

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Ana Rita Piteira

**Identificação e Caracterização da Actividade de
Sialiltransferase na Superfície Celular de Células
Dendríticas**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia*

Orientador Externo:

Prof.^a Doutora Paula Videira (FCM/UNL)

Co-orientador Externo:

Doutora Guadalupe Cabral (FCM/UNL)

Elo de Ligação:

Prof. Doutor António Lares (FCT/UNL)

LISBOA

2009

Agradecimentos

À Professora Doutora Paula Videira e à Doutora Guadalupe Cabral, pela amizade, rigor científico, disponibilidade, e apoio incondicional em todos os momentos difíceis que surgiram no decorrer deste trabalho.

Ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas por me acolher no seu laboratório.

À Zélia Silva e Hélio Crespo pela sua presença e ajuda constante.

Ao restante pessoal do Laboratório de Imunologia, em particular à Dr.^a Catarina Martins pela simpatia e ensinamentos, à Manuela Fernandes e Glória Nunes pela sua disponibilidade, e à D. Idalina, pelo seu sorriso matinal e ajuda imprescindível.

Ao Doutor Dário Ligeiro, pelas horas perdidas em frente ao microscópio.

Ao Dr. Reinhard Brossmer da University of Heidelberg, por ceder o substrato fluorescente que tornou esta dissertação possível.

Ao Professor António Laires, pela sua disponibilidade, sentido crítico, e bons conselhos.

À minha família sempre presente, e a todos meus amigos, em particular à Catarina Bolotinha, por tornar o sonho realidade, e ao Paulo Severino, pela sua amizade e ajuda.

Ao Gustavo, por TUDO.

Resumo

As células dendríticas humanas derivadas de monócitos (mo-DCs) expressam estruturas altamente sialiladas à sua superfície. Apesar do papel desempenhado pelo ácido siálico (NeuAc) na biologia das mo-DCs não ser totalmente conhecido, existem evidências recentes de que poderá influenciar a regulação de processos como a maturação, imunogenicidade, adesão, e endocitose.

No presente trabalho procurou-se determinar a existência de sialiltransferases (ST) na superfície das mo-DCs, Ectosialiltransferases (EctoST), responsáveis pela rápida reposição do conteúdo de NeuAc, e analisar a sua eventual capacidade de modular a biologia das mo-DCs.

Observou-se que na presença do substrato de ST, CMP-NeuAc exógeno, ocorre incorporação de NeuAc na superfície das mo-DCs, sendo esta incorporação aumentada em células previamente tratadas com sialidase, e DCs maduras.

A existência de ST na superfície celular das mo-DCs foi ainda reforçada pela observação da inibição da sua actividade na presença de um inibidor de ST, o CTP, e pela actividade inalterada na presença de possíveis enzimas secretadas.

A nível funcional a actividade de EctoST diminui a capacidade de endocitose de ovalbumina das mo-DCs e promove a capacidade de adesão das mo-DCs a outras células.

As Ectosialiltransferases parecem participar num controlo dinâmico da sialilação, que poderá estar relacionado com um processo fisiológico, como o processo inflamatório ou de infecção, a sua actividade pode contribuir assim para a regulação da homeostasia e protecção celular.

O facto de estas enzimas alterarem rapidamente as características na superfície celular e poderem modular a imunobiologia das mo-DCs, deixa em aberto a sua utilização como futuro alvo terapêutico.

Abstract

Human monocyte-derived dendritic cells (mo-DCs) express highly sialylated structures, with a recognized but poorly understood role in maturation, immunogenicity, adhesion and endocytosis capacity. Here we investigated the existence of cell surface (nonintracellular) sialyltransferases (ST) – Ectosialyltransferase (EctoST) – which rapidly restores or alters mo-DC surface sialylation and modulate specific immune functions.

We demonstrated that, in the presence of exogenous CMP-NeuAc, mo-DCs significantly incorporated sialic acid into cell surface and the incorporation level was increased after sialidase treatment and upon maturation. The presence of this cell membrane ST activity was supported by further observations, which included the fact that the activity was inhibited by a ST inhibitor, the CTP, and it was not influenced by possible secreted enzymes. At the functional level, EctoST activity modulates the endocytosis capacity of mo-DCs, as demonstrated by the down-regulation of ovalbumin uptake, and seems to increase adhesion capacity of the mo-DCs.

These EctoST seem to participate in a dynamic control of mo-DC sialylation and may be related with specific physiological conditions, such as inflammation and infection, contributing to protection and homeostasis regulation.

The fact that these enzymes alter rapidly the cell surface characteristics and can modulate mo-DC immunobiology opens the possibility of their future therapeutical use.

O Trabalho desenvolvido deu origem às seguintes publicações:

Artigo - Cabral MG, Piteira AR, Ligeiro D, Silva Z, Brossmer R, Videira PA. 2009. *Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. Immunol Lett submitted.*

Resultados descritos no capítulo - Cabral MG, Crespo HJ, Piteira AR, Ligeiro D, Videira PA. 2009. *Sialic acids as modulators of endocytosis: the case of dendritic cells. In: Endocytosis: Structural Components, Functions and Pathways. Columbus F (eds), Nova Science Publishers, Inc., NY. In press*

Poster e Artigo publicado em acta do encontro científico – A.Rita Piteira, M.Guadalupe Cabral, Dário Ligeiro, Reinhard Brossmer, Paula A. Videira. 2009. *Dendritic Cells show evidence of a cell surface Sialyltransferase activity. 2º Congresso Europeu de Imunologia, Berlim*

Poster vencedor do prémio de melhor poster em exposição – A.Rita Piteira, M. Guadalupe Cabral, Dário Ligeiro, Reinhard Brossmer, Paula A.Videira. *Dendritic Cells show evidence of a cell surface Sialyltransferaseactivity. 2009. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria, Covilhã*

Palavras-chave

Ácido Siálico

Células Dendríticas

Superfície Celular

Sialiltransferase

Ectosialiltransferase

Abreviaturas

Ag – Antígeno

APC – Célula apresentadora de antígenos

BCR – Receptores dos linfócitos B

CMP-5-FITC-NeuAc – *Cytidine-5'-monophospho-5-fluoresceinthioureido-N-acetylneuraminic acid*

CMP-NeuAc – *Cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid sodium sal*

CPR – Proteína C Reactiva

CTP – *Cytidine 5'-triphosphate disodium salt*

DCs – Células Dendríticas

EctoST – Ectosialiltransferase

ER – Retículo Endoplasmático

FCR – Receptores Fc

FCS – Soro Fetal Bovino

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC – Forward Scattering

Gal – Galactose

GalNac – N-acetilgalactosamina

GlcNac – N-acetilglucosamina

GM-CSF - Factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

IL-4 – Interleucina-4

KDN – ácido 2-ceto-3-desoxi-d-glicero-d-galactononónico

Linfócitos NK – linfócitos *Natural Killer*

Linfócitos Tc – linfócitos T citotóxico

Linfócitos Th – linfócitos T auxiliares

LPS – Lipopolissacárido

MAA – Aglutinina de *Maackia amurensi*

MFI – Intensidade Média de Fluorescência

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

mo-DCs – Células Dendríticas derivadas de Monócitos

Neu5Gc – Ácido N-glico-neuramínico

NeuAc – Ácido Siálico (ácido N-acetil-neuramínico)

PBS – Tampão fosfato salino

PE - Ficoeritrina

RNA – Ácido Ribonucleico

SNA – *Sambucus Nigra Lectin*

SR-A – *scavenger receptor-A*

SSC – Side Scattering

ST – Sialiltransferase

TCR – Receptores dos linfócitos T

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Palavras-chave.....	v
Abreviaturas.....	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Glicobiologia.....	1
1.2. Ácidos Siálicos.....	2
1.3. Sialiltransferases.....	4
1.4. Sialidasas.....	6
1.5. Importância do Ácido Siálico em Imunologia.....	7
1.6. Sistema Imunitário.....	8
1.6.1. Resposta Imune Inata e Adaptativa.....	9
1.6.2. Células Apresentadoras de Antígenos (APC).....	10
1.6.3. Células Dendríticas.....	11
1.6.4. Aplicações Clínicas das Células Dendríticas.....	14
1.7. Introdução ao Tema da Tese.....	16
Materiais e Métodos.....	19
2.1. Condições de Cultura.....	19
2.2. Obtenção de Células Dendríticas Derivadas de Monócitos.....	19
2.2.1. Separação de Células Mononucleares.....	19
2.2.2. Isolamento de Monócitos.....	20
2.2.3. Diferenciação de Monócitos em Células Dendríticas.....	20
2.3. Tratamento com Sialidase.....	21
2.4. Detecção da Actividade de Sialiltransferase de Membrana em mo-DCs.....	21
2.4.1. Detecção de Actividade de Sialiltransferase na Superfície de mo-DCs por Citometria de Fluxo.....	22
2.4.2. Determinação da Incorporação de Ácido Siálico na Superfície de mo-DCs ao Longo do Tempo.....	22
2.4.3. Avaliação do Tipo de Actividade Sialiltransferase na Superfície de mo-DCs.....	23
2.5. Microscopia Confocal de Varrimento Laser.....	23
2.5.1. Detecção da Actividade de Sialiltransferase da Superfície de mo-DCs por Microscopia Confocal de Varrimento Laser.....	23
2.6. Estudo do Efeito da Incorporação de FITC-NeuAc na Maturação das mo-DCs vs Efeito da Maturação na Incorporação de Ácido Siálico na Superfície das mo-DCs.....	24
2.7. Determinação da Influência da Sialilação da Superfície das mo-DCs na Capacidade de Adesão destas a Células Tumorais.....	25
2.8. Determinação da Influência da Sialilação da Superfície Celular na Actividade Endocítica das mo-DCs.....	26
2.9. Análise Estatística.....	26
2. Resultados.....	27
3.1. Detecção da Actividade de Sialiltransferase na Superfície das mo-DCs.....	27
3.2. A Incorporação de Ácido Siálico na Superfície das mo-DCs ao Longo do Tempo.....	32
3.3. Papel das ST Secretadas na Sialilação da Superfície das mo-DCs.....	34
3.4. Capacidade de Indução da Maturação pelo CMP-5-FITC-NeuAc.....	35
3.5. Incorporação de Ácido Siálico em mo-DCs Maduras.....	36

3.6.	Influência dos Resíduos de Ácido Siálico na Capacidade de Adesão das mo-DCs	39
3.7.	Influência da Sialilação da Superfície Celular na Capacidade Endocítica das mo-DCS	41
3.	Discussão	43
4.1.	As mo-DCs possuem na sua superfície ST que permitem a sua rápida re-sialilação	43
4.2.	A Actividade Sialiltransferase Observada Não se Deve a Enzimas Secretadas para o Meio Extracelular pelas mo-DCs	44
4.3.	É Possível que a Sialilação Mediada pelas Ectosialiltransferases Presentes na Superfície das mo-DCs Modele Vários Mecanismos Celulares	45
4.3.1.	A Actividade Ectosialiltransferase em mo-DCs Modela o Processo de Endocitose	46
4.3.2.	A Remoção dos Resíduos de Ácido Siálico Aumenta a Capacidade de Adesão das mo-DCs	48
4.4.	Perspectivas Futuras	49
4.	Conclusão	51
5.	Bibliografia	53
	Anexo I: Poster apresentado no IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria, Covilhã 2009.	59
	Anexo II: Artigo publicado em acta do encontro científico, no 2º Congresso Europeu de Imunologia, Berlim 2009.	Erro! Marcador não definido.

1. Introdução

1.1. Glicobiologia

Glicobiologia é o estudo da estrutura, biossíntese, biologia e evolução dos glicanos/sacáridos (cadeias de açúcares), que se encontram amplamente distribuídos na natureza, e das proteínas que os reconhecem.

Mais especificamente, este ramo da ciência estuda a química dos glícidos, a enzimologia da formação e degradação dos glicanos, o reconhecimento dos glicanos por proteínas específicas (lectinas e glicosaminoglicanos), o papel destes em sistemas biológicos complexos, bem como a sua análise e manipulação (Varki, *et al.*, 2008).

A Glicobiologia, assume cada vez mais relevância, emergindo da bioquímica e da biologia celular, devido ao evidente envolvimento dos açúcares na mediação de importantes processo como, a marcação/distinção de proteínas, interacções intracelulares e sinalização extracelular (Weijers, *et al.*, 2008).

Todas as células são revestidas por uma complexa estrutura criada por cadeias de açúcares. Grande parte das proteínas secretadas pelas células eucariotas está associada covalentemente a glicanos (Schauer, 2009).

Os glicanos podem ser monossacáridos, mas na maioria das vezes são oligo ou polissacáridos, ou seja cadeias da unidade estrutural, os monossacáridos. As unidades estruturais mais comuns que constituem os glicanos de animais superiores são os ácidos siálicos, hexoses, hexosaminas, desoxihexoses, pentoses e ácidos urónicos (van der Wel, *et al.*, 2003).

Os glicanos são encontrados na natureza, livres ou associados na forma de glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolípidos). A diversidade estrutural dos glicanos é muito superior à verificada em proteínas e ácidos nucleicos, pelo que as funções biológicas desempenhadas por estes compostos são também muito diversas (Raman, *et al.*, 2005). Ao contrário do que acontece na síntese de proteínas e de DNA (ácido desoxirribonucleico), a síntese de glicanos não é unidireccional. De facto, durante a biossíntese no Retículo Endoplasmático (ER) e no Complexo de Golgi podem ser removidos um ou mais monossacáridos dos glicanos e readicionados novos monossacáridos, consoante a via enzimática a que os glicoconjugados estão sujeitos. (Fukuda e Bao, 2008;Gao, *et al.*, 2008;Ohtsubo e Marth, 2006) Este facto contribui para a grande diversidade de glicanos sintetizados.

Muitos glicanos bioactivos presentes na superfície celular estão envolvidos numa grande variedade de processos, importantes para a biologia da célula: crescimento e proliferação celular, metástases tumorais, anticoagulação, comunicação célula-célula, início de infecção por bactérias e vírus, e reconhecimento imune (Raman, *et al.*, 2005; Weijers, *et al.*, 2008). O papel biológico destes glicanos é tipicamente atribuído às suas interacções com proteínas e com o modo como modelam a actividade destas na interface célula-célula e célula-meio extracelular. Consequentemente os glicanos biologicamente activos têm vindo a ser reconhecidos como uma classe de biomoléculas relevantes para a indústria biomédica. (Koeller e Wong, 2000)

A glicosilação é uma modificação ubíqua que ocorre nos organismos superiores após a tradução de proteínas, e que permite a uma proteína (ou lípido) adquirir diferentes funções, e gera diversidade estrutural que justifica o facto da diversidade biológica não se correlacionar com o baixo número de genes do genoma humano.

Os açúcares complexos possuem papéis relevantes, em biologia do desenvolvimento, na resposta imune, no processo inflamatório, proliferação celular, apoptose, na infecção por agentes patogénicos e em várias doenças congénitas (Campbell e Yarema, 2005; Trottein, *et al.*, 2009).

Existem duas famílias de enzimas: as glicosiltransferases e as glicosidasas, que *in vivo* são responsáveis pela formação da maior parte dos glicoconjugados presentes na superfície celular (Weijers, *et al.*, 2008). As glicosidasas, também designadas glicosil hidrolases, são um grupo vasto de enzimas responsáveis pela quebra de ligações glicosídicas. Por sua vez, as glicosiltransferases catalisam a transferência de açúcares presentes num dador glicosilado (na maioria das vezes um nucleótido de açúcar), para moléculas aceitadoras, formando ligações glicosídicas.

1.2. Ácidos Siálicos

Os ácidos siálicos são uma grande família de compostos derivados do ácido neuramínico. São monossacáridos ácidos comuns em organismos superiores e microrganismos. Estão presentes nas secreções celulares e na superfície celular, frequentemente na posição terminal de glicanos de glicoproteínas e glicolípidos (gangliosidos) (Weijers, *et al.*, 2008).

São conhecidos cerca de 50 tipos de ácidos siálicos, sendo a forma mais comum o ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac), seguido da forma ácido N-glico-neuramínico (Neu5Gc) (Figura 1.1) (Buschiazzo e Alzari, 2008;Schauer, 2009).

O ácido 2-ceto-3-desoxi-d-glicero-d-galactononónico (KDN), composto cuja presença em células dos vertebrados é menos comum que o Neu5Ac, pertence à família dos ácidos siálicos, no entanto não é um derivado do ácido neuramínico. A estrutura do KDN difere dos restantes ácidos siálicos, por possuir um grupo hidroxilo em vez do grupo N-acetil dos derivados do ácido neuramínico (Varki, *et al.*, 2008).

No homem, a forma Neu5Ac é de longe a mais abundante de ácidos siálicos, a forma KDN é expressa em baixas quantidades e a forma Neu5Gc não é expressa normalmente devido a um defeito num gene envolvido na biossíntese do seu precursor.

A nomenclatura dos ácidos siálicos designa como Neu, a estrutura nuclear do ácido neuramínico, sendo as diferentes substituições designadas por códigos de letras (Ac – Acetil; Gc – Glicosil; Me – Metil, Lt – Lactil; S - Sulfato), por vezes acompanhados por números que indicam a posição da ligação relativamente aos átomos de carbono da estrutura Neu (Varki, *et al.*, 2008).

Estes monossacáridos possuem uma carga negativa que influencia as propriedades fisiológicas e químicas das moléculas onde estão inseridos.

Não é fácil descrever a função deste grupo de monossacáridos, uma vez que estes participam directa ou indirectamente em múltiplos eventos celulares. No entanto, de uma forma geral, as funções desempenhadas pelos ácidos siálicos são divididas em dois grupos:

- Estes são capazes de "máscarar" locais de reconhecimento, como o penúltimo monossacárido de uma cadeia de glicanos, ou proteínas e outras moléculas da superfície celular, incluindo receptores moleculares.

- Funcionam como ligandos de receptores, desempenhando funções opostas à referida anteriormente, uma vez que em locais de reconhecimento biológico, funcionam como ligandos para uma variedade de moléculas. Estas incluem lectinas, que são proteínas que reconhecem especificamente glicanos aos quais se ligam sem catalisar nenhuma modificação destes, mas também hormonas, anticorpo e catiões orgânicos e inorgânicos.

- Por outro lado, os ácidos siálicos podem estar envolvidos na estabilização de moléculas e proteínas. Graças à sua característica carga negativa e à sua estrutura

química hidrofílica (Figura 1.1); podem estar também relacionados com a ligação e transporte de iões e fármacos

Assim, os ácidos siálicos estão envolvidos em fenómenos de interacções celulares e moleculares, em processos fisiológicos e patológicos (Kurosawa, *et al.*, 1995; Schauer, 2009).

