecanismo importante para controlar a resposta dos neutrófilos (RIFAT et al., 2008). Além disso, em neutrófilos não estimulados de doadores saudáveis ou de pacientes convalescentes, a inibição de NEU não interfere no estado de repouso ou não alterou o conteúdo de ácidos siálicos de membrana. É provável que a atividade basal de NEU não esteja envolvida na clivagem de ácidos siálicos em neutrófilos não ativados.

Para entender como neutrófilos se tornam superativados durante a COVID-19 estudos mostram que essas células podem ser estimuladas diretamente pelo SARS-CoV-

2 (VERAS et al., 2020), citocinas (WANG et al., 2020), e por alarminas, como o complexo S100A8/A9 (SILVIN et al., 2020), um ligante de TLR4 (VOGL et al., 2018). Concentrações elevadas de S100A8/A9 no soro parecem mediar o aparecimento de subpopulações de neutrófilos com um fenótipo relacionado a ativação celular, e também estão implicados com a gravidade e no mau prognóstico clínico da COVID-19 (CHEN et al., 2020; GUO et al., 2021).

A partir dos resultados encontrados por esse estudo é possível sugerir que a NEU solúvel, juntamente com outros fatores circulantes, também é responsável pela ativação de neutrófilos na COVID-19, à medida que mesmo na presença do plasma inativado pelo calor os efeitos atribuídos a NEU ainda acontecem, mesmo que reduzidos. Foi demonstrado aqui que a rh S100A8 é capaz de mimetizar os efeitos do LPS e induzir atividade sialidase. Considerando que durante a COVID-19 o aumento dos níveis circulantes de S100A8/A9 é dos fatores que definem a severidade da doença, é possível que esse complexo contribua fortemente para retroalimentação positiva da atividade de NEU e induza a superativação celular.

O uso terapêutico de inibidores da NEU para COVID-19, especialmente o Oseltamivir, tem sido abordado ao longo da pandemia e os desfechos clínicos associados ao tratamento parecem ser contraditórios. (TAN et al., 2020) mostraram que o uso clínico de Oseltamivir não melhorou os sintomas dos pacientes e não retardou a progressão da doença. Por outro lado, (LIU et al., 2020) realizaram um estudo de coorte em Wuhan (China) com 1190 participantes e apontou que o tratamento com Oseltamivir foi benéfico na COVID-19 e associado a uma diminuição do risco de morte em pacientes graves. Alguns estudos também sugerem como a progressão e o desfecho da doença podem ser melhorados em uma terapia combinada com o Oseltamivir (CHIBA, 2021; JIE et al., 2021; RAMATILLAH; ISNAINI, 2021; TAN et al., 2021).

Vários modelos animais foram propostos como alternativas para elucidar de forma pré-clínica a patogênese e possíveis candidatos para tratar a COVID-19, incluindo camundongos, furões, hamsters sírios e primatas (SHOU et al., 2021). A resistência de camundongos à infecção por SARS-CoV-2 levou ao estabelecimento de estratégias para adaptar esses roedores à infecção modificando o hospedeiro ou o vírus. Uma das estratégias mais comuns tem sido a infecção de camundongos transgênicos expressando

ACE2 humano (hACE2) (DINNON et al., 2020). No entanto, esses modelos animais em geral não conseguem reproduzir a pneumonia prolongada com manifestações graves e comprometimento de múltiplos órgãos, além de apresentar alta taxa de replicação do SARS-CoV-2 em tecidos não-alvo (BAO et al., 2020). Além disso, devido às diferenças interespecies, um conjunto de modelos é necessário para uma compreensão mais ampla do tropismo viral, replicação, disseminação, sinais clínicos, patogênese e resposta imune causada pelo SARS-CoV-2 (MUÑOZ-FONTELA et al., 2020).

O uso de outros betacoronavírus, como o coronavírus murino, foi sugerido como uma estratégia para mimetizar os principais aspectos da infecção por coronavírus humanos. Entre os coronavírus murinos, o grupo conhecido como coronavírus da hepatite murina (MHV) é o protótipo desse gênero e capaz de induzir uma doença grave e letal em camundongos e algumas de suas variantes podem apresentar tropismo pulmonar inicial quando inoculadas por via intranasal, antes da disseminação sistêmica se assemelhando a síndrome respiratória aguda grave evidenciada na COVID-19 (YANG et al., 2014; KÖRNER et al., 2020). Uma vantagem importante de usar este modelo murino é a exigência de nível de biossegurança 2 (BSL2), o que o torna significativamente menos oneroso e mais seguro para a triagem de compostos de interesse terapêutico (ANDRADE et al., 2021).

Camundongos C57BL/6J inoculados com MHV-3 desenvolvem uma resposta inflamatória robusta levando a lesões pulmonares agudas, incluindo edema alveolar, e hemorragia, prejudicando a função respiratória com aumento da frequência respiratória. Após a manifestação respiratória, a infecção pelo MHV-3 torna-se sistêmica e a carga viral pode ser detectada em múltiplos órgãos. A manifestação sistêmica é marcada pela queda acentuada do número de plaquetas e linfócitos circulantes bem como um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos e macrófagos/monócitos. Além disso, ocorre uma elevação da concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α , espelhando assim algumas características clínicas observadas em casos moderados e graves de COVID-19 (ANDRADE et al., 2021).

Por fim, os dados encontrados com neutrófilos humanos de pacientes com COVID-19 *ex vivo* foram correlacionados ao efeito do Oseltamivir *in vivo* mostrando que o tratamento de camundongos infectados com o betacoronavírus MHV-3 reduziu a carga

viral e diminuiu a infiltração de neutrófilos para os pulmões, conseqüentemente melhorando o dano tecidual. No entanto, para o estabelecimento dessa terapia, mais estudos serão necessários, e o uso *off-label* do Oseltamivir deve ser realizado com cautela e sob supervisão médica.

7. CONCLUSÃO

Coletivamente, os resultados contidos neste trabalho indicam que a ativação de NEU do hospedeiro, em especial NEU1, é dependente da interação com a MMP-9 na membrana celular de neutrófilos humanos estimulados com LPS. Uma vez ativada, NEU1 cliva ácidos siálicos de membrana levando a ativação celular e a consequente estimulação exacerbada da função de neutrófilos.

Em modelos experimentais de sepse em camundongos a inibição de NEU do hospedeiro regula a migração de neutrófilos para os focos infecciosos, melhorando o controle da infecção e a lesão tecidual, resultando em altas taxas de sobrevivência.

Em pacientes com COVID-19 grave a elevação da expressão e atividade de NEU1 também foi associada a desregulação da função de neutrófilos. Durante um modelo de inflamação pulmonar induzida por um betacoronavírus, semelhante a COVID-19 em humanos, a inibição de NEU também se mostrou benéfica a partir, pelo menos em parte, do controle da migração e danos induzidos por neutrófilos.

Esses achados destacam o papel de NEU como reguladores-chave das funções dos neutrófilos e sugerem o reposicionamento de inibidores já utilizados na clínica, a exemplo do Oseltamivir, como uma intervenção direcionada ao hospedeiro para regular as respostas dessas células durante a sepse e a COVID-19.

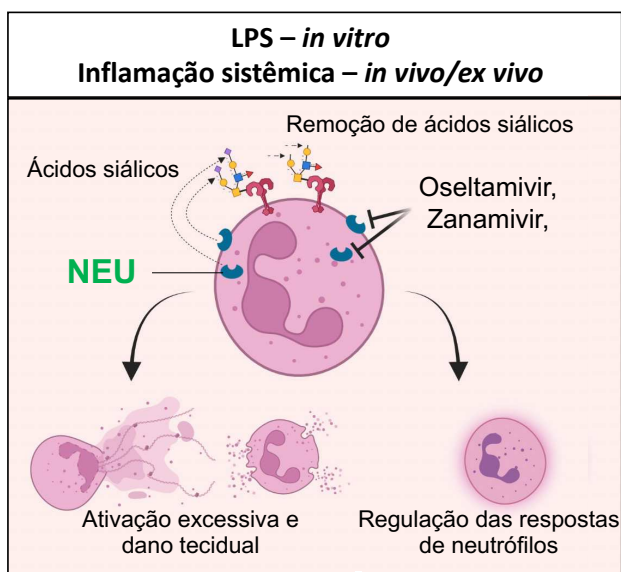


Figura 26. NEU endógenas na desregulação de neutrófilos durante a inflamação. Em contextos inflamatórios, sejam eles mimetizado *in vitro* na presença do LPS, *in vivo* em modelos animais de sepse ou até mesmo durante doenças virais como a COVID-19, o aumento da atividade de NEU ao clivar carboidratos de membrana leva ao aumento das funções citotóxicas de neutrófilos. A inibição farmacológica dessa enzima, por sua vez, parece regular a atividade dessas células e pode representar um novo alvo para desordens as quais a atividade excessiva de neutrófilos é um fator determinante para a patogênese. NEU = neuraminidases; LPS = lipopolissacarídeo.

REFERENCES

ABDULKHALEK, S., AMITH, S.R., FRANCHUK, S.L., JAYANTH, P., GUO, M., FINLAY, T., et al. (2011). Neu1 Sialidase and Matrix Metalloproteinase-9 Cross-talk Is Essential for Toll-like Receptor Activation and Cellular Signaling. **Journal of Biological Chemistry** 286: 36532– 36549.