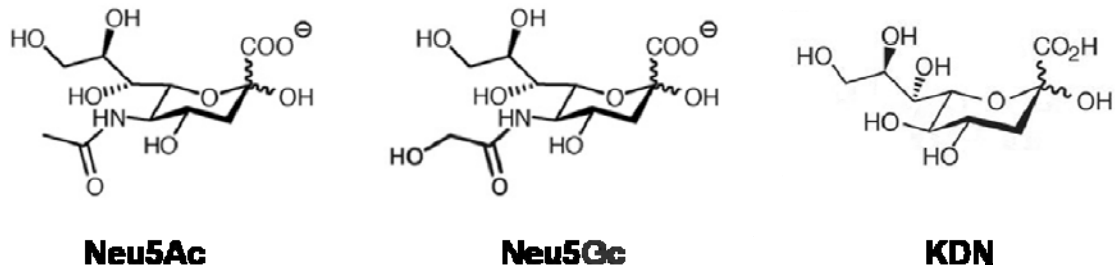


Figura 1.1 – Três formas mais frequentes de ácido siálico na natureza (*in* (Schauer, 2009; Varki, *et al.*, 2008))

A biossíntese e metabolismo dos sialilconjugados são controlados por um número elevado de enzimas, que inclui sialidases, sialiltransferases, esterases e liases, assumindo as sialiltransferases um papel fundamental no final da biossíntese de todas as estruturas sialiladas. (Weijers, *et al.*, 2008)

1.3. Sialiltransferases

A sialilação de sequências de oligossacáridos é catalisada pela família das enzimas, Sialiltransferases (ST). As ST humanas são uma família de pelo menos 20 proteínas glicosiltransferases normalmente, ligadas à membrana do Complexo de Golgi. (Harduin-Lepers, *et al.*, 2001)

As ST humanas que se conhecem, catalisam a transferência do ácido siálico do nucleótido de açúcar dador, CMP-Neu5Ac (Figura 1.2) para a unidade açúcar aceitadora na posição terminal de um glicoconjugado. A forma activada do ácido siálico é gerada pelas CMP-Neu5Ac sintetases, que catalisam a reacção irreversível:



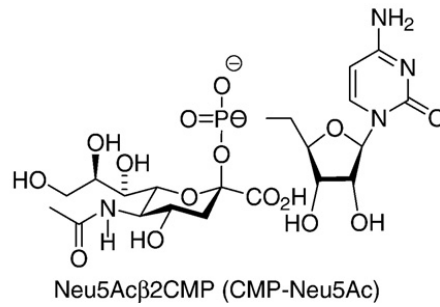


Figura 1.2 – Estrutura química da forma activa do ácido 5-acetil-neuramínico Neu5Ac, o CMP-Neu5Ac (*in* (Varki, *et al.*, 2008))

Como a grande parte das glicosiltransferases, as ST são tipicamente proteínas membranares do tipo II. As ST, em particular, partilham sequências de aminoácidos conservadas denominados motivos sialil (ou em inglês, *sialylmotifs*), que constituem os locais de ligação com os substratos dadores (CMP-Neu5Ac) e glicanos aceitadores, e motivos envolvidos na actividade catalítica (Varki, *et al.*, 2008).

Os glicoconjugados presentes nos mamíferos possuem um número limitado de ligações sialil. O ácido siálico pode estar ligado a um resíduo galactose (Gal) por uma ligação $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$; a um resíduo N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc) por uma ligação $\alpha 2,6$; ou ainda a outro ácido siálico por uma ligação $\alpha 2,8$ (Harduin-Lepers, *et al.*, 2001).

As ST designam-se por ST3, ST6 e ST8, indicando os números 3, 6 e 8 a transferência do grupo Neu5Ac para a 3^a, 6^a ou 8^a posição hidroxil da molécula aceitadora, respectivamente. As sialiltransferases da subfamília ST3 transferem o grupo NeuAc para unidades terminais de galactose (Gal), designando-se por ST3Gal. Existem 6 membros nesta sub-família. A adição de Neu5Ac por parte das ST3Gal depende da unidade sub-terminal, o que lhe confere alguma especificidade. Os membros da sub-família ST6 catalisam uma ligação $\alpha 2,6$, que adiciona Neu5Ac aos resíduos Gal presentes na posição terminal de N-acetilactosamina (Gal-1-4GlcNAc), ou para resíduos GalNAc sub-terminais de glicoproteínas e gangliosidos. Por último, a sub-família das ST8 é diferente das restantes sub-famílias mencionadas, uma vez que transfere NeuAc para outros resíduos de NeuAc, presentes em gangliosidos e em ácido polisiálico, que é um homopolímero de diferentes dimensões em glicoproteínas (Harduin-Lepers, *et al.*, 2001; Weijers, *et al.*, 2008).

Normalmente, as ST adicionam NeuAc às proteínas recém-sintetizadas, no Complexo de Golgi. No entanto, recentemente foram descritas formas solúveis e

membranares de ST, nomeadamente, na superfície de linfócitos B e neutrófilos. Devido à posição e actividade destas ST, estas enzimas são designadas como Ectosialiltransferases (EctoST) (Gross, *et al.*, 1996;Harduin-Lepers, *et al.*, 2001;Rifat, *et al.*, 2008). No entanto, pouco se sabe ainda sobre estas enzimas localizadas no exterior da membrana plasmática de algumas células.

Apesar da totalidade das ST não estar completamente caracterizada, sabe-se que os níveis de expressão dos genes de cada uma destas ST diferem consoante o tecido e o tipo e estadio em que se encontra a célula, permitindo a regulação do padrão celular de sialilação e antecipando uma especificidade complexa destas enzimas (Harduin-Lepers, *et al.*, 2001).

1.4. Sialidases

Os ácidos siálicos ligados aos glicoconjugados podem ser removidos, a dada altura no ciclo de vida de uma molécula.

As sialidases, também conhecidas como neuraminidases (termo mais aplicado a sialidases virais), catalisam a remoção da ligação dos NeuAc terminais de diferentes glicanos (exosialidases), ou quebram ligações glicosídicas de NeuAc no interior da estrutura de oligossacáridos (endosialidases), associado ao consumo de uma molécula de água (Buschiazzo e Alzari, 2008).

Em células eucariotas, a actividade das sialidases realiza-se essencialmente nos compartimentos endossomais e lisossomais, num processo de reciclagem das moléculas da superfície celular. Por vezes, após a remoção dos resíduos de NeuAc, as moléculas podem retomar ao complexo de Golgi onde são re-sialiladas. Algumas células eucariotas de mamíferos, possuem ainda sialidases citoplasmáticas e membranares (na superfície celular). As sialidases poderão estar envolvidas na remoção dos resíduos de NeuAc da superfície celular, sendo também responsável pela modulação da resposta celular a determinados estímulos (Varki, *et al.*, 2008).

Alguns microrganismos também expressam sialidases, estando muitas vezes associadas a factores de virulência, por removerem o NeuAc de importantes receptores celulares, tornando-os mais facilmente reconhecidos pelos microrganismos. No caso concreto das células dendríticas, a actividade de sialidases de microrganismos sobre os glicanos expressos à superfície celular, parece estar

envolvida na activação celular do processo de maturação e alteração da sua capacidade endocítica. (Crespo, *et al.*, 2009)

O NeuAc removido pode ainda funcionar como fonte de energia para alguns microrganismos (Vimr, *et al.*, 2004).

A maior parte das sialidasas apresenta especificidade no que diz respeito às ligações com NeuAc que clivam, de um modo geral as ligações α -2,3 são hidrolisadas com mais facilidade que as ligações α -2,6 e as ligações α -2,8 são hidrolisadas numa taxa intermédia em relação às outras ligações. (Varki, *et al.*, 2008)

Muitas destas sialidasas são secretadas como proteínas solúveis, como acontece nas bactérias *Clostridium perfringens* e *Salmonella typhimurium*, que se encontram bem caracterizadas. Assim, são produzidas em larga escala, na sua forma solúvel para serem aplicadas em diversos campos de investigação, como por exemplo na análise de oligossacáridos, glicoproteínas ou glicolípidos e em estudos sobre o efeito da sialilação à superfície das células (Varki, *et al.*, 2008). Actualmente a terapêutica contra alguns destes agentes patogénicos visa a inibição da actividade de sialidasas bacterianas.

1.5. Importância do Ácido Siálico em Imunologia

A relevância do NeuAc em imunologia pode ser vista através de diferentes perspectivas. Por um lado, este açúcar está presente em abundância nas células do sistema imunitário, onde é capaz de “mascarar” locais de ligação, ou funcionar como molécula de reconhecimento de receptores imunológicos, como Siglecs e Selectinas, que requerem ligações específicas com glicanos sialilados. (Marino, *et al.*, 2004) Assim, o NeuAc está envolvido na modulação de processos de reconhecimento, adesão, inflamação (Buschiazzo e Alzari, 2008), e na migração e diferenciação das células do sistema imunitário. (Gross, *et al.*, 1996; Rifat, *et al.*, 2008; Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004)

Por outro lado, muitos microrganismos modificam a sua superfície através da adição de NeuAc de forma a evitar ou inibir o seu reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro. Outros, como por exemplo o vírus influenza, possuem a capacidade de clivar o NeuAc presente nos receptores das células do hospedeiro, de modo a facilitar a o processo de infecção. (Schauer, 2009)

No entanto, de uma forma ou de outra, o NeuAc como açúcar terminal presente na membrana dos organismos superiores, é a primeira molécula com que o microrganismo entra em contacto antes de invadir a célula do hospedeiro. Como componente reguladora dos mecanismos de defesa do sistema imunitário, o NeuAc é uma substância presente no meio que pode servir de substrato, ser mimetizada, ou interpretada como sinalização celular pelos microrganismos (Vimr, *et al.*, 2004).

O NeuAc está ainda envolvido na eliminação de células senescentes, que apresentam receptores dessialilados na sua superfície, o que permite a ligação de células fagocíticas.

A importância do NeuAc na resposta imune, foi também evidenciada através de estudos com ratinhos deficientes para algumas ST, onde se verificou por exemplo, a diminuição da proliferação dos linfócitos B em resposta a sinais de activação, diminuição da produção de anticorpo quando expostos a antígenos (Hennet, *et al.*, 1998), e a diminuição da capacidade endocítica das células dendríticas (DCs) (Crespo, *et al.*, 2009), em ratinhos deficientes para a ST6Gal1 e ST3Gal1.

Em suma, apesar do papel do NeuAc na resposta imune ser muito complexo, e não se encontrar ainda totalmente esclarecido, é evidente a relevância deste açúcar na adesão, protecção e estrutura celular, bem como na interacção das células com outras moléculas incluindo agentes infecciosos, modulando as interacções celulares.

1.6. Sistema Imunitário

As células do sistema imunitário, leucócitos, têm origem em precursores presentes na medula óssea. O processo de diferenciação das células estaminais em células sanguíneas é denominado hematopoiese, e dá origem a duas grandes linhagens celulares: a linhagem mielóide e a linhagem linfóide. (Arosa, *et al.*, 2007) Durante a diferenciação das linhagens mielóide e linfóide, as células estaminais hematopoiéticas, diferenciam-se em células progenitoras, que perdem a sua pluripotência, para se comprometerem com uma linhagem celular.

Os progenitores linfóides dão origem a linfócitos T, linfócitos B, linfócitos *Natural Killer* (NK) e determinadas subpopulações de DCs. As células progenitoras da linhagem mielóide dão origem a eritrócitos, plaquetas e vários a leucócitos, nomeadamente neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, mastócitos e células

dendríticas. A via de diferenciação seguida pelos progenitores hematopoéticos é determinada pela resposta a determinados factores de crescimento e citocinas. (Goldsby, *et al.*, 2007)

O conjunto dos vários processos que permitem ao organismos reconhecer e eliminar microrganismos patogénicos e outras substâncias estranhas que lhe são prejudiciais denomina-se Imunidade.

1.6.1. Resposta Imune Inata e Adaptativa

O sistema imune dos organismos complexos baseia-se em dois tipos de resposta imune:

-Resposta imune inata: compreende as barreiras mecânicas (por exemplo: pele, mucosas, cílios nas vias respiratórias) químicas (ácido gástrico, lisozimas), que limitam a entrada e proliferação de agentes patogénicos, e células endocíticas/fagocíticas especializadas na detecção, captura e processamento de antígeno (Ag), que dão início à resposta imune adaptativa, e processos fisiológicos de inflamação (desencadeados por exemplo, por proteínas séricas e citocinas). A resposta inata é activada em resposta a um estímulo, como por exemplo, a presença de lipopolissacáridos (LPS) bacterianos, cadeias dupla de RNA, que representam formas genéricas de infecção, ou moléculas secretadas por células danificadas quando ocorre dano tecidual.

-Resposta imune adaptativa: confere imunidade contra um Ag particular, é altamente específica e pressupõe uma memória imunológica previamente adquirida, pela exposição anterior ao agente patogénico.

Existem duas classes gerais de resposta imunológica adaptativa, a resposta humoral e a resposta celular.

Na resposta adaptativa humoral, depois do reconhecimento do Ag através dos receptores específicos de células B (BCR), os linfócitos B diferem-se em plasmócitos, que produzem formas solúveis de imunoglobulinas (anticorpos). Estas ligam-se ao Ag, desencadeando uma série de eventos imunológicos que inclui a marcação de células infectadas ou patogénicos para a destruição por outras células do sistema imunitário, nomeadamente pelas NK e macrófagos, respectivamente.

Na resposta adaptativa celular, as três sub-populações de linfócitos T, reconhecem um Ag específico que lhes é apresentado pelas células apresentadoras de Ag (APCs) via Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC). Os linfócitos T auxiliares (Th, do Inglês *helper*) respondem ao Ag com a produção de citocinas, que induzem por exemplo, a actividade microbocida dos macrófagos e a produção de anticorpo pelos linfócitos B. Os linfócitos T citotóxicos (Tc), desempenham funções efectoras directas, mediando a destruição das células alteradas (pela infecção por vírus ou células neoplásicas). Por último, os linfócitos T reguladores possuem a capacidade de suprimir a respostas imunológicas específicas. (Arosa, *et al.*, 2007;Goldsby, *et al.*, 2007)

A eficiência da resposta adaptativa pode então ser definida pela especificidade antigénica, diversidade de anticorpos produzidos, memória imunológica e reconhecimento do próprio e não próprio (*self e non self*). Baseia-se na existência de um vasto repertório de anticorpo, na apresentação dos Ag pelas APCs (descritas no ponto 1.6.2), e na selecção clonal dos linfócitos que apresentam complementariedade dos receptores específicos das células T (TCR) e B (BCR). (Banchereau, *et al.*, 2000;Mackenzie, *et al.*, 2004)

1.6.2. Células Apresentadoras de Antígenios (APC)

A tentativa de compreender a imunogenicidade, o modo com uma substância antigénica é capaz de gerar uma resposta imune, determinou a descoberta das DCs em 1972. Mais tarde Sir Macfarlane sugeriu a teoria da expansão clonal, afirmando que o sistema imunitário possui um vasto repertório de clones, e cada um deles é capaz de reconhecer um antígeno diferente. (Steinman, 2007) A imunidade mediada por linfócitos T, contra células tumorais, bacterianas ou infecções virais, depende essencialmente do reconhecimento de péptidos, isto é Ag, processados e apresentados pelas APCs. Estas células são essencialmente linfócitos B, macrófagos e DCs, e têm a capacidade de realizar a degradação proteolítica de proteínas próprias e não próprias, em fragmentos peptídicos de diferentes tamanhos, através de vias de processamento específicas, e apresentarem os Ag processados, via moléculas do complexo MHC.

O MHC é um complexo genético com múltiplos *loci*, altamente polimórficos que codificam duas classes principais de glicoproteínas membranares: as moléculas MHC classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II). As moléculas do MHC-I são constitutivamente expressas por virtualmente todas as células nucleadas. A expressão de moléculas de MHC-II é mais restrita, sendo expressas de forma constitutiva, pelas APCs.

As diferentes formas alélicas dos genes que codificam as moléculas MHC, conferem alterações estruturais que determinam diferentes especificidades para a ligação de Ag. Assim a capacidade de apresentação de Ag aos linfócitos T depende dos alelos herdados por cada indivíduo.

O Ag exógenos são aqueles que entram nas células por via endocítica ou fagocítica. As APCs (macrófagos, linfócitos B e DCs) degradam os Ag internalizados em pequenos peptídeos, que se associam às moléculas MHC-II expressas nas membranas dos fagossomas. Os complexos MHC-peptído são seguidamente exportados para a superfície celular.

Por sua vez, os Ag endógenos são péptidos do próprio, ou péptidos procedentes de proteínas não próprias, mas expressas intracelularmente, como por exemplo de agentes infecciosos como vírus e bactérias intracelulares. Estes Ag associam-se às moléculas de MHC-I no ER, sendo posteriormente transportado para a membrana celular. Os linfócitos T citotóxicos, podem destruir células que apresentam Ag associados a complexos MHC-I, para os quais os seus receptores sejam específicos.

1.6.3. Células Dendríticas

As DCs, devem os seu nome às suas longas extensões membranares, semelhantes às dendrites das células nervosas. Existem quatro tipos de DCs: células de Langerhans, células dendríticas intersticiais, células mielóides e células dendríticas linfóides intersticiais. Todas estas DCs têm origem numa célula hematopóietica pluripotente, que segue diferentes vias de diferenciação, e forma DCs provenientes das linhagens mielóide ou linfóide, fenotipicamente diferentes (Fig. 1.3), que se distribuem de forma diferente no organismo. (Ardavin, *et al.*, 2001)

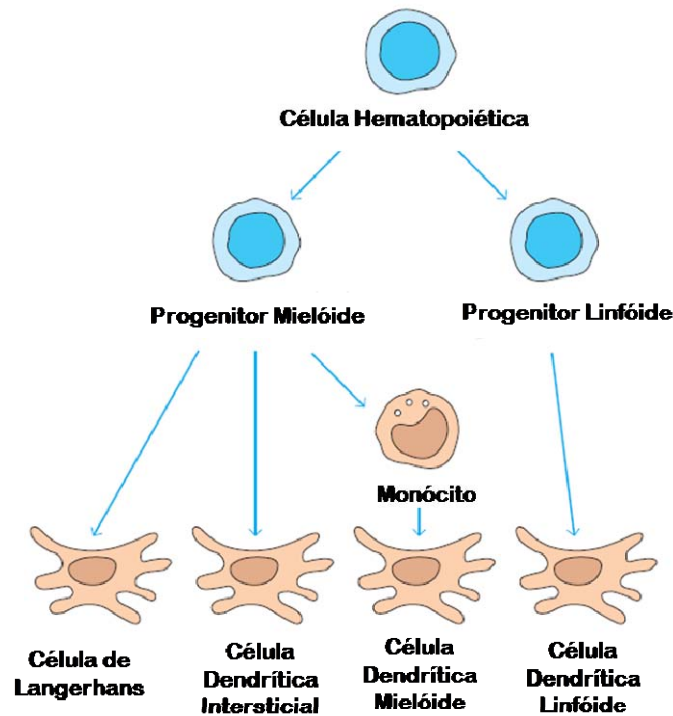


Fig. 1.3 – Vias de diferenciação das células hematopoiéticas nos diferentes tipos de células dendríticas (DCs) (adaptada de (Goldsby, *et al.*, 2007))

As DCs expressam níveis elevados de moléculas MHC-II e moléculas co-estimulatórias (necessárias para a activação dos linfócitos T), como é o caso das moléculas B7, que se ligam à família de receptores CD28 dos linfócitos T. (Collins, *et al.*, 2005) Por esta razão as estas células são consideradas as APCs mais potentes, desempenhando *in vivo*, um papel iniciador, estimulador e regulador da resposta mediada pelos linfócitos T (Ardavin, *et al.*, 2001), ao contrário dos macrófagos e linfócitos B, que apenas funcionam como APCs depois activados (Goldsby, *et al.*, 2007).

A internalização de Ag pelas DCs pode ser realizada por diferentes vias: macropinocitose, endocitose mediada por receptor, e fagocitose de partículas (por exemplo, corpos apoptóticos, fragmentos de células necróticas, vírus e bactérias).

Existe ainda um tipo de DCs – DCs foliculares – que não têm origem na medula óssea e não expressam moléculas MHC-II na sua superfície, no entanto estas células expressam elevados níveis de receptores membranares para anticorpos e a interacção destas DCs com linfócitos B é importante no estabelecimento da resposta imune dos linfócitos B.

O grande número de receptores na superfície das DCs permite que estas realizem a ingestão de uma grande variedade de agentes patogénicos, moléculas derivadas de tecido necrótico, e outras moléculas antigénicas. Os processos de adesão e fagocitose de microrganismo realizados pelas DCs dependem de diversos receptores, nomeadamente, CD14, *scavenger receptor-A* (SR-A) e receptores Fc (FcR) (Wallet, *et al.*, 2005).

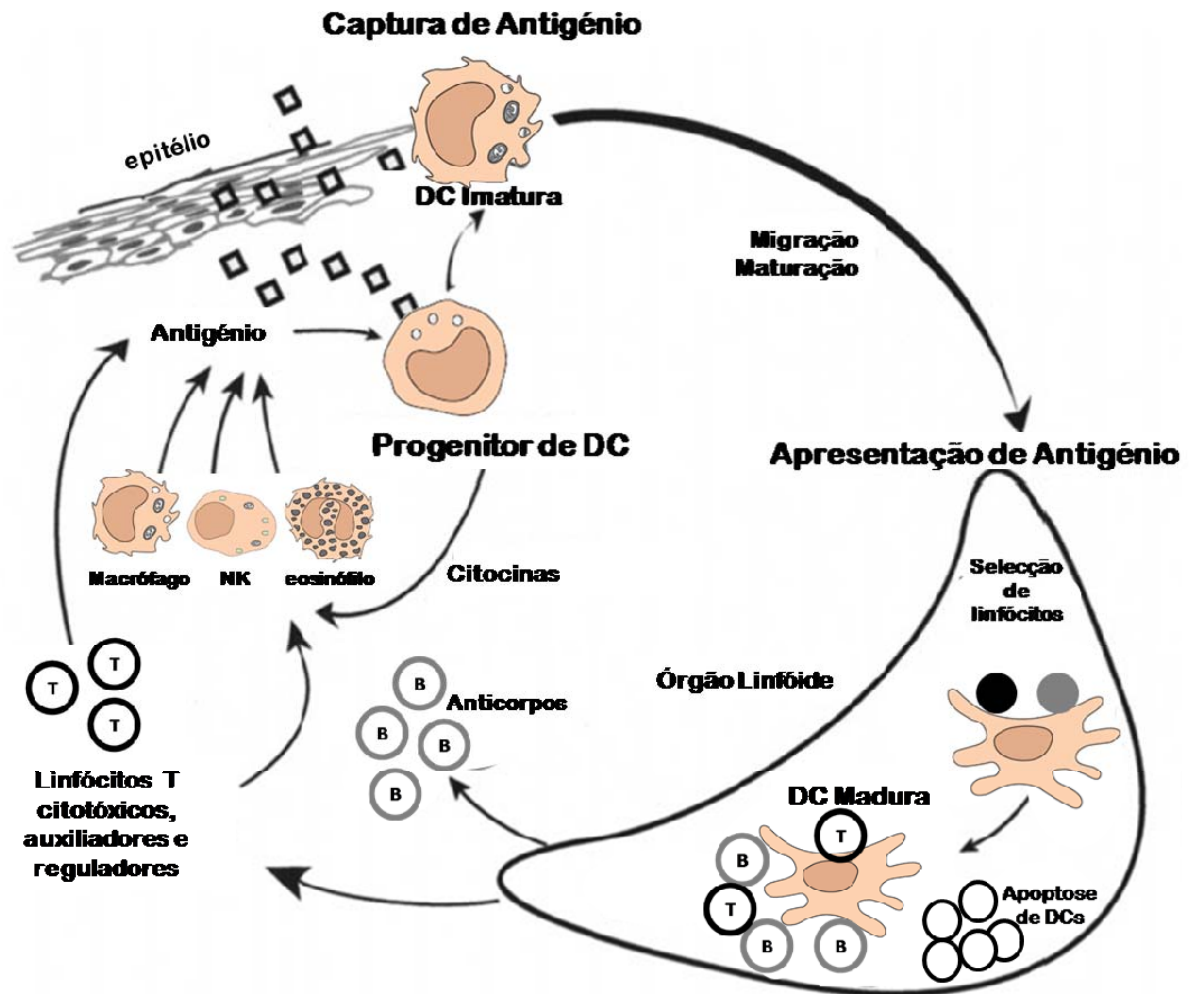


Fig. 1.4 – Ciclo de vida das Células Dendríticas (DCs). (adaptado de (Banchereau, *et al.*, 2000))

Os precursores mielóides e linfóides de DCs dão origem a células imaturas que circulam nos tecidos com elevada capacidade fagocítica, e expressam níveis inferiores de moléculas co-estimulatórias, tais como CD40 e B7. (Wallet, *et al.*, 2005)

Após o contacto com os Ag, as DCs migram para os órgãos linfóides, onde os linfócitos T específicos são positivamente seleccionados, dando início à resposta imune. As DCs apresentam os Ag através do complexo MHC-péptido, aos linfócitos Th (CD4+), que por sua vez regulam a resposta imune efectora, que compreende a activação de linfócitos B que expressam anticorpos específicos para o antígeno, bem como de linfócitos Tc CD8+, e de células NK, macrófagos e eosinófilos (Fig. 1.4) (Banchereau, *et al.*, 2000; Steinman, 2007).

Uma das características mais importantes das DCs é a sua mobilidade, diferente consoante o estado de maturação em que se encontra. As DCs migram desde a medula óssea até aos tecidos periféricos, onde realizam a captura de Ag.

O contacto das DCs com Ag induz alterações fenotípicas e funcionais drásticas nas DCs imaturas, que passam de células com elevada capacidade para capturar Ag, a eficientes APCs. Como APCs as DCs maduras passam a expressar menos moléculas de adesão na sua superfície, o que facilita a sua migração até aos órgãos linfóides, onde vão apresentar os Ag especificamente a linfócitos (Banchereau, *et al.*, 2000).

1.6.4. Aplicações Clínicas das Células Dendríticas

Na última década, investigadores e clínicos, têm realizado inúmeros estudos na tentativa de manipular o sistema imunitário. Inicialmente reuniram-se esforços na indução de imunidade contra agentes patogénicos, actualmente é dada mais relevância ao desenvolvimento de imunoterapias eficazes na prevenção e supressão de respostas proinflamatórias associadas a autoimunidade e transplantação, e terapias anti-tumorais (Gao, *et al.*, 2008). A actividade biológica das DCs na activação e regulação da resposta imune, torna a sua utilização em imunoterapias altamente relevante.

Actualmente, técnicas de cultura de DCs *ex vivo* permitem a administração de DCs autólogas manipuladas, produzindo vacinas “celulares” (Wallet, *et al.*, 2005), contra Ag tumorais (Fig. 1.5). Dado o numero reduzido destas células em sangue periférico, desenvolveram-se várias metodologias para produção eficaz e segura de DCs. Actualmente a metodologia mais eficaz é a utilização de monócitos isolados

do sangue do doente, que são diferenciados em mo-DCs *in vitro* pela adição de citocinas, nomeadamente factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e Interleucina-4 (IL-4).

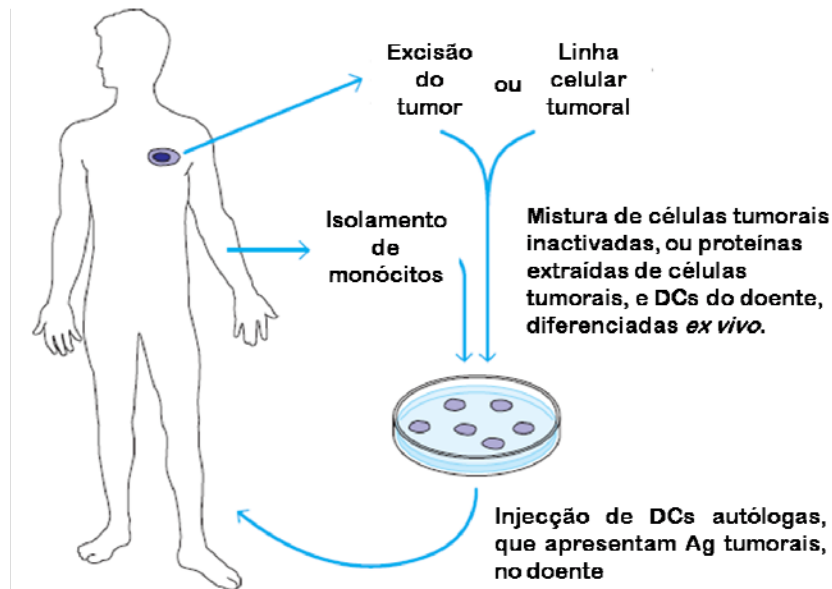


Fig. 1.5 - Método de produção de vacinas de células dendríticas (DCs) (adaptada de (Goldsby, *et al.*, 2007))

A produção de vacinas de DCs, compreende a colheita de células tumorais do doente, podendo ser utilizadas como alternativa linhas celulares tumorais, as células tumorais são inactivadas e posteriormente adicionadas a DCs autólogas. Após o contacto das DCs com os Ag das células tumorais, estas iniciam o seu processo de maturação perdendo a capacidade de capturar Ag e ganhando a capacidade de os apresentar. Quando maduras, as DCs são injectadas novamente no doente, onde apresentam os Ag tumorais e activam a resposta imune inata e adaptativa.

O grande problema dos Ag tumorais é a sua fraca imunogenicidade, uma vez que frequentemente os Ag tumorais são também proteínas expressas por células normais do próprio, mas cuja expressão nas células tumorais se encontra alterada ou é realizada de forma aberrante. Uma vez que esta técnica se baseia na exposição de DCs autólogas a Ag tumorais do próprio, é frequente as vacinas de DCs produzidas serem pouco imunogénicas, e incapazes de induzir resposta imune no doente. Assim, importa encontrar uma forma de manipular as vacinas de DCs de modo a torná-las mais imunogénicas (Gao, *et al.*, 2008).

Crespo et al, descreve um aumento do estado de maturação das DCs quando o NeuAc é removido pela acção da sialidase, da superfície destas células. Imunoreguladores *in vivo*, como o NeuAc, podem ser relevantes na indução de um fenótipo mais imunogénico das DCs, a sua manipulação pode alterar potencialmente a capacidade de adesão, migração e captura de Ag em DCs *in vitro* (Wallet, *et al.*, 2005).

1.7. Introdução ao Tema da Tese

Estudos anteriores do grupo descrevem um aumento da expressão de estruturas sialiladas à superfície das DCs, correlacionado com um aumento da expressão de várias ST, durante os processos de diferenciação e maturação de dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs).

Por outro lado, após a maturação destas células, verifica-se uma diminuição da sialilação, muito provavelmente devida a uma diminuição da expressão destas ST. A remoção do NeuAc foi descrita como tendo um efeito redutor da capacidade endocítica em mo-DCs (Videira, *et al.*, 2008). Posteriormente, verificou-se que a remoção do ácido siálico também induz a maturação das mo-DCs. Estes dados foram confirmados por modelos animais, tendo-se observado que DCs de ratinhos deficientes para determinadas ST apresentam também capacidade endocítica afectada e aumento de maturação. (Crespo, *et al.*, 2009)

O conjunto destes estudos evidencia o importante papel desempenhado pelo NeuAc e das ST na modulação da actividade das mo-DCs.

Alguns autores têm descrito a existência de ST na superfície celular –EctoST – em outras células do sistema imunitário, nomeadamente, linfócitos B, neutrófilos e progenitores CD34 (Gross, *et al.*, 1996;Rifat, *et al.*, 2008;Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004). Pensa-se que estas EctoST desempenham um papel modulador da actividade celular, permitindo a rápida alteração das propriedades da superfície da célula, o que permite regular diversos processos biológicos. Actualmente existem evidências do envolvimento das EctoST na regulação da adesão nos neutrófilos.

O elevado conteúdo de NeuAc na superfície das DCs, e o envolvimento deste açúcar na modulação de processos como endocitose e maturação, levou-nos a testar a

hipótese de existência de EctoST semelhantes às verificadas em neutrófilos e linfócitos B, nas DCs.

Neste trabalho procurou-se determinar a existência de enzimas na superfície das mo-DCs, isto é EctoST, capazes de transferir NeuAc para moléculas presentes na membrana celular.

Pretendeu-se ainda, caracterizar o tipo de actividade EctoST observada, no que diz respeito à sua cinética, localização e tipo de enzima.

Devido às características do NeuAc, e à sua capacidade de alterar as propriedades da membrana celular, alterando potencialmente o modo como as células interagem, procurou-se também determinar se a actividade de EctoST, possui algum papel na modulação dos processos biológicos das DCs, nomeadamente na capacidade endocítica e na adesão das mo-DCs.

Materiais e Métodos

2.1. Condições de Cultura:

As culturas primárias, de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) e monócitos, foram cultivadas em meio de cultura completo que consiste em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) (Sigma), 2 mM L-glutamina (Gibco/Invitrogen), 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco/Invitrogen), 1% de piruvato de sódio (Gibco/Invitrogen), 100 µg/mL penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen) e 50 µM 2-mercaptoetanol (Gibco/Invitrogen).

A linha celular de cancro de bexiga, T24, foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FCS), 6 mM L-Glutamina, 1 mM Piruvato de Sódio e 1% de Penicilina-Streptomicina.

2.2. Obtenção de Células Dendríticas Derivadas de Monócitos

As células dendríticas (DCs) foram obtidas a partir de monócitos diferenciados, que por sua vez foram isolados de *buffy coats* (fracção leuco-plaquetária do sangue) de doadores saudáveis fornecidos pelo Instituto Português do Sangue.

2.2.1. Separação de Células Mononucleares

A separação das células mononucleadas (monócitos e linfócitos) foi feita através de sucessivas centrifugações com diferenças de densidade com Ficoll. Em resumo, a amostra foi diluída em Tampão Fosfato Salino (PBS) (1x) na proporção de 2:3 (de sangue e PBS) e centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos para remoção das plaquetas e alguns eritrócitos. No final da centrifugação foi retirado grosseiramente o anel leucocitário e diluído 3x com tampão PBS (1x). O anel leucocitário diluído foi colocado lentamente sobre a solução de Ficoll, na proporção de 5:3 (de anel leucocitário e Ficoll), e centrifugado a 2500 rpm durante 20 minutos (sem travão), à temperatura ambiente. Após esta separação por diferença de densidades, o novo anel, formado essencialmente por monócitos e linfócitos, foi retirado cuidadosamente e lavado duas vezes com bastante tampão PBS (1x), sendo a

primeira lavagem realizada a 1400 rpm durante 10 minutos e a segunda a 800 rpm durante 5 minutos.

2.2.2. Isolamento de Monócitos

Os monócitos foram posteriormente isolados por selecção imunomagnética positiva usando *beads* magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), na proporção de 20 μ L de *beads* e 80 μ L de solução tampão por 3×10^7 células. Esta solução tampão consiste em PBS (1x) pH 7,2, com 0,5% BSA e 2 mM EDTA. A incubação foi realizada a 4°C durante 20 minutos, agitando ligeiramente a mistura a cada 5 minutos. No final deste tempo de incubação centrifugaram-se as células a 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspenderam-se as células em 500 μ L da mesma solução tampão, até um número máximo de 10^8 células. O isolamento dos monócitos foi realizado fazendo passar a suspensão celular por uma coluna LS (Miltenyi Biotec) inserida num MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec), lavando a coluna 3 vezes com 3 mL de solução tampão. A separação das células ocorre devido ao campo magnético exercido pelo separador que retém as células marcadas pelas *beads* magnéticas na coluna.

A fracção CD14 positiva, constituída maioritariamente por monócitos, foi recuperada após retirar a coluna do campo magnético e adicionando-lhe 5 mL de solução tampão, forçando a saída das células com um êmbolo fornecido pelo fabricante da coluna.

2.2.3. Diferenciação de Monócitos em Células Dendríticas

Os monócitos isolados foram cultivados no meio de cultura descrito no ponto 1.1, tendo sido adicionados 1000 U das citocinas Interleucina (IL-4) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (R&D Systems).

As culturas foram mantidas em placas de 24 poços (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemanha) a uma concentração de 10^6 células/ml, numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi renovado de dois em dois dias, retirando metade do volume de cada poço e adicionando a mesma quantidade de meio de cultura fresco

suplementado com IL-4 e GM-CSF nas quantidades descritas, dando origem a DCs imaturas ao fim de 6 dias.

Sempre que necessário, a maturação das DCs foi induzida ao 6º dia pela adição de 5 µg/ml de lipopolissacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma).

A eficiência do processo de separação de monócitos bem como a sua diferenciação em DCs e o estado de maturação destas células foram avaliados num citómetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, UK), usando os A monoclonais anti-CD14 (clone M5E2) (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA), anti-BDCA1 (AD5-8E7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) e anti-HLA-DR (L243) (PharMingen, San Diego, CA) conjugados com os fluorocromos, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE) e Aloficocianin, respectivamente.

2.3. Tratamento com Sialidase

As células foram lavadas duas vezes em tampão PBS (1x) e ressuspendidas em meio RPMI sem soro, previamente aquecido a 37°C. Foram adicionados 40 mU/mL (10⁶ células/mL) de sialidase de *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As células foram incubadas durante 90 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO₂, em tubos de vidro para evitar a adesão das células.

Após o tempo de incubação as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI completo a 4°C de modo a parar a acção da enzima.

Foram realizados ensaios controlo com enzima inactivada (submetida 20 minutos a 100°C), e na ausência de enzima.

2.4. Detecção da Actividade de Sialiltransferase de Membrana em mo-DCs

A detecção da actividade de sialiltransferase (ST) na membrana das células mo-DCs fez-se pela análise, por citometria de fluxo e microscopia confocal, da incorporação do composto CMP-5-FITC-NeuAc (*Cytidine-5'-monophospho-5-fluoresceinthioureido-N-acetylneuraminic acid*). Este composto, foi sintetizado enzimaticamente (contaminação com CMP em cada preparação < 5%) como descrito em (Brossmer e Gross, 1994), e gentilmente cedido pelo Dr. Reinhard Brossmer da University of Heidelberg.