ABDULKHALEK, S., SZEWCZUK, M.R. (2013). Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk regulates nucleic acid-induced endosomal TOLL-like receptor-7 and -9 activation, cellular signaling and pro-inflammatory responses. **Cell Signal.** 25(11):2093-105.

AHRQ Safety Program for Improving Antibiotic Use – Acute Care. (2019). Best Practices in the Diagnosis and Treatment of Sepsis. **Pub.** No. 17(20)-0028-EF.

ALAME, M.M., MASSAAD, E., AND ZARAKET, H. (2016). Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections. **Front Microbiol** 7: 450.

ALBOHY, A., MOHAN, S., ZHENG, R.B., PINTO, B.M., AND CAIRO, C.W. (2011). Inhibitor selectivity of a new class of oseltamivir analogs against viral neuraminidase over human neuraminidase enzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 19: 2817–2822.

ALBOHY, A., ZHANG, Y., SMUTOVA, V., PSHEZHETSKY, A.V., AND CAIRO, C.W. (2013). Identification of Selective Nanomolar Inhibitors of the Human Neuraminidase, NEU4. **ACS Med Chem Lett** 4: 532–537.

ALI, S.R., FONG, J.J., CARLIN, A.F., BUSCH, T.D., LINDEN, R., ANGATA, T., et al. (2014). Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. **J Exp Med** 211: 1231–1242.

ALLENDORF D.H., BROWN, G.C. (2022). Neu1 Is Released From Activated Microglia, Stimulating Microglial Phagocytosis and Sensitizing Neurons to Glutamate. **Front Cell Neurosci.** 26;16:917884.

ALLENDORF D.H., FRANSSSEN E.H., BROWN, G.C (2020). Lipopolysaccharide activates microglia via neuraminidase 1 desialylation of Toll-like Receptor 4. **J Neurochem.** 155(4):403-416.

ALMEIDA N.R.C. et al. (2022). Analysis of trends in sepsis mortality in Brazil and by regions from 2010 to 2019. **Rev. saúde pública** 56: 25.

ALVAREZ, Y., TANG, X., COLIGAN, J.E., AND BORREGO, F. (2008). The CD300a

(IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγR1a) mediated signaling. **Mol Immunol** 45: 253–258.

ALVES-FILHO, J.C., SPILLER, F., AND CUNHA, F.Q. (2010). Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock** 34 Suppl 1: 15–21.

AMITH, S.R., JAYANTH, P., FRANCHUK, S., FINLAY, T., SEYRANTEPE, V., BEYAERT, R., et al. (2010). Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-likereceptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. **Cell Signal** 22: 314–324.

AMITH, S.R., JAYANTH, P., FRANCHUK, S., SIDDIQUI, S., SEYRANTEPE, V., GEE, K., et al. (2009). Dependence of pathogen molecule-induced toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. **Glycoconj J** 26: 1197–1212.

ANDRADE, A.C.D.S.P., et al (2021). A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **J Virol** Oct27;95(22):e0127621.

ANDREAKOS, E., SACRE, S.M., SMITH, C., LUNDBERG, A., KIRIAKIDIS, S., STONEHOUSE, T., et al. (2004). Distinct pathways of LPS-induced NF-κB activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. **Blood** 103: 2229–2237.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022). Anvisa aprova uso emergencial do medicamento molnupiravir para Covid-19. Autorização Sanitária em 04/05/2022.

ARORA, D.J., AND HENRICHON, M. (1994). Superoxide anion production in influenza protein-activated NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. **J Infect Dis** 169: 1129–1133.

BANDARRA, D., BIDDLESTONE, J., MUDIE, S., MÜLLER, H.-A.J., AND ROCHA, S. (2015). HIF-1α restricts NF-κB-dependent gene expression to control innate immunity signals. **Dis Model Mech** 8: 169–181.

BAO, L. et al. (2020). The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. **Nature** 583:830–833.

BARTH, E., FISCHER, G., SCHNEIDER, E.M., WOLLMEYER, J., GEORGIEFF, M., AND WEISS, M. (2001). Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. **Cytokine** 14: 299–302.

BASSETTI, M., MONTERO, J.G., AND PAIVA, J.A. (2018). When antibiotic treatment

fails. **Intensive Care Med** 44: 73–75.

BEHNEN, M., LESCHCZYK, C., MÖLLER, S., BATEL, T., KLINGER, M., SOLBACH, W., et al. (2014). Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. **J Immunol** 193: 1954–1965.

BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. (2000). Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**. 182(1):214-23

BONTEN, E.J., CAMPOS, Y., ZAITSEV, V., NOURSE, A., WADDELL, B., LEWIS, W., et al. (2009). Heterodimerization of the Sialidase NEU1 with the Chaperone Protective Protein/cathepsin A Prevents its Premature Oligomerization. **J. Biol. Chem.** 284 (41), 28430–28441.

BORDON, J., ALIBERTI, S., FERNANDEZ-BOTRAN, R., URIARTE, S.M., RANE, M.J., DUVVURI, P., et al. (2013). Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. **Int J Infect Dis** 17: e76-83.

BRADLEY, L., et al. (2012). Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. **PLoS Pathogens** 8:.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D.S., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science** 303: 1532–1535.

BURAS, J., HOLZMANN, B. & SITKOVSKY, M. (2005). Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**. 4, 854–865.

BUSCHIAZZO, A., AND ALZARI, P.M. (2008). Structural insights into sialic acid enzymology. **Curr Opin Chem Biol** 12: 565–572.

BUTLER, C.C., VELDEN, A.W. VAN DER, BONGARD, E., SAVILLE, B.R., HOLMES, J., COENEN, S., et al. (2020). Oseltamivir plus usual care versus usual care for influenza-like illness in primary care: an open-label, pragmatic, randomised controlled trial. **Lancet** 395: 42–52.

CAIRO, C.W. (2014). Inhibitors of the human neuraminidase enzymes. **Med. Chem. Commun.** 5: 1067–1074.

CAMICIA, G., POZNER, R., AND DE LARRANAGA, G. (2014). Neutrophil extracellular traps in sepsis. **Shock** 42 (4), 286–294.

CARLIN, A.F., UCHIYAMA, S., CHANG, Y.-C., LEWIS, A.L., NIZET, V., AND VARKI, A. (2009). Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to

engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. **Blood** 113: 3333–3336.

CASBON, A., et al. (2009). Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome B localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950) 182:.

CASS, L.M., EFTHYMIPOULOS, C., AND BYE, A. (1999). Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. **Clin Pharmacokinet** 36 Suppl 1: 1–11.

CHANG, Y., et al. (2012). Leukocyte inflammatory responses provoked by pneumococcal sialidase. **MBio** 3:.

CHANG, Y.C., SEGAL, B.H., HOLLAND, S.M., MILLER, G.F., AND KWON-CHUNG, K.J. (1998). Virulence of catalase-deficient aspergillus nidulans in p47(phox)^{-/-} mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. **J Clin Invest** 101: 1843–1850.

CHEN L, DENG H, CUI H, FANG J, ZUO Z, DENG J, LI Y, WANG X, ZHAO L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs (2018). **Oncotarget**. 14;9(6):7204-7218.

CHEN, G.-Y., BROWN, N.K., WU, W., KHEDRI, Z., YU, H., CHEN, X., et al. (2014). Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. **Elife** 3: e04066.

CHEN, G.-Y., CHEN, X., KING, S., CAVASSANI, K.A., CHENG, J., ZHENG, X., et al. (2011). Preserving Sialic Acid-dependent Pattern Recognition by CD24-Siglec G Interaction for Therapy of Polybacterial Sepsis. **Nat Biotechnol** 29: 428–435.

CHEN, L., LONG, X., XU, Q., TAN, J., WANG, G., CAO, Y., et al. (2020). Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients. **Cell Mol Immunol** 17: 992–994.

CHIANG, C.-C., KORINEK, M., CHENG, W.-J., HWANG, T.-L. (2020). Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease. **Front Pharmacol**. 11:572009.

CHIBA, S. (2021). Effect of early oseltamivir on outpatients without hypoxia with suspected COVID-19. **Wien Klin Wochenschr** 133: 292–297.

CHIPUK, J.E., MOLDOVEANU, T., LLAMBI, F., PARSONS, M.J., AND GREEN, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. **Mol Cell** 37: 299–310.

CHISWICK, E. L., MELLA, J. R., BERNARDO, J., AND REMICK, D. G. (2015). Acute-phase deaths from murine polymicrobial sepsis are characterized by innate immune

suppression rather than exhaustion. **J Immunol**. 195 (8), 3793–3802.

CHOU, E.H., MANN, S., HSU, T.-C., HSU, W.-T., LIU, C.C.-Y., BHAKTA, T., et al. (2020). Incidence, trends, and outcomes of infection sites among hospitalizations of sepsis: A nationwide study. **PLoS One** 15: e0227752.

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., NAKADA, M.T., WILLIAMS, J., MULLER, W.A., AND DELISSER, H.M. (1997). Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. **J Immunol** 158: 4872–4878.

CHUA, R.L., LUKASSEN, S., TRUMP, S., HENNIG, B.P., WENDISCH, D., POTT, F., et al. (2020). COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nat Biotechnol** 38: 970–979.

COHEN, M., AND VARKI, A. (2010). The whole is far more than the sum of its parts. **OMICS** 14: 455–464.

COLONNA, M., SAMARIDIS, J., CELLA, M., ANGMAN, L., ALLEN, R.L., O'CALLAGHAN, C.A., et al. (1998). Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. **J Immunol** 160: 3096–3100.

CORREIA J.S., ULEVITCH, R.J (2002). MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. **J Biol Chem**. 18;277(3):1845-54.

CRENNELL, S.J., GARMAN, E.F., LAVER, W.G., VIMR, E.R., AND TAYLOR, G.L. (1993). Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90: 9852–9856.

CROSS, A.S., AND WRIGHT, D.G. (1991). Mobilization of sialidase from intracellular stores to the surface of human neutrophils and its role in stimulated adhesion responses of these cells. **J Clin Invest** 88: 2067–2076.

CROSS, A.S., SAKARYA, S., RIFAT, S., HELD, T.K., DRYSDALE, B.-E., GRANGE, P.A., et al. (2003). Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **J Biol Chem** 278: 4112–4120.

DA SILVA, J.S., HASEGAWA, T., MIYAGI, T., DOTTI, C.G., AND ABAD-RODRIGUEZ, J. (2005). Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. **Nat Neurosci** 8: 606–615.

DAIX, T., GUERIN, E., TAVERNIER, E., MERCIER, E., GISSOT, V., HERAULT, O., et al. (2018). Multicentric standardized flow cytometry routine assessment of patients with sepsis to predict clinical worsening. **Chest** 154 (3), 617–627.

DAVIES, B.E. (2010). Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations. **J Antimicrob Chemother** 65Suppl 2: ii5–ii10.

KLEIJN, S., LANGEREIS, J. D., LEENTJENS, J., KOX, M., NETEA, M. G., KOENDERMAN, L., et al. (2013). IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. **PLoS One** 8 (8), e72249.

DELABRANCHE, X. et al (2017). Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. **Shock**. 47(3):313-317.

DELANO, M. J., THAYER, T., GABRILOVICH, S., KELLY-SCUMPIA, K. M., WINFIELD, R. D., SCUMPIA, P. O., et al. (2011). Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. **J. Immunol.** 186 (1), 195–202.

DELEO, F., et al. (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. **The Journal of Clinical Investigation** 101:.

DEMARET, J., VENET, F., FRIGGERI, A., CAZALIS, M. A., PLASSAIS, J., JALLADES, L., et al. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. **J. Leukoc. Biol.** 98 (6), 1081–1090.

DIBBERT, B., WEBER, M., NIKOLAIZIK, W.H., VOGT, P., SCHÖNI, M.H., BLASER, K., et al. (1999). Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96: 13330–13335.

DINGJAN, I., LINDERS, P.T.A., BEKEROM, L. VAN DEN, BARANOV, M.V., HALDER, P., TER BEEST, M., et al. (2017). Oxidized phagosomal NOX2 complex is replenished from lysosomes. **J Cell Sci** 130: 1285–1298.

DINNON, K.H., et al. (2020). A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. **Nature** 586:560–566.

DUAN L, RAO X, SIGDEL KR (2019). Regulation of Inflammation in Autoimmune Disease. **J Immunol Res.** 28;2019:7403796.

DUBOIS, B., STARCKX, S., PAGENSTECHEER, A., OORD, J.V., ARNOLD, B., OPDENAKKER, G. (2002). Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. **Eur J Immunol.** 32(8):2163-71.

DUFFY, D., ROUILLY, V., LIBRI, V., HASAN, M., BEITZ, B., DAVID, M., et al. (2014). Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. **Immunity** 40: 436–450.

EL KEBIR, D., JÓZSEF, L., PAN, W., WANG, L., PETASIS, N.A., SERHAN, C.N., et al. (2009). 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of

acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 180: 311–319.

ENOKIZONO, Y., et al. (2013). Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USAmerica** 110:.

EYRE, D.W., et al. (2022). Effect of Covid-19 Vaccination on Transmission of Alpha and Delta Variants. **N Engl J Med** 386:744-756.

FANZANI, A., COLOMBO, F., GIULIANI, R., PRETI, A., AND MARCHESINI, S. (2004). Cytosolic sialidase Neu2 upregulation during PC12 cells differentiation. **FEBS Lett** 566: 178–182.

FAVIER, B. (2016). Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. **Immunol Rev** 273: 140–155.

FDA – Food and drug administration (2022). Know Your Treatment Options for COVID-19. Content current as of: 05/19/2022.

FENG, C., STAMATOS, N.M., DRAGAN, A.I., MEDVEDEV, A., WHITFORD, M., ZHANG, L., et al.(2012). Sialyl residues modulate LPS-mediated signaling through the Toll-like receptor 4 complex. **PLoS One** 7: e32359.

FENG, C., ZHANG, L., ALMULKI, L., FAEZ, S., WHITFORD, M., HAFEZI-MOGHADAM, A., et al.(2011). Endogenous PMN sialidase activity exposes activation epitope on CD11b/CD18 which enhances its binding interaction with ICAM-1. **J Leukoc Biol** 90: 313–321.

FLYNN, R.A., et al (2021). Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. **Cell** 10;184(12):3109-3124.e22.

FOREHAND, J.R., PABST, M.J., PHILLIPS, W.A., JOHNSTON, R.B. (1989). Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. **J Clin Invest** 83: 74–83.

FOX, E. D., HEFFERNAN, D. S., CIOFFI, W. G., AND REICHNER, J. S. (2013). Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. **Crit.Care** 17 (5), R226.

FOX, S., LEITCH, A.E., DUFFIN, R., HASLETT, C., AND ROSSI, A.G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **J Innate Immun** 2: 216–227.

FRANCHINI A.M., et al. (2013). FcγR-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. **The Journal of Biological Chemistry** 288:.

FUCHS, T., et al. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology** 176:.

FUJITA, M., HARADA, E., MATSUMOTO, T., MIZUTA, Y., IKEGAME, S., OUCHI, H., et al. (2010). Impaired host defence against *Mycobacterium avium* in mice with chronic granulomatous disease. **Clin Exp Immunol** 160: 457–460.

FUNAMI, K., SASAI, M., OSHIUMI, H., SEYA, T., AND MATSUMOTO, M. (2008). Homo- oligomerization is essential for Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptormolecule-1-mediated NF-kappaB and interferon regulatory factor-3 activation. **J BiolChem** 283: 18283–18291.

GAMBARDELLA, L., et al. (2013). Phosphoinositide 3-OH kinase regulates integrin-dependent processes in neutrophils by signaling through its effector ARAP3. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950) 190:.

GARCÍA-PARDO, A., OPDENAKKER, G. (2015). Non-proteolytic functions of matrix metalloproteinases in pathology and insights for the development of novel therapeutic inhibitors. **Metalloproteinases In Medicine**. 2:19-28.

GHOSH, S. (2020). Sialic acid and biology of life: An introduction. Sialic Acids and Sialoglycoconjugates. **Biology of Life, Health and Disease** 1–61.

GLANZ, V.Y., MYASOEDOVA, V.A., GRECHKO, A.V., AND OREKHOV, A.N. (2018). Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach. **Drug Des Devel Ther** 12: 3431–3437.

GLANZ, V.Y., MYASOEDOVA, V.A., GRECHKO, A.V., AND OREKHOV, A.N. (2019). Sialidase activity in human pathologies. **Eur J Pharmacol** 842: 345–350.

GOMES, N., et al. (2010). Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 43:.

GORDON, D.L., RICE, J.L., AND MCDONALD, P.J. (1989). Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Immunology** 67: 460–465.

GRANDEA, A.G., OLSEN, O.A., COX, T.C., RENSHAW, M., HAMMOND, P.W., CHAN-HUI, P.-Y., et al. (2010). Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107: 12658–12663.

GUAN, W., NI, Z., HU, Y., LIANG, W., OU, C., HE, J., et al. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **N Engl J Med** 382: 1708–1720.

GUNTEN, S. VON, S, Y., M, S., SM, J., T, S., R, S., et al. (2005). Siglec-9 transduces

apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. **Blood** 106:.

GUO, Q., ZHAO, Y., LI, J., LIU, J., YANG, X., GUO, X., et al. (2021). Induction of alarmin S100A8/A9 mediates activation of aberrant neutrophils in the pathogenesis of COVID-19. **Cell Host Microbe** 29: 222-235.e4.

GUO, T., DÄTWYLER, P., DEMINA, E., RICHARDS, M.R., GE, P., ZOU, C., et al. (2018). Selective Inhibitors of Human Neuraminidase 3. **J Med Chem** 61: 1990–2008.

GYAWALI, B., RAMAKRISHNA, K., AND DHAMOON, A.S. (2019). Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Med** 7: 2050312119835043.

HALBACH, J., et al. (2017). Why Antibiotic Treatment Is Not Enough for Sepsis Resolution: an Evaluation in an Experimental Animal Model. **Infect Immun** 85: e00664-17.

HANCOCK, R.E.W. (2020). The critical need for alternative approaches to address antibiotic treatment failure. REVIVE advancing antimicrobial R&D. This Viewpoint was originally published on the REVIVE website revive.gardp.org, an activity of the Global Antibiotic Research & Development Partnership (GARDP).

HARDUIN-LEPERS, A., VALLEJO-RUIZ, V., KRZEWINSKI-RECCHI, M.A., SAMYN-PETIT, B., JULIEN, S., DELANNOY, P. (2001). "The human sialyltransferase family". **Biochimie**. 83 (8): 727–37.