2.4.1. Detecção de Actividade de Sialiltransferase na Superfície de mo-DCs por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo permite fazer uma análise multiparamétrica de células em suspensão. Esta técnica consiste na passagem de uma suspensão celular através de um feixe de radiação perpendicular ao fluxo. O feixe de radiação de excitação intercepta a partícula (célula), e sofre dispersão quer na direcção frontal (*forward scattering*- FSC), quer lateral (*side scattering*- SSC). A combinação dos dados obtidos pelos dois feixes permite-nos determinar a dimensão (FSC) e a granularidade/complexidade (SSC) das células em suspensão. A utilização de combinações de anticorpos contra marcadores celulares, conjugados com diferentes fluorocromos, permite ainda a diferenciação e caracterização de subpopulações (Silva, *et al.*, 2004).

Neste trabalho a análise e quantificação da actividade de Ectosialiltransferase na superfície das mo-DCs, foi realizada com base na detecção da incorporação de ácido siálico marcado com fluorescência (FITC-NeuAc), por citometria de fluxo.

As mo-DCs obtidas como descritas no ponto 2.2 (5×10^5 células) tratadas (e não tratadas) com sialidase foram ressuspendidas em 100 μ l de meio RPMI e incubadas durante 120 minutos a 37°C e a 4°C, com CMP-5-FITC-NeuAc numa concentração 5 μ mol/L. Foram realizados ensaios controlo na presença de 12 mM de CTP (*Cytidine 5'-triphosphate disodium salt*) (Sigma), um conhecido inibidor da actividade de ST.

A incorporação de ácido siálico fluorescente (FITC-NeuAc) à superfície das células foi determinada por citometria de fluxo, através da avaliação da Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

2.4.2. Determinação da Incorporação de Ácido Siálico na Superfície de mo-DCs ao Longo do Tempo

De modo a determinar a taxa incorporação de ácido siálico, na superfície das mo-DCs realizaram-se ensaios semelhantes ao descrito em 2.4.1 mas com diferentes tempos de incubação com CMP-5-FITC-NeuAc, nomeadamente 30, 60, 120, 180, 240 e 1200 minutos.

2.4.3. Avaliação do Tipo de Actividade Sialiltransferase na Superfície de mo-DCs

Paralelamente aos ensaios realizados com diferentes tempos de incubação com CMP-5-FITC-NeuAc (descritos em 2.4.2), realizaram-se ensaios onde a incubação das DCs com o ácido siálico fluorescente se deu na presença de meio previamente condicionado durante 24h por uma cultura de DCs, filtrado (NALGENE® Syringe Filter, 0,45 µm). Este ensaio teve como objectivo avaliar se a actividade ST, se devia à actividade de enzimas associadas à membrana das células, ou à acção de enzimas secretadas pelas células para o meio extracelular.

2.5. Microscopia Confocal de Varrimento Laser

A Microscopia Confocal de Varrimento Laser combina a tecnologia da microscopia de fluorescência com os mecanismos de obtenção de imagem digital, para gerar imagens com elevada definição. Esta técnica permite obter imagens de diferentes planos da preparação, e assim determinar a localização dos elementos marcados com compostos fluorescentes. Uma série de imagens obtidas em diferentes profundidades pode ser utilizada para reconstruir uma imagem tridimensional da amostra (Cooper e Hausman, 2004).

2.5.1. Detecção da Actividade de Sialiltransferase da Superfície de mo-DCs por Microscopia Confocal de Varrimento Laser

A detecção da sialilação da superfície das mo-DCs foi também analisada por microscopia confocal de varrimento laser.

Foram realizados ensaios de incubação das mo-DCs com o CMP-5-FITC-NeuAc em condições análogas às descritas nos pontos anteriores.

As células foram posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 800 rpm de modo a aderirem às lamelas (Culture Well Chambered Coverglass, Molecular Probes®, Invitrogen) previamente tratadas com 0,2 mg/mL de concanavalina-A (sigma). Foi retirado o sobrenadante, e os poços foram lavados 3 vezes com PBS (1x). De seguida as células foram fixadas com 3,7% de paraformaldeído (Sigma)

em PBS (1x). Após um novo passo de lavagens as células foram permeabilizadas com 0,1% de TritonX (Sigma), durante 20 minutos. Os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBS (1x), e o núcleo foi marcado com 1 μ M de TO-PRO-3 (Molecular Probes®, Invitrogen), durante 15 minutos. Depois de lavado o excesso de marcador nuclear com PBS (1x), foi adicionado meio de montagem VectaShield (Vector Laboratories) à preparação.

As imagens foram obtidas através do microscópio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystem, Mannheim, GmbH), com objectiva de imersão x40, e laser de 488 nm e 633 nm para excitação de FITC e TO-PRO3, respectivamente. A edição das imagens foi realizada com o Software Leica Confocal, LCS Lite 2.6 (Leica Microsystem).

2.6. Estudo do Efeito da Incorporação de FITC-NeuAc na Maturação das mo-DCs vs Efeito da Maturação na Incorporação de Ácido Siálico na Superfície das mo-DCs

Para avaliar se a incubação com o composto CMP-5-FITC-NeuAc ou incorporação do ácido siálico na superfície das mo-DCs teria capacidade de lhes induzir maturação, as células foram marcadas com anticorpo anti-HLA-DR antes e depois da incubação com o composto, e analisadas por citometria de fluxo. O nível de expressão destas moléculas à superfície das mo-DCs é um indicador do seu estado de maturação.

De modo a estabelecer se a incorporação de ácido siálico na superfície das células depende do estado de maturação das mo-DCs, realizaram-se ensaios com mo-DCs maturadas por estimulação com LPS (como descrito em 2.2) A maturação foi confirmada como descrito anteriormente (em 2.4.1), através de marcação com anticorpos anti-HLA-DR. A incorporação de CMP-5-FITC-NeuAc foi determinada por citometria de fluxo e microscopia confocal de modo semelhante aos ensaios realizados com mo-DCs imaturas (descritos nos pontos 2.4.1 e 2.5.1).

2.7. Determinação da Influência da Sialilação da Superfície das mo-DCs na Capacidade de Adesão destas a Células Tumorais

Realizaram-se ensaios para determinar se a sialilação da superfície das mo-DCs possui alguma função na capacidade de adesão das mo-DCs a células tumorais. Neste caso utilizou-se como modelo a linha tumoral de cancro de bexiga T24.

As mo-DCs imaturas (obtidas como descrito em 2.2) foram adicionadas a poços cultivados até à confluência com a referida linha celular. De modo a testar a influência do grau de sialilação, as mo-DCs adicionadas e a linha celular foram tratadas e não tratadas com sialidase, e incubadas na presença ou ausência de CMP-NeuAc (Sigma) não marcado com fluorescência.

Os poços com a linha celular foram lavados 2 vezes com meio RPMI. As mo-DCs foram ressuspensas em tampão TSM (Tris-HCl 20 mM/L; NaCl 150 mM/L; CaCl₂ 1 mM/L; MgCl₂ 1 mM/L; 0,5% BSA) e incubadas com as células presentes nos poços numa razão 5:1 (de linha celular e DCs), durante 2 horas a 37°C. (de acordo com a Fig. 2.1)

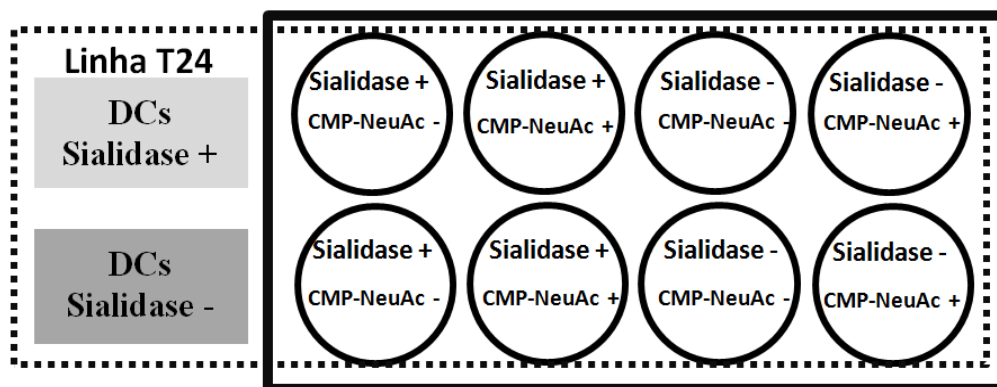


Fig. 2.1- Distribuição da linha celular T24 e das células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs), no ensaio de determinação da influência da sialilação da superfície celular na capacidade de adesão das mo-DCs.

Após o período de incubação, fizeram-se 3 lavagens com PBS (1x) de modo a remover as mo-DCs que não aderiram à linha celular. As restantes células (mo-DCs que permaneceram aderidas e células tumorais) foram removidas pela acção do tratamento com Tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen) durante cerca de 5 minutos a 37°C, e lavadas com meio RPMI suplementado com 10% de FCS. As células foram marcadas com anticorpo anti-HLA-DR, o que permitiu a distinção da população de

mo-DCs por citometria de fluxo. A adesão das mo-DCs às linhas celulares foi calculada com base na percentagem de mo-DCs presentes na suspensão celular.

2.8. Determinação da Influência da Sialilação da Superfície Celular na Actividade Endocítica das mo-DCs

Os ensaios de endocitose foram realizados com mo-DCs imaturas (obtidas como descrito em 2.2), tratadas e não tratadas com sialidase. As células foram incubadas durante 2 horas na presença ou na ausência de 100 μ M CMP-NeuAc (Sigma). Posteriormente, 5×10^5 células foram incubadas em meio RPMI e 10% FCS, com 1 mg/ml de ovalbumina conjugada com FITC (Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 1 hora a 37°. Foi realizado um controlo com mo-DCs incubadas com FITC-ovalbumina a 4°C. No final da incubação foi adicionado Azul Tripiano de modo a anular a fluorescência no exterior das células. As células foram lavadas 2 vezes com PBS (1x), e analisadas por citometria de fluxo.

2.9. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada através do *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças estatísticas foram analisadas pelo Teste de *t*-Student/ANOVA. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2. Resultados

3.1. Detecção da Actividade de Sialiltransferase na Superfície das mo-DCs

As Células Dendríticas derivadas de Monócitos (mo-DCs) apresentam elevados níveis de estruturas sialiladas, e elevada actividade de Sialiltransferases (ST) devido à expressão concomitante de diferentes genes que codificam para estas enzimas. (Videira, *et al.*, 2008)

Neste trabalho procurou-se determinar a existência de actividade de ST à superfície destas DCs.

Realizaram-se ensaios com mo-DCs intactas, isto é viáveis, (obtidas como descrito na secção 2.2 dos materiais e métodos), tratadas e não tratadas com sialidase e incubadas com um substrato dador de ST sintético, com uma fluorescência acoplada, o CMP-5-FITC-NeuAc, a 37°C, durante duas horas (como descrito no ponto 2.4.1).

Os resultados destes ensaios foram então analisados por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varrimento laser.

Através da técnica de citometria de fluxo, observou-se a incorporação significativa de ácido siálico fluorescente (FITC-NeuAC) em mo-DCs ($P < 0,05$). O FITC-NeuAc incorporado em cada ensaio foi quantificado pela intensidade média de fluorescência (MFI), detectada pelo citómetro de fluxo. Esta incorporação é inibida pela presença de CTP (*Cytidine 5'-triphosphate disodium salt*), um conhecido inibidor de actividade ST (Fig. 3.1 e 3.2).

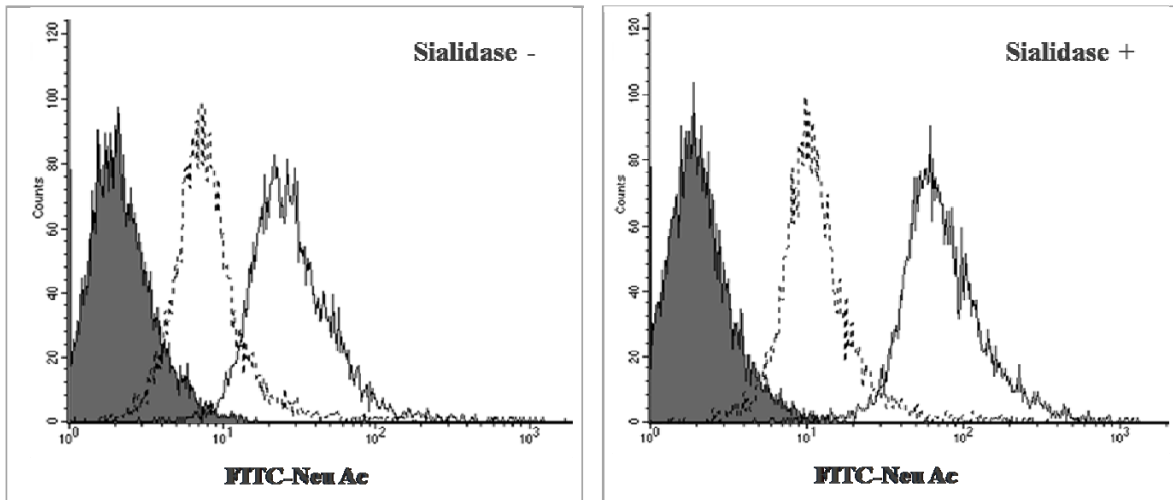


Fig. 3.1- Histogramas, resultantes da análise por citometria de fluxo representando a incorporação de fluorescência por parte de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc, durante 2h, a 37°C, previamente tratadas ou não tratadas com sialidase. (■ - células incubadas na ausência de CMP-5-FITC-NeuAc, controlo negativo, □ - células incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc). Ensaios controlo foram realizados na presença de CTP (▣ - células incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc, na presença de CTP). Os histogramas apresentados correspondem a uma única experiência representativa das 6 experiências que se realizaram independentemente nas mesmas condições.

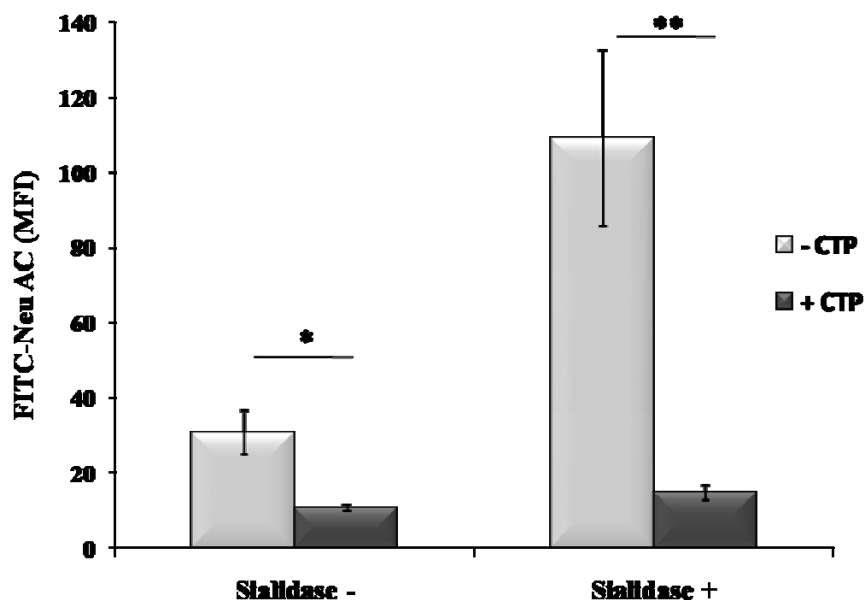


Fig. 3.2- Gráfico dos valores da intensidade média de fluorescência (MFI), obtidos pela análise por citometria de fluxo, da incorporação em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) de ácido siálico fluorescente (FITC-NeuAc). Estes valores foram obtidos com mo-DCs intactas, previamente tratadas ou não tratadas com sialidase, incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc, durante 2h, a 37°C. Ensaio controlo foram realizados na presença de CTP. A incorporação de fluorescência é significativamente maior em ambos os ensaios quando comparado com os ensaios controlo ($*P < 0,05$). As mo-DCs tratadas com sialidase apresentam uma incorporação cerca de 4 vezes superior comparadas com as células não tratadas ($**P < 0,01$). Cada barra representa a média de 5 ensaios independentes realizados nas mesmas condições.

A inibição da incorporação de ácido siálico na presença de CTP, corrobora com a hipótese de que a actividade observada é efeito da actividade de ST. Por outro lado, a inibição da reacção a 4°C (resultados não apresentados), sabendo que as ST actuam preferencialmente a 37°C, é outro indício de que se trata de uma reacção enzimática. mo-DCs não sujeitas ao tratamento com sialidase (enzima que remove o ácido siálico dos glicoconjugados da superfície da célula), incorporam significativamente o substrato FITC-NeuAc ($*P < 0,05$), quando comparado com a incorporação na presença do inibidor da actividade ST.

Quando as mo-DCs foram tratadas com sialidase, tornando disponíveis mais locais para a ligação do ácido siálico proveniente do dador sintético, observou-se uma incorporação quatro vezes superior de FITC-NeuAc ($P = 0,01$), sendo esta igualmente inibida pela presença de CTP. (Fig. 3.1 e 3.2)

Uma vez que o composto CMP-5-FITC-NeuAc não atravessa a membrana das células (Gross, *et al.*, 1996) é provável que a fluorescência observada se deva a uma actividade ST não intracelular, que transferira o ácido siálico marcado com fluorescência (FITC-NeuAc) do substrato dador para glicanos aceitadores na superfície celular.

De modo a confirmar esta suposição e a excluir a hipótese do composto ser absorvido ou endocitado, e incorporado por ST presentes no aparelho de Golgi, realizaram-se ensaios de microscopia confocal de varrimento laser (Fig. 3.3) que permitiram observar diferentes planos das células, e determinar a distribuição do composto fluorescente.

Estes ensaios permitiram confirmar a presença do composto fluorescente apenas na superfície das mo-DCs tratadas com sialidase, e a sua ausência quando o inibidor de ST, CTP está presente. Nos casos em que as células não foram previamente tratadas com sialidase, a fluorescência incorporada não foi suficiente para ser detectada pelos ensaios de microscopia.

Nos ensaios realizados com mo-DCs tratadas com sialidase, observou-se que nem todas as células estavam coradas com igual intensidade, no entanto a grande maioria apresenta fluorescência, verificando-se uma distribuição uniforme do composto fluorescente à superfície das células, e não no meio intracelular (Fig. 3.3).

Assim, a visualização ao microscópio dos ensaios de incorporação de ácido siálico fluorescente corrobora com os dados obtidos por citometria de fluxo, e apoiam a hipótese de existir actividade de ST na superfície das DCs, responsável pela transferência do ácido siálico para estruturas na superfície celular.