HASEGAWA, T., SUGENO, N., TAKEDA, A., MATSUZAKI-KOBAYASHI, M., KIKUCHI, A., FURUKAWA, K., et al. (2007). Role of Neu4L sialidase and its substrate ganglioside GD3 in neuronal apoptosis induced by catechol metabolites. **FEBS Letters** 581: 406–412.

HATA, K., KOSEKI, K., YAMAGUCHI, K., MORIYA, S., SUZUKI, Y., YINGSAKMONGKON, S., et al. (2008). Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases. **Antimicrob Agents Chemother** 52: 3484–3491.

HAXHO, F., HAQ, S., SZEWCZUK, M.R. (2018). Biased G protein-coupled receptor agonism mediates Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 crosstalk to induce transactivation of insulin receptor signaling. **Cell Signal**. 43:71-84.

HENRICKS, P.A., ERNE-VAN DER TOL, M.E. VAN, AND VERHOEF, J. (1982). Partial removal of sialic acid enhances phagocytosis and the generation of superoxide and chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol** 129: 745–750.

HEYWORTH, P.G., CURNUTTE, J.T., NAUSEEF, W.M., VOLPP, B.D., PEARSON, D.W., ROSEN, H., et al. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction

between p47-phox and cytochrome b558. **J Clin Invest** 87: 352–356.

HIDALGO, A. et al. (2002). Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. **The Journal of Clinical Investigation** 110:.

HONG, C.-W. (2017). Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. **Immune Net** 17: 298–306.

HOOGENDIJK, A. J., VAN VUGHT, L. A., WIEWEL, M. A., FUHLER, G. M., BELKASIM-BOHOUDI, H., HORN, J., et al. (2019). Kinase activity is impaired in neutrophils of sepsis patients. **Haematologica** 104 (6), e233–e235.

HU, J., VAN DEN STEEN, P.E., DILLEN, C., OPDENAKKER, G. (2005). Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. **Biochem Pharmacol.** 15;70(4):535-44.

HYUN, Y.H., et al. (2019). LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. **Experimental & Molecular Medicine** 51:.

ILAS - Instituto Latino Americano para Estudos da Sepse. (2020). Sepse: um problema de saúde pública. A atuação e colaboração da Enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença. 3ª edição, São Paulo, **COREN-SP**.

JACK, R.S., GRUNWALD, U., STELTER, F., WORKALEMAHU, G., AND SCHÜTT, C. (1995). Both membrane-bound and soluble forms of CD14 bind to gram-negative bacteria. **Eur J Immunol** 25: 1436–1441.

JAYANTH, P., AMITH, S.R., GEE, K., SZEWCZUK, M.R. (2010). Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for neurotrophin activation of Trk receptors and cellular signaling. **Cell Signal.** 22(8):1193-205.

JEONG, D., LEE, J., YI, Y.-S., YANG, Y., KIM, K.W., AND CHO, J.Y. (2013). p38/AP-1 pathway in lipopolysaccharide-by electrical stimulation. **Mediators Inflamm** 2013: 183042.

JIANG, Z., GEORGEL, P., DU, X., SHAMEL, L., SOVATH, S., MUDD, S., et al. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. **Nat Immunol** 6: 565–570.

JIE, X., HONGMEI, Y., PING, F., KUIKUI, Z., BOHAN, Y., RUI, M. (2021). Beneficial effect of Arbidol in the management of COVID-19 infection. **Aging (Albany NY)** 13: 9253–9264.

JONES, A.E., TRZECIAK, S., KLINE, J.A. (2009). The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of

hypoperfusion at the time of emergency department presentation. **Crit Care Med.** 37(5):1649-54.

KARLSSON, A., NIXON, J.B., AND MCPHAIL, L.C. (2000). Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Leukoc Biol** 67: 396–404.

KEMP, R.B. (1968). Effect of the removal of cell surface sialic acids on cell aggregation in vitro. **Nature** 218: 1255–1256.

KESHARI, R.S., VERMA, A., BARTHWAL, M.K., AND DIKSHIT, M. (2013). Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **J Cell Biochem** 114: 532–540.

KHAN, A., SERGI, C.M. (2022). NEU1-A Unique Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Front Pharmacol.** 29;13:902259.

KHATUA, B., BHATTACHARYA, K., AND MANDAL, C. (2012). Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. **J Leukoc Biol** 91: 641–655.

KIM, C.U., CHEN, X., AND MENDEL, D.B. (1999). Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents. **Antivir Chem Chemother** 10: 141–154.

KIMBALL, A.S., OBI, A.T., DIAZ, J.A., HENKE, P.K. (2016). The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. **Front Immunol.** 27;7:236.

KLOPF, J., BROSTJAN, C., EILENBERG, W., AND NEUMAYER, C. (2021). Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. **Int J Mol Sci** 22: E559.

KOPITZ, J., OEHLER, C., AND CANTZ, M. (2001). Desialylation of extracellular GD1a-neoganglioprotein suggests cell surface orientation of the plasma membrane-bound ganglioside sialidase activity in human neuroblastoma cells. **FEBS Letters** 491: 233–236.

KÖRNER, R.W., et al (2020). Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-COV-2. **Viruses** 12:880.

KOSEKI, K., et al. (2012). Human cytosolic sialidase NEU2-low general tissue expression but involvement in PC-3 prostate cancer cell survival. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 428:.

KOVACH MA, STANDIFORD TJ (2012). The function of neutrophils in sepsis. **Curr Opin Infect Dis.** 25(3):321-7.

KRISHNAMOORTHY, N., DOUDA, D.N., BRÜGGEMANN, T.R., RICKLEFS, I., DUVALL, M.G., ABDULNOUR, R.-E.E., et al. (2018). Neutrophil cytoplasts induce Th17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. **Sci Immunol** 3: eaao4747.

KURI-CERVANTES, L., PAMPENA, M.B., MENG, W., ROSENFELD, A.M., ITTNER, C.A.G., WEISMAN, A.R., et al. (2020). Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. **Sci Immunol** 5: eabd7114.

KUZMICH, N.N., SIVAK, K.V., CHUBAREV, V.N., POROZOV, Y.B., SAVATEEVA-LYUBIMOVA, T.N., PERI, F. (2017). TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines** (Basel) 5: E34.

LACY, P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: **Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology** 2:.

LAFORGE, M., ELBIM, C., FRERE, C., HEMADI, M., MASSAAD, C., NUSS, P., et al. (2020). Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. **Nat Rev Immunol** 515–516.

LAI, C., et al. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **Int J Antimicrob Agents** 55: 105924.

LANGEREIS, J.D. (2013). Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. **Cell Adh Migr** 7: 476–481.

LEE, S. K., KIM, S. D., KOOK, M., LEE, H. Y., GHIM, J., CHOI, Y., et al. (2015). Phospholipase D2 drives mortality in sepsis by inhibiting neutrophil extracellular trap formation and down-regulating CXCR2. **J. Exp. Med.** 212 (9), 1381–1390.

LEFKOWITZ, R. J., AND SHENOY, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science** 308 (5721), 512–517.

LEHMAN, H.K., AND SEGAL, B.H. (2020). The role of neutrophils in host defense and disease. **J Allergy Clin Immunol** 145: 1535–1544.

LEIDING, J.W. (2017). Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans. **Front Immunol** 8: 1009.

LEVINE, A. P., DUCHEN, M. R., DE VILLIERS, S., RICH, P. R., AND SEGAL, A. W. (2015). Alkalinity of neutrophil phagocytic vacuoles is modulated by HVCN1 and has consequences for myeloperoxidase activity. **PLoS One** 10 (4), e0125906.

LEWIS, A.J., SEYMOUR, C.W., ROSENGART, M.R. (2016). Current Murine Models of Sepsis. **Surg Infect** (Larchmt). 17(4):385-93.

LIANG, F., SEYRANTEPE, V., LANDRY, K., AHMAD, R., AHMAD, A., STAMATOS, N.M., et al. (2006). Monocyte differentiation up-regulates the expression of the lysosomal sialidase, Neu1, and triggers its targeting to the plasma membrane via major histocompatibility complex class II-positive compartments. **J Biol Chem** 281: 27526–27538.

LINDEGARDH, N., DAVIES, G.R., TRAN, T.H., FARRAR, J., SINGHASIVANON, P., DAY, N.P., WHITE, N.J. (2006). Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases. **Antimicrob Agents Chemother**. 50(9):3197-9.

LINDSEY, M., WEDIN, K., BROWN, M.D., KELLER, C., EVANS, A.J., SMOLEN, J., et al. (2001). Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. **Circulation** 103: 2181–2187.

LIPNIČANOVÁ, S., CHMELOVÁ, D., ONDREJOVIČ, M., FREČER, V., AND MIERTUŠ, S. (2020). Diversity of sialidases found in the human body - A review. **Int J Biol Macromol** 148: 857–868.

LIU, J., ZHANG, S., WU, Z., SHANG, Y., DONG, X., LI, G., et al. (2020). Clinical outcomes of COVID-19 in Wuhan, China: a large cohort study. **Ann Intensive Care** 10: 99.

LIU, M., BEDOUHENE, S., HURTADO-NEDELEC, M., PINTARD, C., DANG, P.M.-C., YU, S., et al. (2019). The Prolyl Isomerase Pin1 Controls Lipopolysaccharide-Induced Priming of NADPH Oxidase in Human Neutrophils. **Front Immunol** 10: 2567.