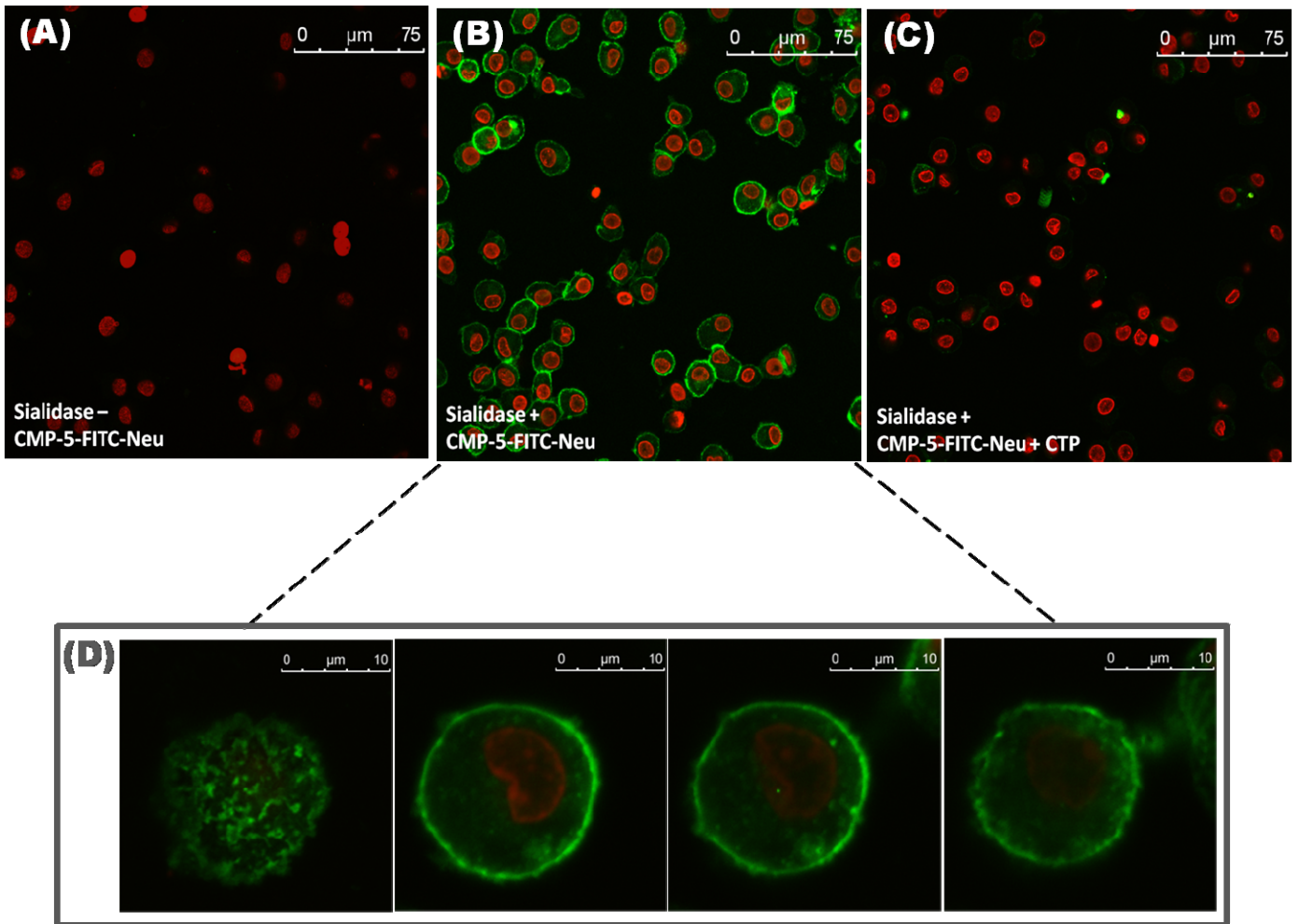


Fig. 3.3- Imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento laser, de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs tratadas) ou não com sialidase e incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc, durante 2h, a 37°C. As mo-DCs previamente tratadas com sialidase incorporam ácido siálico marcado (FITC-NeuAc) (a verde) uniformemente pela sua superfície (B e D). Na presença do inibidor da actividade de sialiltransferase (ST), CTP, bem como nas células que não foram tratadas com sialidase (A e C, respectivamente), não se verifica fluorescência na superfície das células. As imagens confocais de uma série Z (diferentes planos da preparação) (D) evidenciam a distribuição da fluorescência na superfície da célula.

Os núcleos das células foram corados com TO-PRO3 (a vermelho).

3.2. A Incorporação de Ácido Siálico na Superfície das mo-DCs ao Longo do Tempo

Realizaram-se ensaios com diferentes tempos de incubação das mo-DCs com CMP-5-FITC-NeuAc de modo a determinar a cinética da reacção catalisada pelas ST anteriormente detectadas. Estes ensaios foram analisados por citometria de fluxo e microscopia confocal de varrimento laser.

De acordo com a análise por citometria de fluxo, a incorporação de FITC-NeuAc é linear, aumentando ao longo do tempo, pelo menos durante 20 horas (Fig. 3.4). No entanto, a análise por microscopia confocal demonstrou que nos ensaios com tempos de incubação superiores a 4 horas, surge a presença do composto fluorescente em compartimentos no interior da célula, e o aumento da complexidade da morfologia da membrana celular (Fig. 3.5), de forma semelhante ao que acontece em mo-DCs previamente estimuladas com LPS (resultados não apresentados).

Mais uma vez, na presença do inibidor da actividade ST, CTP, não se verifica fluorescência à superfície nem internalização do composto.

Com base nestas observações, podemos inferir que a ocorrência de fluorescência no interior das mo-DCs durante incubações prolongadas com CMP-5-FITC-NeuAc não se trata de uma simples internalização deste substrato. Possivelmente este fenómeno deve-se á actividade das ST extracelulares que transferem o FITC-NeuAc para glicanos aceitadores na superfície da mo-DC, sendo estes posteriormente internalizados.

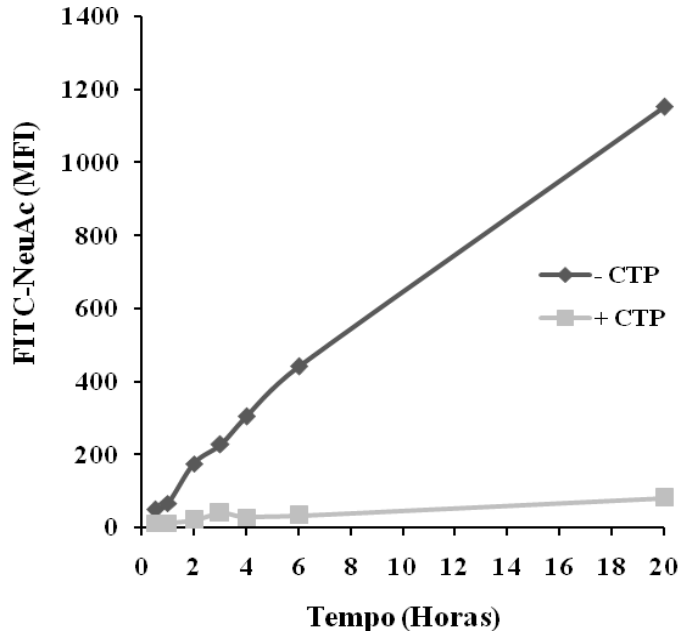


Fig. 3.4- Análise da detecção por citometria de fluxo da incorporação de ácido siálico marcado (FITC-NeuAc) ao longo de vários tempos de incubação, a 37°C, por mo-DCs intactas tratadas com sialidase, na presença e ausência do inibidor da actividade de ST, CTP.

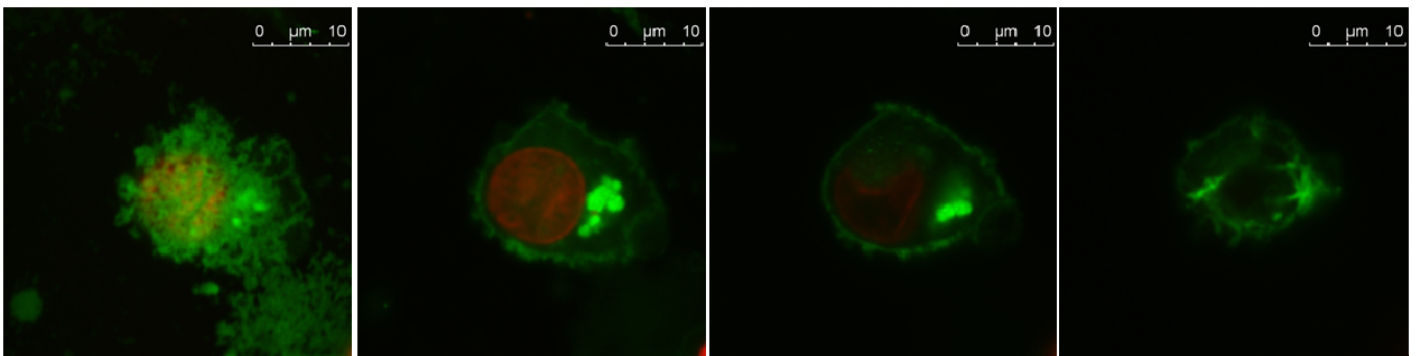


Fig. 3.5- Imagens de microscopia confocal com detalhe de uma série Z mostrando diferentes planos de uma célula dendrítica derivada de monócito (mo-DC) tratada com sialidase e incubada durante 20 horas com CMP-5-FITC-NeuAc. Observa-se um aumento da complexidade da membrana celular, semelhante ao verificado em mo-DCs estimuladas com lipopolissacárido (LPS), e a presença de ácido siálico marcado (FITC-NeuAc) em compartimentos no interior da célula.

3.3. Papel das ST Secretadas na Sialilação da Superfície das mo-DCs

Realizaram-se ensaios com meio previamente condicionado pela cultura de mo-DCs, de modo a determinar se a actividade ST observada na superfície se devia a enzimas secretadas para o meio pelas mo-DCs, ou a proteínas presentes na parte externa da membrana celular.

Para tal, conduziram-se ensaios paralelos, onde a incubação das mo-DCs com CMP-5-FITC-NeuAc foi realizada em meio RPMI fresco, e em meio previamente condicionado pela cultura de mo-DCs (24 horas). Uma vez que o soro fetal contém alguma actividade ST residual (Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004), ambos os ensaios foram realizados em meio sem adição de soro.

Não se verificaram alterações significativas na incorporação de FITC-NeuAc nos ensaios realizados com meio condicionado, em comparação com os ensaios realizados com meio não condicionado, o que nos leva a inferir que a actividade observada não se deve a enzimas secretadas, mas sim a ST presentes na superfície das mo-DCs. (Fig. 3.6)

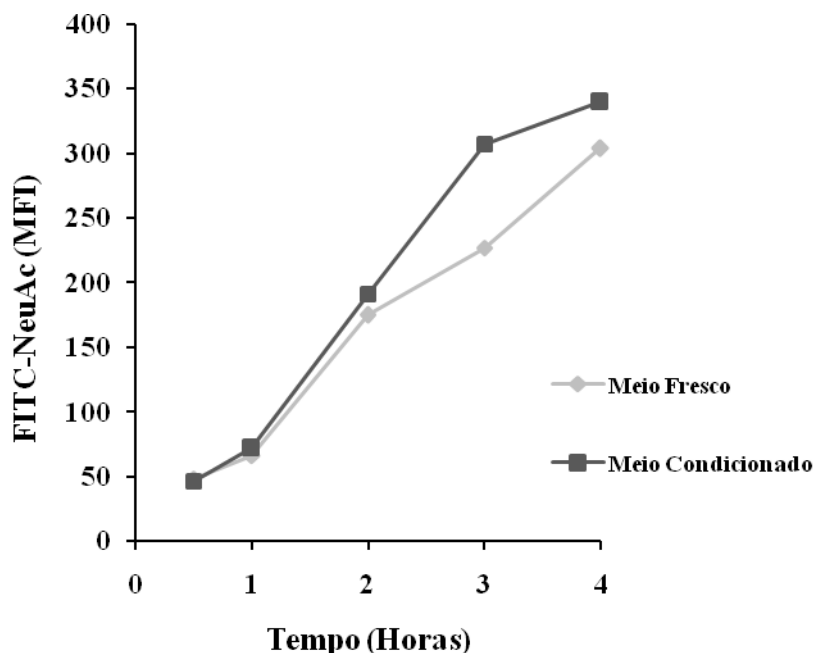


Fig. 3.6- Análise dos valores de intensidade média de fluorescência (MFI), obtidos por citometria de fluxo, da incorporação de ácido siálico marcado (FITC-NeuAC) em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs), ao longo do tempo, durante

incubação com meio fresco, ou meio condicionado, isto é proveniente do sobrenadante de culturas de 24 h de mo-DCs.

Se a actividade observada se devesse a enzimas secretadas, era esperada uma actividade muito superior na primeira leitura (30 minutos), com gráfico sem hipérbole, nos ensaios em que as células foram incubadas com meio previamente condicionado. Isto, não se verificou e em ambos os ensaios a taxa de incorporação de FITC-NeuAc é semelhante, sugerindo que as ST responsáveis por esta actividade estão igualmente presentes nos dois ensaios decorridos em paralelo, independentemente do meio ser previamente condicionado.

3.4. Capacidade de Indução da Maturação pelo CMP-5-FITC-NeuAc

O facto de as mo-DCs internalizarem o composto fluorescente, e alterarem a sua morfologia quando incubadas por períodos superiores a 4 horas com CMP-5-FITC-NeuAc, e sabendo que o processo de maturação acarreta grandes alterações biológicas nas mo-DCs, capazes de activarem ou inibirem determinadas funções, levantou a questão se este composto seria capaz de induzir a maturação das DCs?

Assim, realizaram-se ensaios em que as mo-DCs foram marcadas com anticorpo anti-HLA-DR (umas das moléculas mais representativas do MHC classe II) depois do período de incubação com e sem CMP-5-FITC-NeuAc, de modo a determinar o seu estado de maturação.

A análise por citometria de fluxo destes ensaios, não demonstrou um aumento significativo da expressão de moléculas HLA-DR nas células, após incubação com o composto. Estes resultados permitem concluir que o CMP-5-FITC-NeuAc não induz a maturação das mo-DCs. (Fig. 3.7)

De notar, que tal como descrito anteriormente, observou-se, independentemente da presença de CMP-5-FITC-NeuAc, um aumento significativo da expressão de HLA-DR após tratamento das células com sialidase (Crespo, *et al.*, 2009).

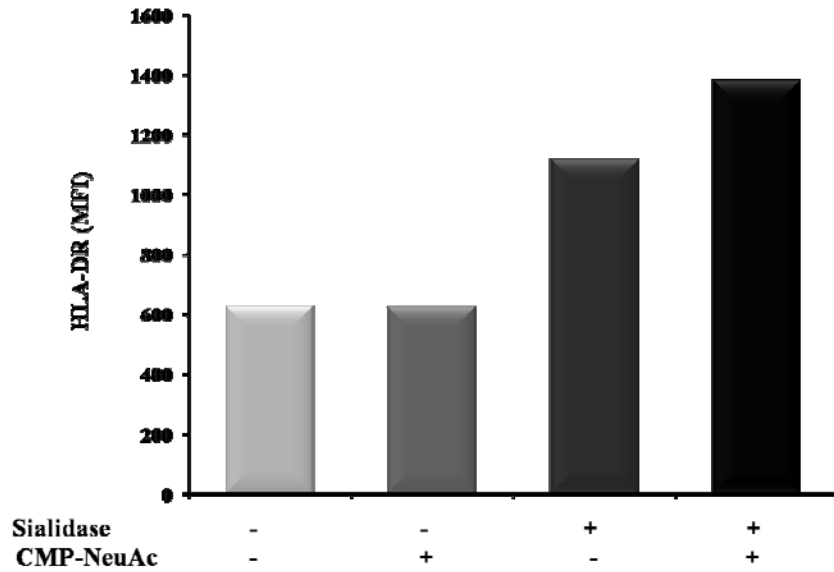


Fig. 3.7- Gráfico dos valores da intensidade média de fluorescência (MFI), resultantes da marcação de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) com anticorpo anti-HLA-DR, obtido por citometria de fluxo. As células incubadas com CMP-5-FITC-NeuAc apresentam aproximadamente os mesmos níveis de expressão da molécula HLA-DR que as células incubadas na ausência do composto.

3.5. Incorporação de Ácido Siálico em mo-DCs Maduras

Uma vez que foi descrito uma diminuição da expressão de ST e modificações no perfil de sialilação quando ocorre a maturação das mo-DCs (Videira, *et al.*, 2008), formulou-se a hipótese da actividade de ST de superfície estar alterada em mo-DCs maduras, previamente estimuladas com lipopolissacárido (LPS) de *Echerichia coli*. Como seria de esperar, as mo-DCs estimuladas com LPS apresentam uma expressão de HLA-DR na sua superfície, muito superior à verificada em DCs imaturas (Fig.3.8).

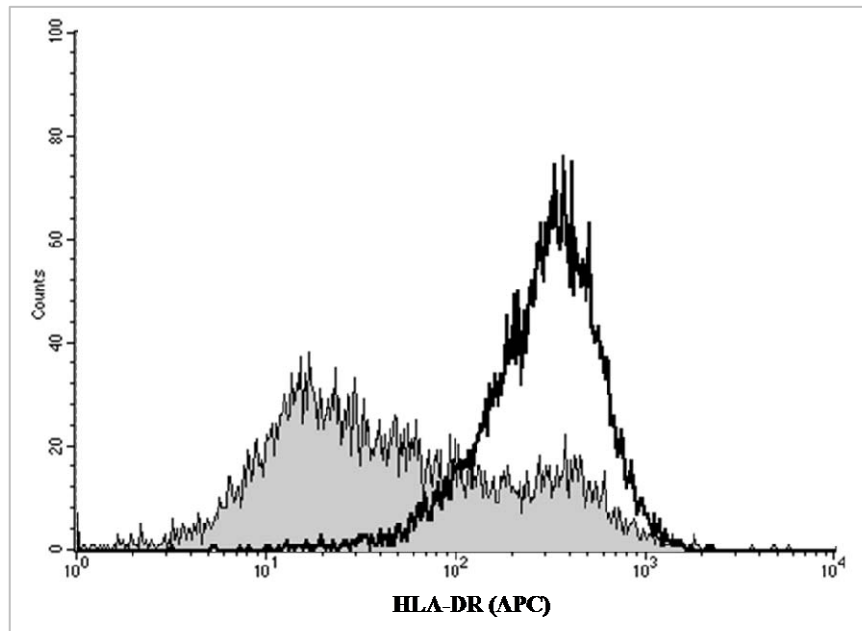




Fig. 3.8- Histograma, obtido por análise por citometria de fluxo, da marcação com anticorpo anti-HLA-DR, das células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) maduras ou não, com lipopolissacárido (LPS). As mo-DCs estimuladas com LPS apresentam um aumento significativo da expressão da molécula HLA-DR, que corresponde ao estado activado destas células. ( - DCs Imaturas;  - DCs estimuladas com LPS)

A análise de mo-DCs maduras não tratadas com sialidase, por citometria de fluxo revela um aumento significativo na incorporação de ácido siálico marcado com fluorescência ($P= 0,027$) quando comparado com mo-DCs imaturas incubadas nas mesmas condições.

Apesar de se verificar uma tendência das mo-DCs maduras tratadas com sialidase, para incorporarem mais ácido siálico do que as mo-DCs imaturas nas mesmas condições, quando comparamos a incorporação de FITC-NeuAc em células imaturas e maduras tratadas com sialidase, o aumento de incorporação do composto não é estatisticamente significativo. (Fig. 3.9)

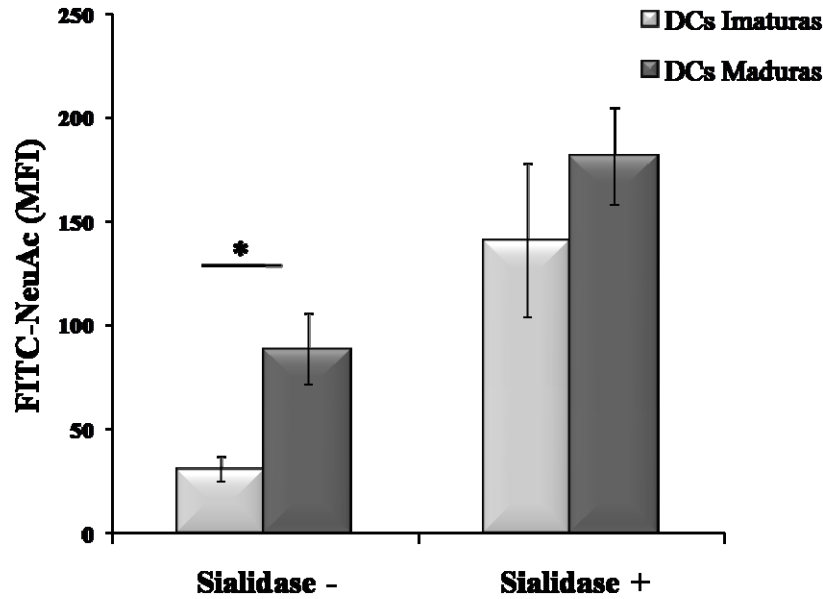


Fig. 3.9- Valores de intensidade média de fluorescência (MFI) da incorporação de ácido siálico marcado (FITC-NeuAc), obtidos pela análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) maduras e imaturas, tratadas e não tratadas com sialidase. (* P =0,027)

O aumento de actividade das ST de superfície em mo-DCs maduras, pode dever-se a alterações na transcrição de genes ST e tradução das respectivas proteínas que ocorrem durante o processo de maturação, ou ao aumento da expressão de glicanos não sialilados, que se tornam aceitadores de FITC-NeuAc na superfície das mo-DCs. O aumento de fluorescência verificado pela análise por citometria de fluxo, pode ainda dever-se à alteração da morfologia das células estimuladas com LPS. As mo-DCs maduras apresentam uma morfologia muito irregular, quando comparadas com mo-DCs imaturas, com maior complexidade da sua membrana (por exemplo presença de pseudópodes). Estas diferenças são visíveis nas imagens obtidas por microscopia confocal (Fig. 3.10), que nos sugerem que o aumento de fluorescência verificado nas mo-DCs maduras poder-se-á dever a uma maior complexidade da membrana celular, e não a uma maior expressão de ST de superfície.

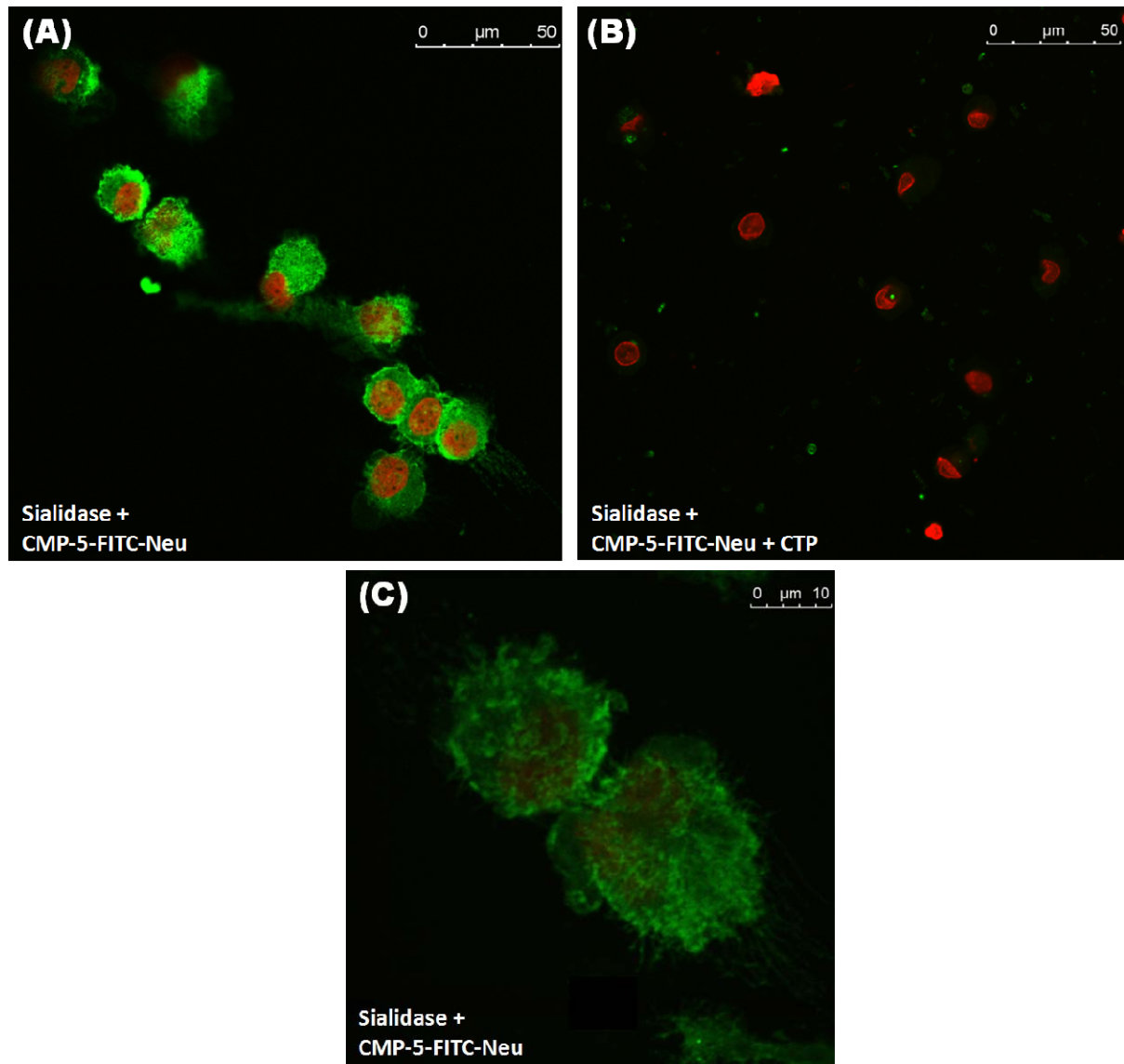


Fig. 3.10- Imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento laser. Células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) maduras tratadas com sialidase, na ausência (A, C) ou presença (B) de CTP. Pormenor do aumento de complexidade da morfologia da superfície celular (C), em comparação com as mo-DCs imaturas (Fig. 3.3, (D)).

3.6. Influência dos Resíduos de Ácido Siálico na Capacidade de Adesão das mo-DCs

O processo de adesão das mo-DCs a outras células, nomeadamente a células endoteliais e tumorais, é um importante processo da biologia das DCs. Isto permite-

lhes detectar e identificar antigénios, desencadear uma resposta específica, e, no caso de células endoteliais migrar para locais onde a sua função é necessária

Partindo do pressuposto que a adição ou remoção dos resíduos de NeuAc da superfície celular altera as características da membrana, alterando conseqüentemente a capacidade das mo-DCs interagirem com outras células ou receptores, realizaram-se ensaios que visaram determinar se a actividade das ST de superfície modela este processo. Por motivos experimentais só foi possível nesta tese analisar a adesão mo-DCs a células tumorais.

Nos nossos ensaios observou-se que o tratamento de mo-DCs com sialidase parece aumentar a capacidade destas células aderirem a células de linha celular de cancro de bexiga, T24.

Apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas, verificou-se uma tendência das mo-DCs tratadas aderirem mais a células tumorais nos três ensaios realizados. A adição de CMP-NeuAc parece aumentar a capacidade de adesão em ambas condições, i.e. mo-DCs tratadas e não tratadas com sialidase (Fig. 3.11).

Assim, apesar do teor de ácido siálico na superfície das mo-DCs parecer ter alguma influência na capacidade de adesão das mo-DCs a células tumorais, o efeito da adição de NeuAc pelas ST de superfície na capacidade de adesão, não é claro.

Observou-se, que o teor de ácido siálico na superfície das células da linha tumoral, T24, não influencia a capacidade de adesão das mo-DCs à linha celular (dados não apresentados). Este facto corrobora com os resultados obtidos em ensaios anteriores, onde se tentou determinar a expressão de ST de superfície de linhas tumorais (dados não apresentados), não se tendo observado actividade de ST de membrana neste tipo de célula. Estes dados sugerem que o teor de NeuAc na superfície desta linha tumoral, não é tão importante para a biologia destas células, como se supõe ser para as mo-DCs, que possuem uma enzima específica para repor os níveis deste açúcar.

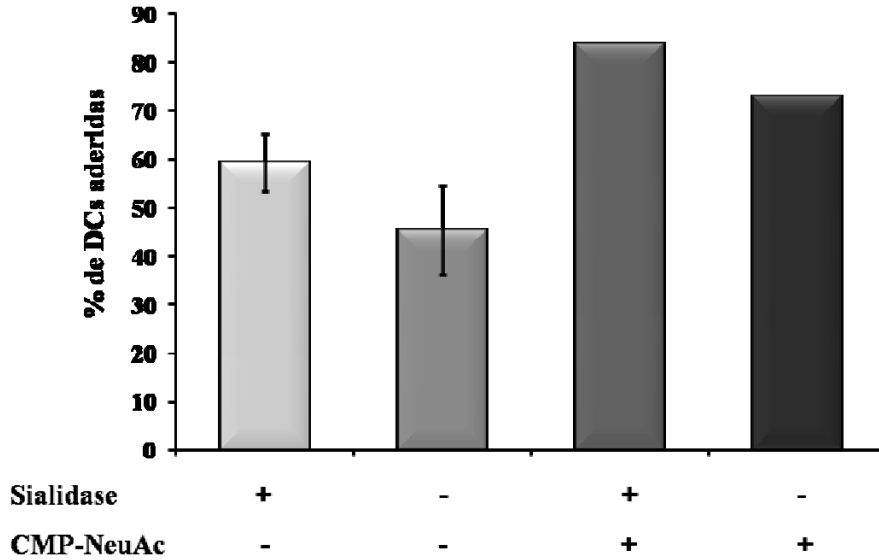


Fig. 3.11 – Capacidade de adesão de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) tratadas e não tratadas com sialidase, na presença ou ausência de CMP-NeuAc, à linha celular de cancro de bexiga. A percentagem de mo-DCs aderidas foi calculada pela selecção positiva, por citometria de fluxo, das células marcadas com o anticorpo anti-HLA-DR.

3.7. Influência da Sialilação da Superfície Celular na Capacidade Endocítica das mo-DCS

Uma vez que estudos anteriores associaram alterações na sialilação das mo-DCs a diferenças na sua capacidade endocítica, e, dada a capacidade das mo-DCs para realizarem a internalização de antígenos, através de diversos mecanismos de endocitose, realizaram-se ensaios que visaram determinar se a actividade ST observada na superfície das células, teria alguma influência na regulação deste mecanismo.

Assim, comparou-se a capacidade das mo-DCs endocitarem ovalbumina-FITC, um antígeno usado comumente para este tipo de estudos, após incubação das células na presença ou ausência de CMP-NeuAc.

Nestes ensaios utilizou-se um substrato dador de ST não fluorescente, de modo a não interferir com a análise da fluorescência da ovalbumina, na interpretação dos resultados de endocitose.

Observou-se uma diminuição na capacidade de endocitose nas mo-DCs previamente tratadas com sialidase, determinada pelos valores de MFI obtidos por citometria de fluxo, sendo este resultado concordante com as observações anteriores referidas em Videira et. al., 2008. De facto, foi descrita uma diminuição de cerca de 20% da capacidade das mo-DCs para internalizarem ovalbumina após o tratamento com sialidase. Quando as mo-DCs são incubadas na presença de CMP-NeuAc também se verifica uma capacidade endocítica diminuída, mais evidente nas células que foram previamente tratadas com sialidase (31%) (Fig. 3.12).

Estes dados indicam que, a sialilação mediada pelas ST de superfície das mo-DCs pode representar uma regulação negativa do processo de internalização de antígenos. Uma vez que, não se verifica um decréscimo da viabilidade celular nos ensaios em que as células foram incubadas com CMP-NeuAc é pouco provável que este decréscimo da capacidade endocítica se deva a um efeito citotóxico do composto.

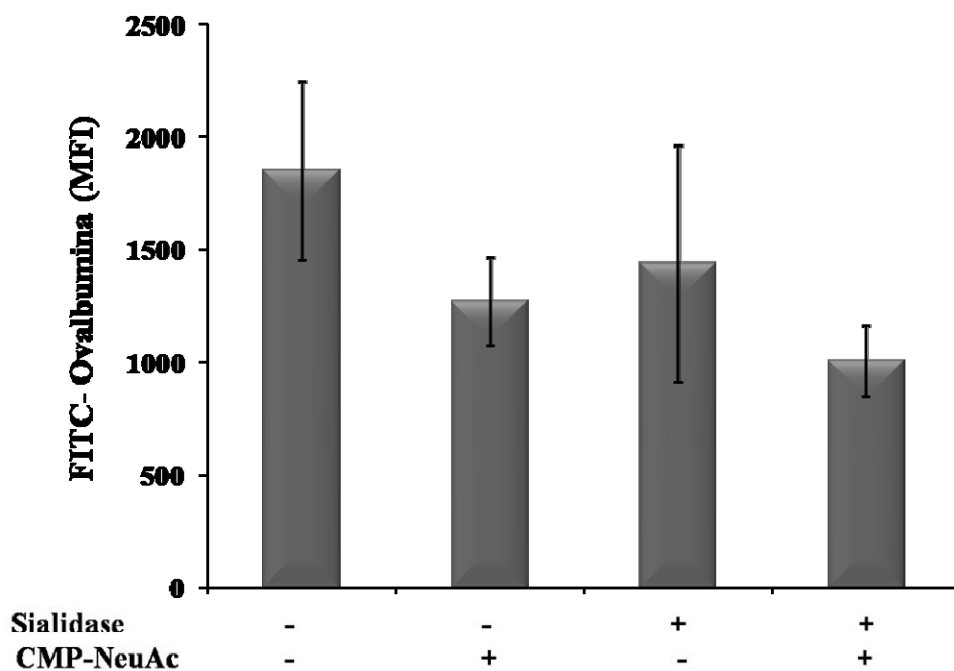


Fig. 3.12- Capacidade endocítica de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) tratadas e não tratadas com sialidase, na presença ou ausência do substrato de sialiltransferase (ST), CMP-NeuAc. A capacidade endocítica foi determinada pelos valores de intensidade média de fluorescência de MFI, correspondentes à endocitose de ovalbumina-FITC, obtidos pela análise por citometria de fluxo.

4. Discussão

A diversidade e importância das estruturas sialiladas, e em particular do ácido siálico (NeuAc) na resposta imune, inata e adaptativa, têm sido salientadas em vários estudos (Marino, *et al.*, 2004; Nasirikenari, *et al.*, 2006), e mais recentemente, o NeuAc tem sido associado à regulação da imunologia das células dendríticas (DCs) (Crespo, *et al.*, 2009; Jenner, *et al.*, 2006; Videira, *et al.*, 2008).

O presente trabalho pretendeu avaliar o envolvimento de determinadas estruturas sialiladas, sintetizadas por acção de sialiltransferases (ST) de superfície membranar na actividade das Células Dendríticas humanas derivadas de monócitos (mo-DCs).

As ST estão preferencialmente localizadas no complexo de Golgi, onde catalisam a transferência do grupo NeuAc do composto CMP-NeuAc para a posição terminal dos glicoconjugados. No entanto, foi descrita actividade ST na superfície celular em linfócitos B, neutrófilos e precursores hematopoiéticos CD34+. Estas enzimas têm sido descritas por alguns autores como Ectosialiltransferases (EctoST), por a sua actividade se realizar no exterior/membrana celular e não no complexo de Golgi (Gross, *et al.*, 1996; Rifat, *et al.*, 2008; Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004). Dada a elevada relevância do NeuAc na biologia das DCs, o objectivo inicial do trabalho foi determinar a existência de uma actividade semelhante na superfície das mo-DCs. Pela natureza da actividade enzimática determinada neste trabalho, consideramos igualmente que existem ST na membrana das DCs, ou seja EctoST, capazes de re-sialilar rapidamente a superfície celular. O facto de as mo-DCs possuírem na sua superfície uma enzima com capacidade de repor rapidamente o conteúdo de NeuAc, constitui um novo indício da importância deste açúcar para a modulação da actividade destas células.

4.1. As mo-DCs possuem na sua superfície ST que permitem a sua rápida re-sialilação

Dado o elevado grau de sialilação verificado nestas células e o facto deste modular determinados aspectos da DC, tais como maturação e captura antigénica, não surpreende o facto de estas possuírem meios de repor e modular rapidamente o

conteúdo de NeuAc da sua superfície. Possivelmente é esta actividade que permite às DCs repor os seus níveis de sialilação durante diferentes processos biológicos, tais como, diferenciação celular e maturação, ou interacção com agentes patogénicos possivelmente com algum impacto funcional (Trottein, *et al.*, 2009; Videira, *et al.*, 2008).

A remoção dos resíduos de NeuAc, através do tratamento das mo-DCs com sialidase, induz grandes alterações funcionais nas células descritas anteriormente por Videira *et al.* 2008, nomeadamente indução da maturação e diminuição da capacidade endocítica. O efeito da deficiência de resíduos de NeuAc foi ainda comprovada pelo estudo *in vivo* em ratinhos deficientes para ST específicas, descrito por Crespo *et al.*, 2009.

O presente estudo demonstrou a existência de enzimas na superfície celular, responsáveis pela adição de NeuAc aos glicanos da membrana destas células, modulando a re-sialilação da superfície das DCs.

É pouco provável que as enzimas responsáveis pela actividade ST observada se localizem no complexo de Golgi, uma vez que os ensaios decorreram com mo-DCs intactas e a membrana celular é impermeável ao substrato utilizado, CMP-5-FITC-NeuAc (Gross, *et al.*, 1996). Este facto é ainda apoiado pelas imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento laser, onde não se verifica a internalização do composto fluorescente após duas horas de incubação com este substrato. Nos ensaios de microscopia observou-se uma distribuição uniforme do composto FITC-NeuAc na superfície celular, corroborando com a hipótese de se tratar da actividade de uma ST presente na superfície da membrana celular.