LIZCANO, A., SECUNDINO, I., DÖHRMANN, S., CORRIDEN, R., ROHENA, C., DIAZ, S., et al. (2017). Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation. **Blood** 129: 3100–3110.

LLOYD-JONES, K.L., KELLY, M.M., AND KUBES, P. (2008). Varying importance of soluble and membrane CD14 in endothelial detection of lipopolysaccharide. **J Immunol** 181: 1446–1453.

LÖFGREN, R., SERRANDER, L., FORSBERG, M., WILSSON, Å., WASTESON, Å., AND STENDAHL, O. (1999). CR3, FcγRIIA and FcγRIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research** 1452: 46–59.

LOWELL, C.A. (2011). Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 3: a002352.

MANDAL, C., et al. (2010). Down regulation of membrane-bound Neu3 constitutes a new potential marker for childhood acute lymphoblastic leukemia and induces

apoptosis suppression of neoplastic cells. *International Journal of Cancer* 126:.

MANZ, M. G., AND BOETTCHER, S. (2014). Emergency granulopoiesis. **Nat. Rev. Immunol.** 14 (5), 302–314.

MÁRQUEZ-DOMÍNGUEZ, L., REYES-LEYVA, J., HERRERA-CAMACHO, I., SANTOS-LÓPEZ, G., AND SCIOR, T. (2020). Five Novel Non-Sialic Acid-Like Scaffolds Inhibit In Vitro H1N1 and H5N2 Neuraminidase Activity of Influenza A Virus. **Molecules** 25: E4248.

MARTIN, E. L., SOUZA, D. G., FAGUNDES, C. T., AMARAL, F. A., ASSENZIO, B., PUNTORIERI, V., et al. (2010). Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 182 (6), 762–773.

MARTÍNEZ, M.L., PLATA-MENCHACA, E.P., RUIZ-RODRÍGUEZ, J.C., FERRER, R. (2020). An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. **J Thorac Dis.** 12(3):1007-1021.

MASURE, S., PROOST, P., VAN DAMME, J. AND OPDENAKKER, G., Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. **Eur. J. Biochem.** 1991. 198: 391–398.

MAUGERI, N., CAMPANA, L., GAVINA, M., COVINO, C., DE METRIO, M., PANCIROLI, C., et al. (2014). Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. **J Thromb Haemost** 12: 2074–2088.

MAURICE, P., BAUD, S., BOCHAROVA, O.V., BOCHAROV, E.V., KUZNETSOV, A.S., KAWECKI, C., et al. (2016). New Insights into Molecular Organization of Human Neuraminidase-1: Transmembrane Topology and Dimerization Ability. **Sci Rep** 6: 38363.

MCMILLAN, S., et al. (2013). Siglec-E is a negative regulator of acute pulmonary neutrophil inflammation and suppresses CD11b β 2-integrin-dependent signaling. **Blood** 121:.

MEDZHITOV, R (2021). The spectrum of inflammatory responses. **Science.** 26;374(6571):1070-1075.

MEESMANN, H.M., et al. (2010). Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. **J Cell Sci.** 1;123(Pt 19):3347-56.

MEIZLISH, M.L., et al. (2021). A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. **Blood Adv**, 5(5):1164–77.

- MESSERER, et al. (2020). Animal-Free Human Whole Blood Sepsis Model to Study Changes in Innate Immunity. **Frontiers in Immunology** 11:.
- METZLER, K., et al. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood** 117:.
- MISHRA, M., BYRD, M. S., SERGEANT, S., AZAD, A. K., PARSEK, M. R., MCPHAIL, L., et al.(2012). Pseudomonas aeruginosa Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. **Cell Microbiol.**14 (1), 95–106.
- MIYAGI, T., AND YAMAGUCHI, K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology** 22:.
- MOGENSEN, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev** 22: 240–273.
- MONTI, E., BONTEN, E., D'AZZO, A., BRESCIANI, R., VENERANDO, B., BORSANI, G., et al. (2010). Sialidases in vertebrates: a family of enzymes tailored for several cell functions. **Adv Carbohydr Chem Biochem** 64: 403–479.
- MORISE, Z., EPPIHIMER, M., GRANGER, D.N., ANDERSON, D.C., GRISHAM, M.B. (1999). Effects of lipopolysaccharide on endothelial cell adhesion molecule expression in interleukin-10 deficient mice. **Inflammation** 23: 99–110.
- MOSCONA, A. (2005). Neuraminidase Inhibitors for Influenza. **New England Journal of Medicine** 353: 1363–1373.
- MOUSSEAU, D.D., BANVILLE, D., L'ABBÉ, D., BOUCHARD, P., AND SHEN, S.H. (2000). PILRalpha, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpartPILRbeta. **J Biol Chem** 275: 4467–4474.
- MOUSTAFA, I., et al. (2004). Sialic acid recognition by Vibrio cholerae neuraminidase. **The Journal of Biological Chemistry** 279:.
- MOUTINHO, S. (2021). Brazilian town experiment shows mass vaccination can wipe out COVID-19. **Science**. 10. j7815.
- MUÑOZ-FONTELA, C., et al. (2020). Animal models for COVID-19. **Nature** 586:509–515.
- NAN, X., I, C., NM, S. (2007). Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN-gamma. **Journal of Leukocyte Biology** 81:.
- NAUSEEF, W.M. (2019). The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling. **Curr Opin Immunol** 60: 130–140.

NEUMANN, K., CASTIÑEIRAS-VILARIÑO, M., HÖCKENDORF, U., HANNESSCHLÄGER, N., LEMEER, S., KUPKA, D., et al. (2014). Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. **Immunity** 40: 389–399.

NGUYEN, G.T., GREEN, E.R., MECSAS, J. (2017). Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Front Cell Infect Microbiol** 7: 373.

NIEMIEC, M.J. et al (2015). Trace element landscape of resting and activated human neutrophils on the sub-micrometer level. **Metallomics**. 7(6):996-1010.

NILSSON, M., et al. (2005). Critical role for complement receptor 3 (CD11b/CD18), but not for Fc receptors, in killing of *Streptococcus pyogenes* by neutrophils in human immune serum. **European Journal of Immunology** 35:.

NOVA, Z., SKOVIEROVA, H., AND CALKOVSKA, A. (2019). Alveolar-Capillary Membrane- Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. **Int J Mol Sci** 20: E831.

PAEMEN, L., JANSEN, P. M., PROOST, P., VAN DAMME, J., OPDENAKKER, G., HACK, E. AND TAYLOR, F. B. (1997) Induction of gelatinase B and MCP-2 in baboons during sublethal and lethal bacteraemia. **Cytokine** 9: 412–415.

PANASENKO, O.M., CHEKANOV, A.V., ARNHOLD, J., SERGIENKO, V.I., OSIPOV, A.N., AND VLADIMIROV, Y.A. (2005). Generation of free radicals during decomposition of hydroperoxide in the presence of myeloperoxidase or activated neutrophils. **Biochemistry(Mosc)** 70: 998–1004.

PAPAYANNOPOULOS, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nat Rev Immunol** 18: 134–147.

PARK, B., et al. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature** 458:.

PARK, I., et al. (2019). Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. **The European Respiratory Journal** 53:.

PARKER, E.P.K., et al. (2022). Response to additional COVID-19 vaccine doses in people who are immunocompromised. **The lancet** 10 (21)00593-3.

PAWAR, R.D., SHIH, J.A., BALAJI, L., GROSSESTREUER, A.V., PATEL, P.V., HANSEN, C.K., DONNINO, M.W., MOSKOWITZ, A. (2021). Variation in SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) Score Performance in Different Infectious States. **J Intensive Care Med**. 36(10):1217-1222.

PEDERSEN, C.C., BORUP, R., FISCHER-NIELSEN, A., MORA-JENSEN, H., FOSSUM, A., COWLAND, J.B., et al. (2016). Changes in Gene Expression during G-

CSF-Induced Emergency Granulopoiesis in Humans. **J Immunol** 197: 1989–1999.

PEETERS, P., RYAN, K., KARVE, S., POTTER, D., BAELEN, E., ROJAS-FARRERAS, S., et al. (2019). The impact of initial antibiotic treatment failure: real-world insights in patients with complicated, health care-associated intra-abdominal infection. **IDR** 12: 329–343.

PETERS, A.M. (1998). Just how big is the pulmonary granulocyte pool? **Clin Sci (Lond)** 94: 7–19.

PETRI, B., PHILLIPSON, M., AND KUBES, P. (2008). The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J Immunol** 180: 6439–6446.

PIETERSE, E., ROTHER, N., YANGINLAR, C., HILBRANDS, L.B., VLAG, J. VAN DER (2016). Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. **Front Immunol** 7: 484.

PILLAY, J., KAMP, V. M., VAN HOFFEN, E., VISSER, T., TAK, T., LAMMERS, J. W., et al. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **J. Clin. Invest.** 122 (1), 327–336.

PILSCZEK, F.H., SALINA, D., POON, K.K.H., FAHEY, C., YIPP, B.G., SIBLEY, C.D., et al. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol** 185: 7413–7425.

PINHO, V., RUSSO, R.C., CASTRO RUSSO, R. DE, AMARAL, F.A., SOUSA, L.P. DE, BARSANTE, M.M., et al. (2007). Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. **J Immunol** 179: 7891–7898.

POLLOCK, J.D., et al. (1995). Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. **Nature Genetics** 9:.

PSHEZHETSKY, A.V., HINEK, A. (2011). Where catabolism meets signalling: neuraminidase 1 as a modulator of cell receptors. **Glycoconj J** 28: 441–452.

PV, V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS** 59:.

RADA, B., HABLY, C., MECZNER, A., TIMÁR, C., LAKATOS, G., ENYEDI, P., et al. (2008). Role of Nox2 in elimination of microorganisms. **Semin Immunopathol** 30: 237–253.

RAGHAVAN, P., G V, P. (2019). Metadichol ® a Novel Sialidase Inhibitor. **Stem Cell Research & Therapy** 9: 1000449.

RAMACHANDRAN, V., YAGO, T., EPPERSON, T.K., KOBZDEJ, M.M., NOLLERT, M.U., CUMMINGS, R.D., et al. (2001). Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 10166– 10171.

RAMATILLAH, D.L., AND ISNAINI, S. (2021). Treatment profiles and clinical outcomes of COVID-19 patients at private hospital in Jakarta. **PLoS One** 16: e0250147.

RASHMI, R., BODE, B.P., PANESAR, N., KING, S.B., RUDLOFF, J.R., GARTNER, M.R., et al. (2009). Siglec-9 and SHP-1 are differentially expressed in neonatal and adult neutrophils. **Pediatr Res** 66: 266–271.

RAVICHANDRAN, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. **J Exp Med** 207: 1807–1817.

RAY, P.D., et al. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling** 24:.

REILY, C., STEWART, T.J., RENFROW, M.B., NOVAK, J (2019). Glycosylation in health and disease. **Nat Rev Nephrol**. 15(6):346-366.

RESMAN, N., VASL, J., OBLAK, A., PRISTOVSEK, P., GIOANNINI, T.L., WEISS, J.P., et al. (2009). Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin. **J Biol Chem** 284: 15052–15060.

RHODES, A., et al. (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine** 43:.

RIFAT, S., KANG, T.J., MANN, D., ZHANG, L., PUCHE, A.C., STAMATOS, N.M., et al. (2008). Expression of sialyltransferase activity on intact human neutrophils. **J Leukoc Biol** 84: 1075–1081.

RIOS-SANTOS, F., ALVES-FILHO, J.C., SOUTO, F.O., SPILLER, F., FREITAS, A., LOTUFO, C.M., SOARES, M.B., DOS SANTOS, R.R., TEIXEIRA, M.M., CUNHA, F.Q. (2006). Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase- derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**. 1;175(5):490-7.

RITTIRSCH, D., HUBER-LANG, M.S., FLIERL, M.A., WARD, P.A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc** 4: 31–36.

Rohrbach, A.S., Slade, D.J., Thompson, P.R., and Mowen, K.A. (2012). Activation of PAD4 in NET formation. **Front Immunol** 3: 360.

ROSALES, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Frontiers in Physiology** 9:.

ROSSI, A.G., SAWATZKY, D.A., WALKER, A., WARD, C., SHELDRAKE, T.A., RILEY, N.A., et al. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med* 12: 1056–1064.

RUDD, K.E., et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 18;395(10219):200-211.

RUIZ, S., VARDON-BOUNES, F., MERLET-DUPUY, V. et al. (2016). Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *ICMx* 4, 22.

SAKARYA, S., et al. (2004). Mobilization of neutrophil sialidase activity desialylates the pulmonary vascular endothelial surface and increases resting neutrophil adhesion to and migration across the endothelium. *Glycobiology* 14:.

SANTOS, S. S., BRUNIALTI, M. K., RIGATO, O., MACHADO, F. R., SILVA, E., AND SALOMAO, R. (2012). Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 38 (1), 18–23.

SAWATZKY, D.A., WILLOUGHBY, D.A., COLVILLE-NASH, P.R., AND ROSSI, A.G. (2006). The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation in vivo. *Am J Pathol* 168: 33–41.

SCHAUER, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40: 131–234.

SCHAUER, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 19: 507–514.

SCHULTE-SCHREPPING, J., REUSCH, N., PACLIK, D., BAßLER, K., SCHLICKEISER, S., ZHANG, B., et al. (2020). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 182: 1419-1440.e23.

SEYRANTEPE, V., IANNELLO, A., LIANG, F., KANSHIN, E., JAYANTH, P., SAMARANI, S., et al. (2010). Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. *J Biol Chem* 285: 206–215.

SEYRANTEPE, V., LANDRY, K., TRUDEL, S., HASSAN, J.A., MORALES, C.R., AND PSHEZHETSKY, A.V. (2004). Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *J Biol Chem* 279: 37021– 37029.

SHEN, X. F., CAO, K., JIANG, J. P., GUAN, W. X., DU, J. F. (2017a). Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J. Cell Mol. Med.* 21 (9), 1687–1697.

SHEN, X., CAO, K., ZHAO, Y., AND DU, J. (2021). Targeting Neutrophils in Sepsis: From Mechanism to Translation. **Front Pharmacol** 12: 644270.

SHORR, A.F., MICEK, S.T., WELCH, E.C., DOHERTY, J.A., REICHLEY, R.M., AND KOLLEF, M.H.(2011). Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital lengthof stay. *Crit Care Med* 39: 46–51.

SHOU, S., et al (2020). Animal Models for COVID-19: Hamsters, Mouse, Ferret, Mink, Tree Shrew, and Non-human Primates. **Front Microbiol.** Aug 31;12:626553.

SHOUKAT, A. et al. (2021). Lives saved and hospitalizations averted by COVID-19 vaccination in New York City: a modeling study. **The Lancet.** 10. 100085.

SILVIN, A., CHAPUIS, N., DUNSMORE, G., GOUBET, A.-G., DUBUISSON, A., DEROSA, L., et al. (2020). Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. **Cell** 182: 1401-1418.e18.

SMUTOVA, V., ALBOHY, A., PAN, X., KORCHAGINA, E., MIYAGI, T., BOVIN, N., et al. (2014). Structural Basis for Substrate Specificity of Mammalian Neuraminidases. **PLoS One** 9: e106320.

SOLLBERGER, G., CHOIDAS, A., BURN, G.L., HABENBERGER, P., DI LUCREZIA, R., KORDES, S., et al. (2018). Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. **Sci Immunol** 3: eaar6689.

SORDI, R., MENEZES-DE-LIMA, O., DELLA-JUSTINA, A.M., REZENDE, E., ASSREUY, J. (2013). Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **Int J Exp Pathol.** 94(2):144-55.

SOUTO, F.O., ALVES-FILHO, J.C., TURATO, W.M., AUXILIADORA-MARTINS, M., BASILE-FILHO, A., CUNHA, F.Q. (2011). Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2011 15;183(2):234-42.

SPEYER, C.L., WARD, P.A. (2011). Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation. **J Invest Surg** 24: 18–27.

SPILLER, F., CARLOS, D., SOUTO, F.O., FREITAS, A. DE, SOARES, F.S., VIEIRA, S.M., et al. (2012). α 1-Acid glycoprotein decreases neutrophil migration and increases susceptibility to sepsis in diabetic mice. **Diabetes** 61: 1584–1591.

SPILLER, F., OLIVEIRA FORMIGA, R., FERNANDES DA SILVA COIMBRA, J., ALVES-FILHO, J.C., CUNHA, T.M., AND CUNHA, F.Q. (2019). Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide** 89: 32–40.

SPILLER, F., ORRICO, M.I.L., NASCIMENTO, D.C., CZAIKOSKI, P.G., SOUTO, F.O.,

ALVES- FILHO, J.C., et al. (2010). Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K⁺ATP channel activation. **Am J Respir Crit Care Med** 182: 360–368.

SUGAYA, N., AND OHASHI, Y. (2010). Long-Acting Neuraminidase Inhibitor Laninamivir Octanoate (CS-8958) versus Oseltamivir as Treatment for Children with Influenza Virus Infection. **Antimicrob Agents Chemother** 54: 2575–2582.

SUMMERS, C., SM, R., AM, C., N, S., AM, P., AND ER, C. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology** 31:.

SUNDARARAJ, K., RODGERS, J., ANGEL, P., WOLF, B., NOWLING, T.K (2021). The role of neuraminidase in TLR4-MAPK signalling and the release of cytokines by lupus serum- stimulated mesangial cells. **Immunology**. 162(4):418-433.

SURMI, B.K., AND HASTY, A.H. (2010). The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. **Vascul Pharmacol** 52: 27–36.

SUZUKI, H., T, K., K, K. (1982). Effects of neuraminidase on O₂ consumption and release of O₂ and H₂O₂ from phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes. **Blood** 60:.

SWANSON, J.A., HOPPE, A.D. (2004). The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. **J Leukoc Biol** 76: 1093–1103.

TAN, J., YUAN, Y., XU, C., SONG, C., LIU, D., MA, D., et al. (2021). A retrospective comparison of drugs against COVID-19. **Virus Res** 294: 198262.

TAN, Q., DUAN, L., MA, Y., WU, F., HUANG, Q., MAO, K., et al. (2020). Is oseltamivir suitable for fighting against COVID-19: In silico assessment, in vitro and retrospective study. **Bioorg Chem** 104: 104257.

TANG, D., KANG, R., COYNE, C.B., ZEH, H.J., AND LOTZE, M.T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunol Rev** 249: 158–175.

TAVARES-MURTA, B.M., MACHADO, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. (2001). Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**. 25(4):247-53.

TRAVING, C., AND SCHAUER, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS** 54:.