4.2. A Actividade Sialiltransferase Observada Não se Deve a Enzimas Secretadas para o Meio Extracelular pelas mo-DCs

No nosso estudo excluímos a hipótese da actividade de ST observada ser devido a ST solúveis secretadas pelas células para o meio extracelular, uma vez que, não se verifica um aumento da incorporação de NeuAc, quando as células são incubadas na presença de meio previamente condicionado por mo-DCs. Se a actividade observada se devesse a uma enzima ST solúvel era esperado que o meio previamente condicionado apresentasse um número muito superior de enzimas em solução, e

consequentemente uma maior actividade ST com menor tempo de incubação, nos ensaios na presença de meio condicionado em comparação com os ensaios realizados em meio fresco.

Ao analisar-se por citometria de fluxo a cinética da reacção das EctoST nas mo-DCs verificou-se que a incorporação de NeuAc aumenta ao longo do tempo. No entanto, quando observarmos as imagens de microscopia confocal de varrimento laser, notamos que a este aumento da incorporação de FITC-NeuAc está associada a internalização do composto. É provável a internalização do composto fluorescente, verificada após 4 horas de incubação com o substrato CMP-5-FITC-NeuAc, em compartimentos intracelulares, seja o resultado de um processo de reciclagem realizado pelas células. Note-se que esta internalização é inibida na presença de CTP (*Cytidine 5'-triphosphate disodium salt*), o inibidor da actividade ST, pelo que podemos afirmar que o composto apenas é internalizado depois de associado às glicoproteínas de superfície pela acção das EctoST.

Assim, o contínuo aumento de fluorescência observado ao longo do tempo, pode dever-se ao facto das mo-DCs internalizarem as proteínas sialiladas da superfície, acumulando o composto fluorescente (NeuAc) no seu interior, e disponibilizando mais proteínas aceitadoras, num hipotético sistema de reciclagem dos componentes celulares presentes na membrana.

4.3. É Possível que a Sialilação Mediada pelas Ectosialiltransferases Presentes na Superfície das mo-DCs Modele Vários Mecanismos Celulares

Apesar de estas enzimas EctoST serem capazes de sialilar os receptores de superfície alterando potencialmente e rapidamente a sua função, o seu papel a nível fisiológico não é óbvio.

No entanto, a presença deste substrato no meio extracelular foi descrita por vários autores (Nasirikenari, *et al.*, 2006; Rest, *et al.*, 1994). Assim, mesmo que estas enzimas realizem a sua actividade com substrato proveniente de uma via hipotética, que dependa do transporte activo de CMP-NeuAc para o exterior da membrana celular, as EctoST representam um processo de sialilação mais rápido que através da síntese de novo de glicoconjugados. Estas enzimas podem funcionar na rápida

remodelação dos glicanos da superfície celular, sendo capazes de aumentar ou reconstituir os níveis de sialilação (Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004).

4.3.1. A Actividade Ectosialiltransferase em mo-DCs Modela o Processo de Endocitose

Estudos anteriores revelaram a influência do NeuAc nos mecanismos de endocitose, pelo que se testou a hipótese da actividade das EctoST terem uma função na modulação deste processo.

Crespo *et al.*, 2009, descreve uma diminuição da capacidade endocítica das mo-DCs, cujos resíduos de NeuAc da superfície foram removidos pela acção da enzima sialidase. No entanto, nos ensaios com células re-sialiladas pela acção das EctoST, tratadas ou não previamente com sialidase observou-se igualmente uma diminuição na capacidade endocítica das mo-DCs.

Estes resultados aparentemente contraditórios, onde observamos que ambos, diminuição e aumento do grau de sialilação, diminuem a capacidade endocítica das mo-DCs, são muito provavelmente dois fenómenos independentes se tivermos em conta diferentes considerações:

Por um lado, o tratamento com sialidase induz a maturação das mo-DCs, o que não acontece nas mo-DCs re-sialiladas por acção das EctoST, e que explica no primeiro caso a diminuição da capacidade das mo-DCs para realizarem a internalização de antígenos. (Crespo, *et al.*, 2009)

Por outro lado, tendo em conta a complexidade das moléculas na superfície das células, é possível que os sialoglicanos resultantes interfiram com a capacidade de reconhecimento dos antígenos pelas células, por alterarem a carga global das mo-DCs e consequentemente contribuírem para um efeito de repulsão.

O tratamento com a sialidase (de *C. perfringens*), cliva diferentes tipos de ligações glicosídicas, no entanto a actividade EctoST poderá não ser tão abrangente nas ligações que catalisa. Assim, podemos estar a remover mais ligações de NeuAc da superfície celular por acção da sialidase, do que aquelas que as EctoST conseguem repor.

O tipo de ligação catalisado pelas ST de superfície foi determinado em linfócitos B e progenitores de células hematopoiéticas CD34⁺, como sendo essencialmente uma ligação do tipo α -2,6 NeuAc (Gross, *et al.*, 1996; Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004), no

presente trabalho realizaram-se ensaios com diferentes lectinas (proteínas que reconhecem glicanos específicos), *Sambucus nigra* lectin (SNA) que reconhece as ligações de α -2,6-NeuAc e *Maackia amurensis* lectin (MAA) que reconhece as ligações α -2,3 em cadeias sialiladas (dados não apresentados), no entanto os resultados obtidos não foram conclusivos no que diz respeito ao tipo de ligação catalisada pelas EctoST em mo-DCs, sendo por isso necessários novos estudos que permitam determinar a natureza das estruturas formadas por estas enzimas. Apesar disso, e tendo em conta que a incorporação é superior em mo-DCs maduras, pensamos que a ligação catalisada pelas ST na superfície é uma ligação do tipo α 2,6-NeuAc, uma vez que está amplamente descrita uma diminuição da expressão de ligações α 2,6-NeuAc em DCs maduras, o que torna disponíveis mais aceitadores para este tipo de ligação (Jenner, *et al.*, 2006; Videira, *et al.*, 2008).

Por último, o efeito da sialilação mediada pelas EctoST na endocitose pode estar relacionado com a presença de várias moléculas na superfície da célula. De facto, as mo-DCs humanas expressam uma vasta gama de receptores, entre eles Siglecs, que reconhecem glicanos terminados por NeuAc (Varki, 2006), que poderão ter preferência por estruturas sintetizadas pelas EctoST. As Siglecs têm a capacidade de interagir *in trans* com ligandos sialilados presentes em outras células, mas também reconhecem ligações *in cis* presentes nas próprias células, contribuindo para a modulação do sistema imunitário. Apesar das funções fisiológicas das Siglecs não estarem totalmente esclarecidas, sabe-se que, a Siglec-5 e outras CD33 relacionadas com as Siglecs são capazes de mediar endocitose em células mielóides (Crocker e Redelinguys, 2008; Lock, *et al.*, 2004; Schauer, 2009). Existem ainda outros receptores imunológicas relevantes como as galectinas que reconhecem glicanos não sialilados, e a adição de NeuAc pelas EctoST pode mascarar estes potenciais locais de ligação impedindo o seu reconhecimento.

Enquanto a rápida sialilação mediada por ST de superfície, modela a capacidade de adesão e migração através do endotélio nos neutrófilos (Rifat, *et al.*, 2008), intervindo positivamente na resposta imune; nas mo-DCs a actividade EctoST parece tem efeito oposto na modulação da resposta imune, inibindo a internalização de antigénios.

Por outro lado, existem outras moléculas envolvidas na respostas inflamatória, tais com a Proteína C Reactiva (CPR), que regulam negativamente vários processos característicos da biologia das DCs, incluindo uma diminuição da capacidade

endocítica, e cujos níveis se encontram aumentados durante o processo de inflamação (Zhang, *et al.*, 2006), pelo que o mesmo se poderá aplicar à acção modulada pelo NeuAc.

4.3.2. A Remoção dos Resíduos de Ácido Siálico Aumenta a Capacidade de Adesão das mo-DCs

A capacidade de alterar rapidamente o conteúdo de NeuAc na superfície celular pode contribuir para a modulação das propriedades adesivas das DCs. A sialilação contribui para o aumento da carga negativa global da superfície, alterando o modo como as células interactivam com receptores ou com outras células (Li, *et al.*, 2008; Schwartz-Albiez, *et al.*, 2004). Relativamente à capacidade de modulação do processo de adesão pelas EctoST, o nosso estudo não foi conclusivo, no que diz respeito à adesão das mo-DCs à linha celular de cancro de bexiga, T24.

Os resultados obtidos apontam para uma tendência das células sujeitas ao tratamento com sialidase, aderirem mais à linha celular de cancro de bexiga. Esta maior capacidade de adesão talvez possa ser explicada pela diminuição das cargas negativas na superfície das mo-DCs, o que diminui o efeito de repulsão.

Adicionalmente, os nossos ensaios parecem sugerir que o NeuAc incorporado na superfície das mo-DCs, aumenta a sua capacidade de adesão a outras células. Existem diversos factores a ter em conta na interpretação destes resultados: de acordo com alguns estudos, o CMP-NeuAc, é libertado durante o processo de inflamação (Rest, *et al.*, 1994), e é possível que o aumento de substrato disponível permita uma maior actividade das ST na superfície, durante o processo de inflamação, que permite às DCs modularem a sua capacidade de migração e interacção com as células endoteliais durante a migração até aos órgãos linfóides. Tendo em conta esta capacidade migratória das DCs, faria sentido realizar novos ensaios de adesão de mo-DCs a células endoteliais, no entanto, e devido a limitações no acesso a este tipo de células, não foi possível realizar estes ensaios.

De salientar ainda que após a activação, durante o processo de maturação, as DCs expressam menos moléculas de adesão, o que lhes permite em condições fisiológicas, aumentar a mobilidade e migrar até aos órgãos linfóides (Banchereau, *et al.*, 2000). No entanto, estudos de outros autores descrevem um aumento da

expressão de moléculas de adesão em DCs estimuladas 24 horas com LPS (Bax, *et al.*, 2007).

Deste modo, e devido à complexidade da estrutura da membrana celular, torna-se já difícil determinar com exactidão quais as moléculas e mecanismos afectados pela sialilação da superfície das mo-DCs, e qual a acção do NeuAc na modulação do processo de adesão.

Sabe-se no entanto, que o aumento da expressão de ST e consequente aumento de NeuAc e de estruturas que contêm NeuAc faz parte da resposta inflamatória, e talvez esteja envolvida na protecção da célula contra agentes patogénicos (Varki, 1997) e na manutenção da homeostase celular (Nasirikenari, *et al.*, 2006).

4.4. Perspectivas Futuras

Uma vez determinada a existência de EctoST na superfície das mo-DCs, impõe-se a necessidade de continuar os estudos funcionais, de modo a definir o seu significado biológico e estabelecer com mais precisão quais os processos modulados pela actividade destas enzimas.

É igualmente importante, determinar o tipo de ligação catalisada, por exemplo através do estudo com diferentes lectinas, ou sialidasas específicas, para os diferentes tipos de ligações presentes nas moléculas membranares. Importa ainda conhecer a sequência e estrutura da enzima responsável pela actividade observada.

Depois de determinados estes aspectos básicos da actividade enzimática, interessa reconhecer a sua importância na indução de imunogenicidade das mo-DCs, e na alteração do fenótipo, de modo a considerar as alterações induzidas pelas EctoST como uma forma de manipular as DCs para a sua utilização terapêutica.

5. Conclusão

As células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs) possuem Sialiltransferases (ST) na sua superfície – Ectosialiltransferases (EctoST) – que catalisam a transferência de ácido siálico da sua forma activa, CMP-NeuAc, para estruturas membranares, permitindo uma rápida sialilação da superfície celular.

A actividade EctoST observada não se deve a enzimas secretadas pelas células, e a incorporação de NeuAc aumenta ao longo do tempo, verificando-se a sua internalização (provavelmente associado a estruturas presentes na membrana) apenas quando as mo-DCs são incubadas por períodos superiores a quatro horas.

O presente trabalho não permitiu determinar com precisão uma função para a actividade das EctoST, no entanto, a incorporação de NeuAc parece alterar as capacidades endocíticas e de adesão das DCs. Observou-se uma diminuição da capacidade de internalização de antígenos, e um aumento da capacidade de adesão das DCs a linhas celulares, quando o NeuAc é incorporado.

Estes resultados sugerem que estas enzimas, em determinadas situações fisiológicas ou patológicas, podem estar relacionadas com mecanismos de modulação de processos biológicos realizados pelas DCs, ou seja, ter uma função imunomodulatória.

A actividade das EctoST deverá permitir às DCs responder rapidamente a alterações no meio extracelular, sem necessidade de síntese *de novo* das estruturas sialiladas. O seu provável envolvimento na modulação da resposta imune está de acordo com o facto dos níveis de substrato, CMP-NeuAc, aumentarem no plasma durante o processo de inflamação (Nasirikenari, *et al.*, 2006; Rest, *et al.*, 1994).

Estas enzimas poderão adquirir uma maior relevância no contexto da potencial utilização das mo-DCs em terapêutica, devido à sua capacidade de alterar as propriedades da membrana celular e o modo como a célula interage e reconhece outras células.

6. Bibliografia

Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C.F., Marin, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V. e Hernandez, H. 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in Immunology* 22: 691-700.

Arosa, F.A., Cardoso, M.E. e Pacheco, F.C. 2007. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, Lisboa

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. e Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 18: 767-811.

Bax, M., García-Vallejo, J.J., Jang-Lee, J., North, S.J., Gilmartin, T.J., Hernández, G., Crocker, P.R., Leffler, H., Head, S.R., Haslam, S.M., Dell, A. e van Kooyk, Y. 2007. Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *J Immunol* 15: 8216-24.

Brossmer, R. e Gross, H.J. 1994. Fluorescent and photoactivatable sialic acids. *Methods Enzymol* 247: 177-93.

Buschiazzo, A. e Alzari, P.M. 2008. Structural insights into sialic acid enzymology. *Current Opinion Chemical Biology* 12: 565-572.

Campbell, C.T. e Yarema, K.J. 2005. Large-scale approaches for glycobiology. *Genome Biology* 6: 236.

Collins, M., Ling, V. e Carreno, B.M. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 6: 223.

Cooper, M.G. e Hausman, R.E. 2004. *The Cell*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Crespo, H.J., Cabral, M.G., Teixeira, A.V., Lau, J.T., Trindade, H. e Videira, P.A. 2009. Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation. *Immunology* 128: e621-31.

Crocker, P.R. e Redelinghuys, P. 2008. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochemical Society Transactions* 36: 1467-1471.

Fukuda, M. e Bao, X. 2008. Seeing cellular sialidase transform sugars. *Nature Chemical Biology* 4: 721-722.

Gao, J.Q., Okada, N., Mayumi, T. e Nakagawa, S. 2008. Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy. *Pharmaceutical Research* 25: 752-768.

Goldsby, R., Kindt, T.J. e Osborne, B.A. 2007. *Kuby Immunology*. 6 th. W.H. Freeman and Company, New York

Gross, H.J., Merling, A., Moldenhauer, G. e Schwartz-Albiez, R. 1996. Ecto-sialyltransferase of human B lymphocytes reconstitutes differentiation markers in the presence of exogenous CMP-N-Acetyl neuraminic acid. *Blood* 87: 5113-5126.

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S. e Delannoy, P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83: 727-737.

Hennet, T., Chui, D., Paulson, J.C. e Marth, J.D. 1998. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 4504-4509.

Jenner, J., Kerst, G., Handgretinger, R. e Muller, I. 2006. Increased α 2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells. *Experimental Hematology* 34: 1211-1217.

Koeller, K.M. e Wong, C.H. 2000. Complex carbohydrate synthesis tools for glycobiochemists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies. *Glycobiology* 10: 1157-1169.

Kurosawa, N., Hamamoto, T., Inoue, M. e Tsuji, S. 1995. Molecular cloning and expression of chick Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochimica Biophysica Acta* 1244: 216-222.

Li, Y.L., Wu, G.Z., Dawe, G.S., Zeng, L., Cui, S.S., Loers, G., Tilling, T., Sun, L., Schachner, M. e Xiao, Z.C. 2008. Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by L1 via phospholipase C γ and cooperate to modulate neurite outgrowth, cell survival and migration. *PLoS One* 3: e3841.

Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S.H. e Crocker, P.R. 2004. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 209: 199-207.

Mackenzie, A.P., Schatz, F., Krikun, G., Funai, E.F., Kadner, S. e Lockwood, C.J. 2004. Mechanisms of abruption-induced premature rupture of the fetal membranes: Thrombin enhanced decidual matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) expression. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1996-2001.

Marino, J.H., Hoffman, M., Meyer, M. e Miller, K.S. 2004. Sialyltransferase mRNA abundances in B cells are strictly controlled, correlated with cognate lectin binding, and differentially responsive to immune signaling in vitro. *Glycobiology* 14: 1265-1274.

Nasirikenari, M., Segal, B.H., Ostberg, J.R., Urbasic, A. e Lau, J.T. 2006. Altered granulopoietic profile and exaggerated acute neutrophilic inflammation in mice with targeted deficiency in the sialyltransferase ST6Gal I. *Blood* 108: 3397-3405.

Ohtsubo, K. e Marth, J.D. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867.

Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J.C. e Sasisekharan, R. 2005. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nature Methods* 2: 817-824.

Rest, R.F., Liu, J., Talukdar, R., Frangipane, J.V. e Simon, D. 1994. Interaction of pathogenic *Neisseria* with host defenses. What happens in vivo? *Annals of the New York Academy of Sciences* 730: 182-196.

Rifat, S., Kang, T.J., Mann, D., Zhang, L., Puche, A.C., Stamatos, N.M., Goldblum, S.E., Brossmer, R. e Cross, A.S. 2008. Expression of sialyltransferase activity on intact human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 1075-1081.

Schauer, R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 19: 1-8.

Schwartz-Albiez, R., Merling, A., Martin, S., Haas, R. e Gross, H.J. 2004. Cell surface sialylation and ecto-sialyltransferase activity of human CD34 progenitors from peripheral blood and bone marrow. *Glycoconjugate Journal* 21: 451-459.

Silva, T.L., Reis, A., Hewitt, C. e Roseiro, J.C. 2004. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia* 77: 32-40.

Steinman, R.M. 2007. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 37: S53-S60.

Trottein, F., Schaffer, L., Ivanov, S., Paget, C., Vendeville, C., Cazet, A., Groux-Degroote, S., Lee, S., Krzewinski-Recchi, M.A., Faveeuw, C., Head, S.R., Gosset, P. e Delannoy, P. 2009. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconjugate Journal*

van der Wel, N.N., Sugita, M., Fluitsma, D.M., Cao, X., Schreiber, G., Brenner, M.B. e Peters, P.J. 2003. CD1 and major histocompatibility complex II molecules follow a different course during dendritic cell maturation. *Molecular Biology of the Cell* 14: 3378-33788.

Varki, A. 1997. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 100: S31-5.

Varki, A. 2006. Nothing in glycobiology makes sense, except in the Light of Evolution. *Cell* 126: 841-845.

Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W. e Etzler, M.E. 2008. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Videira, P.A., Amado, I.F., Crespo, H.J., Alguero, M.C., Dall'Olio, F., Cabral, M.G. e Trindade, H. 2008. Surface α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconjugate Journal* 25: 259-268.

Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L. e Steenbergen, S.M. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 132-153.

Wallet, M.A., Sen, P. e Tisch, R. 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clinical Medicine & Research* 3: 166-175.