TURINA, M., MILLER, F.N., MCHUGH, P.P., CHEADLE, W.G., AND POLK, H.C. (2005). Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. **Inflammation** 29:55–63.

VALAPERTA, R., CHIGORNO, V., BASSO, L., PRINETTI, A., BRESCIANI, R., PRETI,

A., et al. (2006). Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. **FASEB J** 20: 1227–1229.

VALKOV, E., STAMP, A., DIMAIO, F., BAKER, D., VERSTAK, B., ROVERSI, P., et al. (2011). Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. **Proc Natl Acad Sci U S A** 108: 14879–14884.

VARGHESE, J., et al. (1992). The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. **Proteins** 14:.

VARKI, A., SCHNAAR, R.L., SCHAUER, R. (2015). Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, et al., eds. Cold Spring Harbor (NY): **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.

VERAS, F.P., PONTELLI, M.C., SILVA, C.M., TOLLER-KAWAHISA, J.E., LIMA, M. DE, NASCIMENTO, D.C., et al. (2020). SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **J Exp Med** 217: e20201129.

VIMR, E.R., TROY, F.A. (1985). Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (nan) in *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 164: 845–853.

VINOGRADOVA, M.V., MICHAUD, L., MEZENTSEV, A.V., LUKONG, K.E., EL-ALFY, M., MORALES, C.R., et al. (1998). Molecular Mechanism of Lysosomal Sialidase Deficiency in Galactosialidosis Involves its Rapid Degradation. **Biochem. J.** 330 (Pt 2), 641–650.

VOGL, T., STRATIS, A., WIXLER, V., VÖLLER, T., THURAINAYAGAM, S., JORCH, S.K., et al. (2018). Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. **J Clin Invest** 128: 1852–1866.

WALBAUM, S., et al. (2021). Complement receptor 3 mediates both sinking phagocytosis and phagocytic cup formation via distinct mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry** 296:.

WAN, Y., et al. (1995). Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. **Infection and Immunity** 63:.

WANG, C., DENG, L., HONG, M., AKKARAJU, G.R., INOUE, J., AND CHEN, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature** 412: 346–351.

WANG, J., JIANG, M., CHEN, X., AND MONTANER, L.J. (2020). Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **J**

Leukoc Biol 108: 17–41.

WANG, X., LUO, F., AND ZHAO, H. (2014). Paraquat-induced reactive oxygen species inhibit neutrophil apoptosis via a p38 MAPK/NF- κ B-IL-6/TNF- α positive-feedback circuit. **PLoS One** 9: e93837.

WARNATSCH, A., M, I., Q, W., AND V, P. (2015). Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. **Science** (New York, N.Y.) 349:.

WATSON, O.J., BARNESLEY, G., TOOR, J., HOGAN, A.B., WINSKILL, P., GHANI, A.C. (2022). Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. **Lancet Infect Dis**. 23:S1473-3099(22)00320-6.

WATSON, R.W., O'NEILL, A., BRANNIGAN, A.E., BRANNIGAN, A.E., COFFEY, R., MARSHALL, J.C., et al. (1999). Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. **FEBS Lett** 453: 67–71.

WIELGAT, P., ROGOWSKI, K., NIEMIROWICZ-LASKOWSKA, K., AND CAR, H. (2020). Sialic Acid-Siglec Axis as Molecular Checkpoints Targeting of Immune System: Smart Players in Pathology and Conventional Therapy. **International Journal of Molecular Sciences** 21:.

WILK, A.J., LEE, M.J., WEI, B., PARKS, B., PI, R., MARTÍNEZ-COLÓN, G.J., et al. (2021). Multi-omic profiling reveals widespread dysregulation of innate immunity and hematopoiesis in COVID-19. **J Exp Med** 218: e20210582.

WITKO-SARSAT, V. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80:.

WORONOWICZ, S.R. AMITH, K. DE VUSSER, W. LAROY, R. CONTRERAS, S. BASTA, M.R. SZEWCZUK, S. (2007). **Glycobiology** 17 (1) 10.

WORTHEN, G.S., SCHWAB, B., ELSON, E.L., DOWNEY, G.P. (1989). Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. **Science** 245: 183– 186.

WU, F., TYML, K., AND WILSON, J.X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology** 217:.

YAMANAMI, H., SHIOZAKI, K., WADA, T., YAMAGUCHI, K., UEMURA, T., KAKUGAWA, Y., et al. (2007). Down-regulation of sialidase NEU4 may contribute to invasive properties of human colon cancers. **Cancer Science** 98: 299–307.

YANG, W.H., HEITHOFF, D.M., AZIZ, P.V., HASLUND-GOURLEY, B., WESTMAN, J.S., NARISAWA, S., et al. (2018). Accelerated Aging and Clearance of Host Anti-

inflammatory Enzymes by Discrete Pathogens Fuels Sepsis. **Cell Host & Microbe** 24: 500-513.e5.

YANG, Z., et al. (2014). Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. **Virology** 29:393–402.

YAO, B., LIU, W., LIU, D., XING, J., AND ZHANG, L. (2020). Usefulness of sialic acid for diagnosis of sepsis in critically ill patients: a retrospective study. **BMC Anesthesiology** 20: 277.

YIPP, B., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nature Medicine** 18:.

YOGALINGAM, G., BONTEN, E.J., VLEKKERT, D. VAN DE, HU, H., MOSHIACH, S., CONNELL, S.A., et al. (2008). Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. **Developmental Cell** 15: 74–86.

ZENG, M.Y., MIRALDA, I., ARMSTRONG, C.L., URIARTE, S.M., AND BAGAITKAR, J. (2019). Roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. **Molecular Oral Microbiology** 34: 27–38.

ZHANG, B., et al. (2003). Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. **The Journal of Biological Chemistry** 278:.

ZHANG, X.-H., WANG, Q.-M., ZHANG, J.-M., FENG, F.-E., WANG, F.-R., CHEN, H., et al. (2015). Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. **J Hematol Oncol** 8: 116.

ZHANG, Y., HOPPE, A.D., AND SWANSON, J.A. (2010). Coordination of Fc receptor signaling regulates cellular commitment to phagocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107: 19332–19337.

ZHAO, S., CHEN, F., YIN, Q., WANG, D., HAN, W., AND ZHANG, Y. (2020). Reactive oxygen species interact with NLRP3 inflammasomes and are involved in the inflammation of sepsis: from mechanism to treatment of progression. **Front. Physiology** 11, 571810.

ZIEGLER, C.S., BOUCHAB, L., TRAMIER, M., DURAND, D., FIESCHI, F., DUPRE-CROCHET, S., et al. (2019). Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. **J Biol Chem** 294: 3824–3836.

ANEXO A

Características demográficas e clínicas dos doadores saudáveis incluídos no estudo

Características demográficas e clínicas na inclusão

Gênero (Masculino/Feminino)	21/16
Idade (Anos, Mediana (IQR))	46 (18 - 64)
Eventos inflamatórios recentes	0 (0%)
Fumantes domésticos	2 (5.7%)

Dados laboratoriais na inclusão

Hemoglobina (g/dL, Mediana (IQR))	17.2 (14.2 – 19.3)
Hematócrito (% , Mediana (IQR))	43.8 (38.5 – 49.6)
Leucócitos (/mm ³ , Mediana (IQR))	5312 (1002 – 5992)
Neutrófilos (/mm ³ , Mediana (IQR))	4541 (1992 – 5392)
Linfócitos (/mm ³ , Mediana (IQR))	4932 (3002 – 6392)
Monócitos (/mm ³ , Mediana (IQR))	612 (413 – 702)
Plaquetas (10 ³ /mm ³ , Mediana (IQR))	571 (302 – 643)

IQR: interquartile range

ANEXO B

Características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes com COVID-19 incluídos no estudo

Características demográficas e clínicas na inclusão

Gênero (Masculino/Feminino)	18/10
Idade (Anos, Mediana (IQR))	68 (25 - 84)
Obesidade (n, (%))	6 (21.4%)
Diabetes (n, (%))	10 (35.7%)
Câncer (n, (%))	4 (14.2%)
Imunodepressão (n, (%))	5 (17.8%)
Duração da Hospitalização durante a inclusão (Dias, mediana (IQR))	4.5 (2.25 – 6.75)
Duração dos sintomas antes da inclusão (Dias, mediana (IQR))	12 (10.25 – 15.13)
Duração do tratamento com dexametasona (Dias, mediana (IQR))	5 (2.25 – 6)

Gravidade durante a hospitalização

Fluxo de oxigênio máximo <3L/mn	14 (50%)
Fluxo de oxigênio máximo >3L/mn	8 (28.6%)
Necessidade de fluxo de oxigênio nasal (n, (%))	6 (21.4%)
Alta extra-hospitalar	6 (27.3%)

Morte	7 (25%)
-------	---------

Tempo de hospitalização (Dias, mediana (IQR))	14 (8.25 – 27.25)
---	-------------------

Dados laboratoriais na inclusão

Hemoglobina (g/dL, Mediana (IQR))	14.1 (11.25 – 15.8)
-----------------------------------	---------------------

Hematócrito (% , Mediana (IQR))	39.2 (32.6 – 41.13)
---------------------------------	---------------------

Leucócitos(/mm ³ , Mediana (IQR))	8214 (3995 – 11660)
--	---------------------

Neutrófilos (/mm ³ , Mediana (IQR))	7214 (2956 – 11225)
--	---------------------

Linfócitos (/mm ³ , Mediana (IQR))	1385 (565 – 3224)
---	-------------------

Monócitos (/mm ³ , Mediana (IQR))	415 (168 – 975)
--	-----------------

Plaquetas (10 ³ /mm ³ , Mediana (IQR))	222 (117 – 444)
--	-----------------

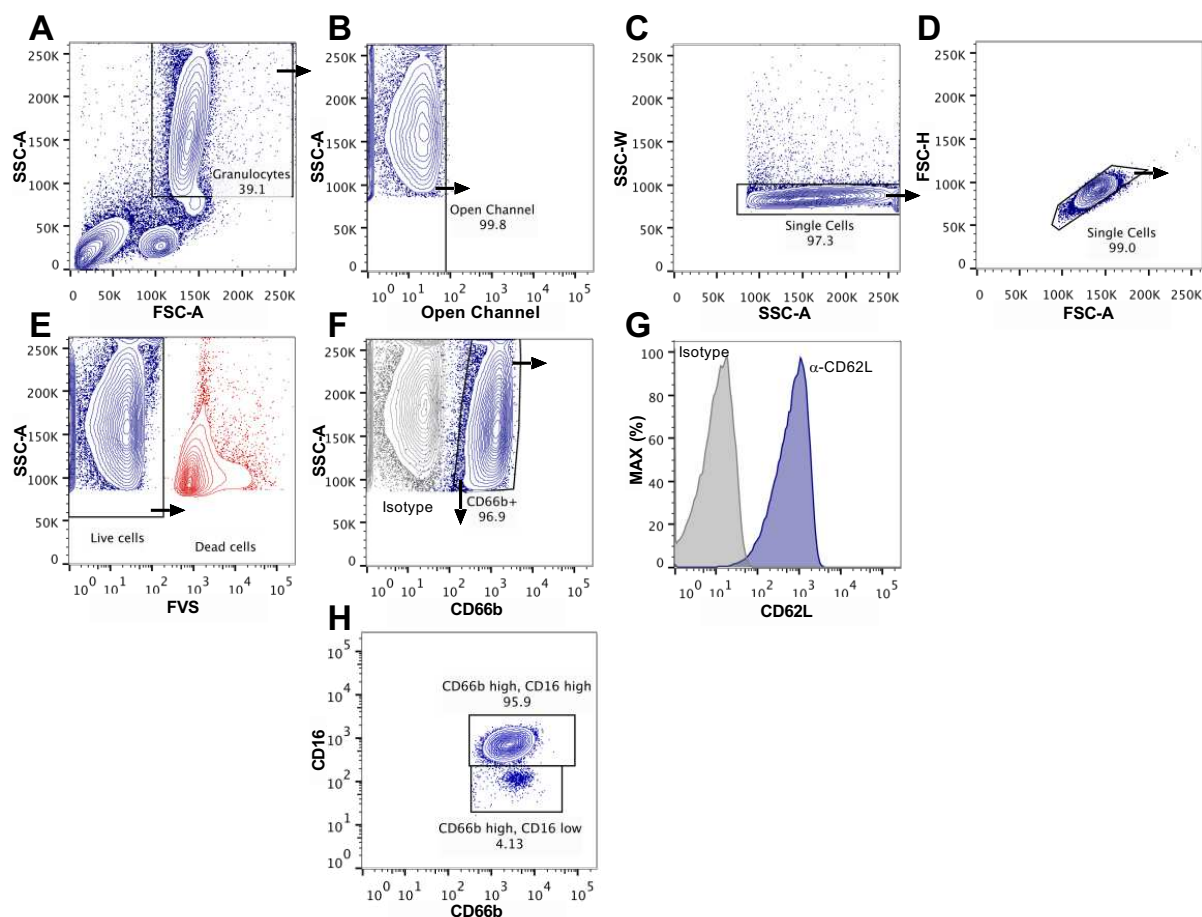
Fibrinogênio ativado (g/L, Mediana (IQR))	5.44 (5.125 – 6.93)
---	---------------------

ELISA D-dímeros (ng/mL, Mediana (IQR))	1120 (622 – 3123)
--	-------------------

Proteína C reativa (mg/L, Mediana (IQR))	96.4 (22 – 216)
--	-----------------

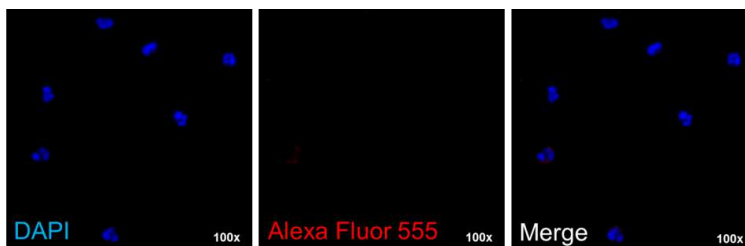
IQR: interquartile range

ANEXO C

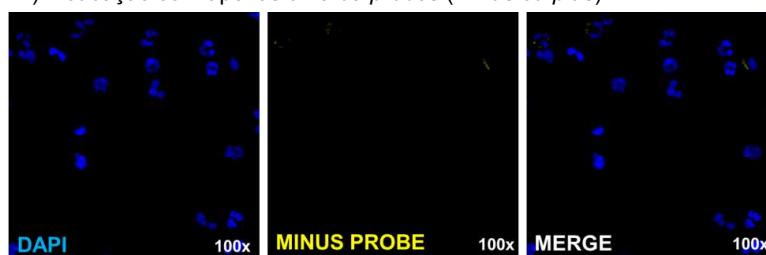


Estratégia de gate representativa usada para análise de neutrófilos. Um gráfico de pontos característico plotado em função do *side scatter* (SSC) versus *forward-scatter* (FSC) foi usado para selecionar a população de neutrófilos (A) do sangue periférico coletado de doadores saudáveis e pacientes com COVID-19. A autofluorescência (B) e os eventos duplos (C-D) foram removidos da análise e as células viáveis foram selecionadas (E). Células CD66b⁺/CD15⁺ (F) foram selecionadas e o MFI de marcadores de superfície como o CD62L (G) foi avaliado. Cerca de 96% das células CD66b⁺ são neutrófilos maduros (CD66b^{high}/CD16^{high}) e 4% das células CD66b⁺ são CD66b^{high}/CD16^{low}, o que é sugestivo de neutrófilos imaturos ou eosinófilos (H). Para a análise de neutrófilos isolados, foi realizada uma estratégia de gate semelhante. Para monócitos isolados, as células CD14⁺ foram selecionadas. Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos em cada análise. A análise foi realizada em um FACSVersé utilizando o software FACSuite (BD Biosciences) e o software FlowJo (FlowJo LLC).

ANEXO D

A Controles técnica de imunofluorescência indireta – Neutrófilos de doadores saudáveis

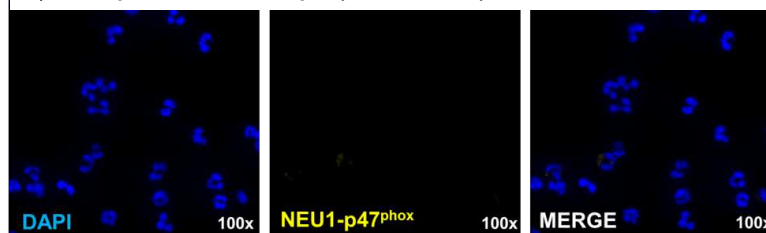
Controles técnica de imunofluorescência indireta – Neutrófilos de Pacientes com COVID-19

**B** Controles técnica de Duolink PLA – Neutrófilos de doadores saudáveis incubados com LPS1) Incubação com apenas uma da *probes* (*minus* ou *plus*)

2) Incubação com apenas um dos anticorpos primários (anti-NEU1 ou anti-MMP-9)



3) Avaliação de uma interação/proximidade que não ocorre



Controles negativos técnicos para os experimentos de imunofluorescência indireta e Duolink PLA. Neutrófilos isolados de doadores saudáveis ou de pacientes com COVID-19 foram testados em lâminas contendo $0,3 \times 10^6$ células. A marcação do anticorpo secundário Alexa Fluor 555 anti-rabbit (vermelho) foi usada na ausência de um anticorpo primário e usada como controle negativo nos protocolos de imunofluorescência indireta (A). Para o ensaio de ligação de proximidade Duolink PLA, três controles diferentes foram usados para garantir

resultados positivos. Primeiramente, os experimentos foram conduzidos com a incubação com um mouse anti-human NEU1 (1:100) mais um rabbit anti-human MMP-9 (1:100), no entanto, apenas a sonda MINUS foi utilizada (1). Outro controle técnico foi adicionado realizando o protocolo com a incubação primária apenas na presença de um dos anticorpos primários alvo no ensaio, o anti-NEU1 (1:100) (2). O último controle técnico consistiu em direcionar uma interação que não existe. Neste caso foi avaliada a interação entre NEU1 e a subunidade p47phox da NADPH-oxidase (3) (B). O DAPI foi usado para coloração de DNA (azul) em ambos os protocolos (A e B). Fotos representativas sobrepostas (ampliação de 100×) demonstram fluorescência mínima ou inexistente. As fotos foram capturadas de pelo menos de 3 campos diferentes e analisadas usando o software ImageJ® 1.53J (A-B). DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol; NEU = neuraminidase; MMP = matriz metaloproteinase.