Weijers, C.A., Franssen, M.C. e Visser, G.M. 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances* 26: 436-456.

Zhang, R., Becnel, L., Li, M., Chen, C. e Yao, Q. 2006. C-reactive protein impairs human CD14⁺ monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function. *European Journal of Immunology* 36: 2993-3006.

**Anexo I: Poster apresentado no IX Congresso da Sociedade
Ibérica de Citometria, Covilhã 2009.**



Dendritic Cells show evidence of a cell surface Sialyltransferase activity

A. Rita Piteira¹, M. Guadalupe Cabral¹, Dário Ligeiro², Reinhard Brossmer³, Paula A. Videira¹

¹ Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, ² Centro de Histocompatibilidade do Sul; ³ University of Heidelberg, Germany

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells with a unique capacity to withdraw antigens and present them to lymphocytes. Sialic acids are typical terminal sugars of cell surface glycoconjugates and are functionally important for many biological interactions, including some immune responses. We have observed that, during human monocyte derived-DC (mo-DCs) differentiation, the expression of sialylated structures augments, due to specific sialyltransferases (ST). This sialylation has a significant role in DC maturation, immunogenicity and endocytosis capacity (1, 2). Although, STs are preferentially localized to the Golgi apparatus, cell surface STs are reported for B cells and neutrophils, to permit a rapid modulation of surface sialylation and alter specific immune functions. In this work we aimed to investigate the existence of this particular ST activity in DCs. Sialidase treated mo-DCs significantly incorporated sialic acid into cell surface and this incorporation increased in time and was inhibited by a ST inhibitor, the CTP. This ST activity, which rapidly re-sialylates mo-DCs surface, was slightly increased upon maturation. We have also investigated whether this activity could modulate the mo-DC endocytosis capacity, in opposition to sialic acid shortage, which we have previously found to decrease macropinocytosis (1). Although, physiologically, the presence of CMP-sialic acid in the outer milieu was never demonstrated, it is important to reveal the existence of a ST activity, which rapidly restores or increases surface sialylation without *de novo* synthesis of sialylated structures.

Sialic acid is frequently the terminal sugar of glycoproteins glycans and therefore, is suited to modulate several biological processes. There are many reports evidencing that sialylation is implicated in the immune response (3, 4). Particularly we have demonstrated that in Dendritic Cells (DCs) sialylation, through the activity of specific sialyltransferases (STs), is involved in their maturation process and immunogenicity (2). In addition, we have shown that sialic acid removal from DCs surface leads to a reduced capacity of DCs to uptake some type of antigens, such as ovalbumin, through macropinocytosis (1).

Microscopy analysis make more evident the restoration of surface sialic acid of sialidase treated mo-DCs.

Surface ST activity is slightly increased in LPS matured mo-DCs.

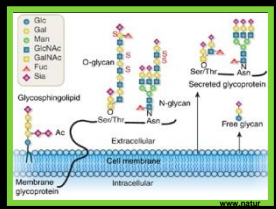


Figure 1: Structure of animal glycoprotein glycans evidencing sialic acid as the terminal sugar.

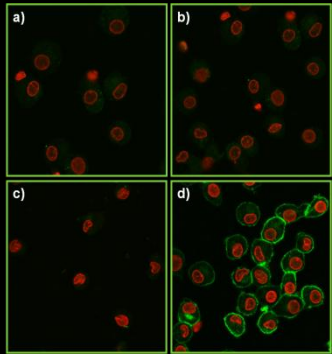


Figure 3: Incorporation of fluorescent sialic acid (green) in mo-DCs, assessed by Confocal Laser-scanning microscope. (a) Cell without sialidase treatment, in presence of CMP-5-FITC-sialic acid and Inhibitor of ST activity, CTP (b) Cells without sialidase treatment in presence of CMP-5-FITC-sialic acid (c) Cells treated with sialidase in presence of CMP-5-FITC-sialic acid and CTP; (d) Cells treated with sialidase in presence of CMP-5-FITC-sialic acid. Dye TOPRO3 was used to stain the nucleus (red).

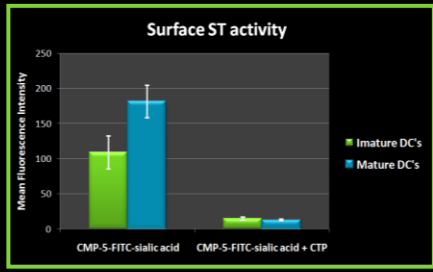


Figure 5: Determination of surface ST activity in immature and mo-DCs matured by LPS. Incorporation of sialic acid-FITC was determined by Flow cytometry. Control assays were performed in presence of CTP. Represented values are the Mean Fluorescence Intensity correspond to at least 4 independent assays.

Objectives: Evaluate the existence of surface STs activity in DCs that rapid modulate surface sialylation and identify the functionality of this activity.

Methods: Human monocyte derived DCs (mo-DCs), were obtained as described, (1), and treated or not with sialidase (enzyme that cleaves sialic acid), were incubated, in serum free medium, with a fluorescent ST substrate, CMP-5-FITC-sialic acid, and the incorporation of sialic acid-FITC was determined by Flow Cytometry and Confocal Microscopy.

Evidence of surface ST activity in mo-DCs: In sialidase treated mo-DCs, fluorescent sialic acid was significantly incorporated into cell surface, being this incorporation inhibited by CTP, a ST inhibitor.

Sialylation of DCs surface increases linearly with time. This phenomenon is similar either in cells incubated with fresh medium or with conditioned medium, suggesting that the ST activity responsible for this surface sialic acid incorporation is not a soluble enzyme secreted to the external medium.

Concordantly with our previous findings, mo-DCs pre-treated with sialidase showed reduced ability to internalize ovalbumin (2). However, re-sialylation of mo-DCs surface through the action of surface STs decreases even more their endocytosis capacity, suggesting that this activity may be an important immunomodulatory mechanism with a role in cell protection and homeostasis.

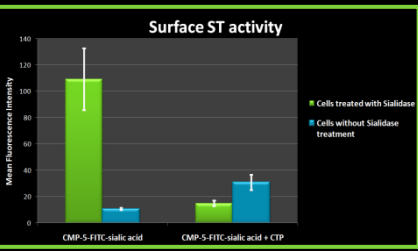


Figure 2: Evidence of surface STs activity, assessed by Flow Cytometry. Incubation of mo-DCs in the presence of CMP-5-FITC-sialic acid for 2h with and without sialidase pretreatment. Control assays were conducted in the presence of ST inhibitor CTP. Values of Mean Fluorescent Intensity correspond to at least 6 independent assays.

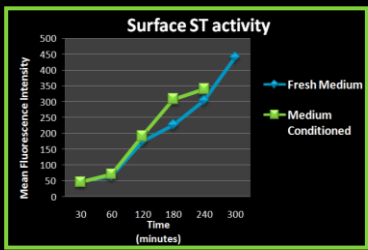


Figure 4: Incorporation of sialic acid-FITC along time, in presence of fresh medium or in the presence of pre-conditioned medium by mo-DCs during 24 hours of culture.

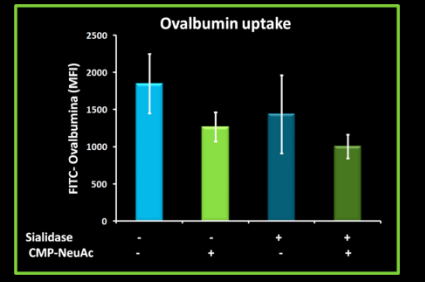


Figure 6: Flow cytometry analysis of the effect of DCs surface re-sialylation in their capacity to endocytose ovalbumin-FITC. The uptake of this tracer is represented as Mean Fluorescence Intensity.

In conclusion, this work reveals the presence of ST activity at mo-DCs surface. The STs responsible for this activity are probably ectosialyltransferases and, although their exact role is not completely clarified, the existence of such enzymes, which may rapidly restore or increase surface sialylation without *de novo* synthesis of sialylated structures, are likely to be important to modulate DCs function, as it seems to be the case of endocytosis. Given the sialylation role in DCs, the existence of STs activity at DCs surface is also interesting because they may serve as a simple way to manipulate *in vitro* mo-DC immunogenicity, regarding the improvement of DC-based therapies.

**Anexo II: Artigo publicado em acta do encontro científico, no 2º
Congresso Europeu de Imunologia, Berlim 2009.**

Dendritic Cells show evidence of a cell surface Sialyltransferase activity

A.R. Piteira¹, M.G. Cabral¹, D. Ligeiro², R. Brossmer³, P.A.Videira¹

(1) CEDOC, Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, FCM, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(2) Centro de Histocompatibilidade do Sul, Lisboa, Portugal.

(3) University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

Summary: Human monocyte-derived dendritic cells (mo-DCs) express highly sialylated structures, with a recognized role in maturation, immunogenicity and endocytosis capacity. Here, we demonstrated that, in the presence of exogenous CMP-Neu, mo-DCs significantly incorporated sialic acid into cell surface, especially after sialidase treatment and upon maturation. This atypical cell membrane sialyltransferase activity was inhibited by a sialyltransferase inhibitor, the CTP, and it was not influenced by possible secreted enzymes. At the functional level, this ectosialyltransferase activity modulates the endocytosis capacity of mo-DCs, as demonstrated by the down-regulation of ovalbumin uptake. These ectosialyltransferases seem to participate in a dynamic control of mo-DC sialylation, probably contributing to protection and homeostasis regulation and it may serve as a therapeutic target.

Introduction: Dendritic cells (DCs) are special antigen-presenting cells that uptake, process and present antigens to lymphocytes and regulate cellular and humoral immune responses [1]. Due to their role in initiating specific immunity against many agents including tumor antigens, the research has evolved to include DCs in cancer therapy. However, the efficient application of DCs based therapy still faces several difficulties.

Sialic acids, typically found on the outermost ends of cell surface glycoconjugates, are key structural determinants for a number of cell surface receptors, involved in the immune response [2, 3]. We and other groups have proven that mo-DC surface is highly sialylated and that sialic acids influences specific DC immune response [4-6]. The removal of sialic acid from mo-DCs, by sialidase treatment, rapidly diminishes the mo-DC capacity for endocytosis [5], an event probably associated with the triggering of DC maturation, evidenced by the increased expression of MHC, and costimulatory molecules besides higher capacity to activate T lymphocytes. Mouse models data suggested that the sialylated glycans mediated by ST3Gal.I and ST6Gal.I sialyltransferases are at the basis of the observed maturation induction [6].

Sialyltransferases are usually integral membrane proteins of the Golgi apparatus that generate sialic acid content during the biosynthesis of glycoconjugates and restore it during the recycling of surface receptors [7]. Nevertheless, other forms of sialyltransferases have been described. In fact, there is growing evidence that sialyltransferases may be present at cell surface of some leukocytes, such as neutrophils and B lymphocytes, permitting a rapid modulation of surface sialylation without *de novo* synthesis of their glycoconjugates [8, 9]. In this work, we proved that mo-DC also exhibits a surface enzymatic activity that rapidly restore its sialic acid content and it is inhibited by a sialyltransferase inhibitor. In addition, we attempted to address functional aspects by analysing whether surface sialyltransferase activity is influenced by maturation and if it affects mo-DC capacity for endocytosis.

Materials and Methods: Mo-DCs were generated from monocytes isolated and differentiated as described [5]. Maturation was induced at 6th day culture, by the addition of 5 µg/ml of LPS. Cells were treated with 200mU/ml of sialidase for 90 min at 37°C or mock-treated with heat-inactivated sialidase. To detect cell surface sialylation, mo-DCs were incubated with 10 µM of CMP-5-FITC-Neu at 4° or 37°C, for 2 h. In some experiences, the assays were carried out with conditioned supernatant of a parallel 24h mo-DCs culture . Control experiments were conducted in the presence of 12 mM of CTP, a sialyltransferase inhibitor. The incorporation of FITC-sialic acid at cell surface

was determined by flow cytometry (FACSCalibur cytometer from BD Bioscience) and confocal laser scanning microscopy (confocal microscope from Leica TCS SP2 AOBS). For endocytosis assays 1 mg/ml of FITC-ovalbumin were added to mo-DCs prepared as described and incubated in the absence or in the presence of 100 μ M of CMP-Neu. After 1h of incubation at 4°C or 37°C cells were analysed by flow cytometry.

Results: Mo-DCs acquired significant fluorescence after 2h incubation with the CMP-5-FITC-Neu ($P = 0,016$; Fig. 1A), indicating that incorporation of sialic acid had occurred. This incorporation was inhibited by CTP, substantiating the fact the assay was detecting genuine sialyltransferase activity. Concordantly, in assays performed at 4°C, the sialic acid incorporation was negligible. Moreover, mo-DCs pretreated with sialidase, which expose more sialyltransferase acceptor sites, the sialic acid incorporation increased four fold ($P = 0,029$) and it was also inhibited by CTP (Fig. 1A). Since CMP-5-FITC-Neu does not penetrate the cell, it is expected that all the observed cell fluorescence is due to nonintracellular sialyltransferase activity, which transfer FITC labeled sialic acid to surface acceptors. The direct microscopic visualizations of these assays, confirmed the results obtained by flow cytometry (Fig. 1B).

We have also analyzed the level of incorporation of fluorescent sialic acid, at various reaction times (Fig. 2) and observed a linear, continuous increase in fluorescent label after the addition of CMP-5-FITC-Neu at 37°C, during at least 24 h (Fig. 2A). To test if this nonintracellular activity was due to membrane or soluble sialyltransferases we performed parallel assays using conditioned supernatant of 24 h culture of mo-DCs. Since we didn't observe any significant alteration in sialylation compared to the assays without conditioned supernatants ($P = 0,195$, Fig. 2B), we conclude that secreted sialyltransferase activity does not contribute to the sialylation of cell surface acceptors.

In LPS mature mo-DCs, incubated with exogenous CMP-5-FITC-Neu, the fluorescence signal is significant increased ($P= 0,027$, Fig. 3) relatively to immature mo-DCs, which can be explained by transcriptional or translational changes of the sialyltransferases or by the decreased expression of specific sialylated glycans or desialylation which are then available to be resialylated by the surface sialyltransferases.

Additionally, we observed that mo-DCs previously incubated in the presence of non fluorescent CMP-Neu had decreased capacity to endocytose the fluorescent model antigen, FITC-ovalbumin (Fig. 4), indicating that sialylation of mo-DCs mediated by cell membrane sialyltransferases affects negatively the antigen uptaking capacity.

Discussion: From our experiments, it is clear that mo-DCs possess sialyltransferases activity at cell surface, which can easily resialylate its surface. Looking for the significance of this ectosialyltransferase activity in DCs, we observed a role in down-regulating their ability to endocytosis. Apparently this is in contradiction with our previous work, where we demonstrated that removal of the surface sialic acid by sialidase also down-regulated the endocytosis capacity of mo-DCs. The following considerations were taken to explain that both decreased and increased sialylation content negatively affects mo-DC endocytosis:: i) unlike sialylation mediated by ectosialyltransferases, the sialidase treatment triggers cell maturation [6] which clarify in part the down-regulation of the antigen-uptake machinery [10] ii) within the complexity of the cells surface molecules, the resulting surface sialyltransferase mediated sialoglycans may affect specific cell surface receptors and have either repulsive or adhesive effects, interfering with recognition of antigens iii) there may exist differences between the glycosidic acceptors or the type of linkage used by the adopted sialidase (from *C. perfringens*) and the surface ectosialyltransferase activity . Ultimately, since CMP-Neu, is present at inflammatory milieu, it may be hypothesized that, in physiological conditions, the ectosialyltransferases participate in the complex inflammatory response, modulating the immune system. Whereas in neutrophils it has been reported that rapid sialylation mediated by surface sialyltransferases modulates their capacity to adhere and migrate across the endothelium, in DCs it seems to inhibit antigen-uptake, with specific impact in an

inflammatory response. Although, further functional studies are still required to understand the significance of ectosialyltransferases in mo-DC, the ability to rapidly modulate mo-DC function may have a particular relevance to DC-based therapies.

- References:** 1. BANCHEREAU, J., PALUCKA, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 296-306. 2005
2. CROCKER, P.R., PAULSON, J.C., VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 255-266, 2007.
3. SPERANDIO, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 273: 4377-4389. 2006.
4. JENNER, J., KERST, G., HANDGRETINGER, R., MULLER, I. Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells. *Exp. Hematol.* 34: 1212-1218. 2006.
5. VIDEIRA, P.A., AMADO, I.F., CRESPO, H.J., ALGUERO, M.C., DALL'OLIO, F., CABRAL, M.G., TRINDAD, H. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj. J.* 25: 259-268. 2008
6. CRESPO, H.J., CABRAL, M.G., TEIXEIRA, A.V., LAU, J.T.Y., TRINDADE, H., VIDEIRA, P.A. Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation. *Immunol. IMM3047:* 2009.
7. PAULSON, J.C., COLLEY, K.J. Glycosyltransferases. structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* 264: 17615-17618. 1989
8. RIFAT, S., KANG, T.J., MANN, D., ZHANG, L., PUCHE, A.C., STAMATOS, N. M., GOIDBLUM S.E., BROSSMER, R., CROSS, A.S. Expression of sialyltransferase activity on intact human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1075-1081. 2008
9. GROSS, H.J., MERLING, A., MOLDENHAUER, G., SCHWARTZ-ALBIEZ, R. Ecto-sialyltransferase of human B lymphocytes reconstitutes differentiation markers in the presence of exogenous CMP-N-acetyl neuraminic acid. *Blood.* 87: 5113-5126. 1996
10. SALLUSTO, F., CELLA, M., DANIELI, C., LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389-400.1995.

Captions: Fig 1. A: Flow cytometry analysis of the fluorescence incorporation by mo-DCs incubated with CMP-5-FITC-Neu at 37°C for 2 h, with or without sialidase pre-treatment (open peak, solid line in the histogram). Control assays in the presence of CTP were performed (open peak, hatched line in the histogram). Histograms shows a single experiment and the column graphic the mean of several experiments (* $P < 0,05$ t-test). **B:** Confocal laser-scanning microscopic images of the described mo-DCs, evidencing the incorporation of sialic acid (green) at cell surface (detailed on a confocal Z-stacking series of a cell). The dye TOPRO-3 was used for cell nuclei staining (red).

Fig 2. Flow cytometry analysis of mo-DCs pre-treated with sialidase, incubated with CMP-5-FITC-Neu at 37°C for various times. **A:** kinetics of fluorescent sialic acid incorporation with time (♦) inhibited by CTP (□) **B:** fluorescence incorporation assays performed in the presence also of conditioned supernatant of a 24 h culture (Δ). Values for fluorescence is given as the mean fluorescence intensity (MFI).

Fig 3. Flow cytometry analysis of mo-DCs immature (IM) or matured with LPS (M) and incubated with CMP-5-FITC-Neu for 2h at 37°C. (* $P = 0,027$, t test).

Fig 4. Flow cytometry analysis of mo-DCs treated or not with sialidase, in the absence or in the presence of CMP-Neu, and incubated for 1 h, with 1 mg/ml of FITC-ovalbumin. MFI values at 4 °C were subtracted from values obtained at 37 °C.

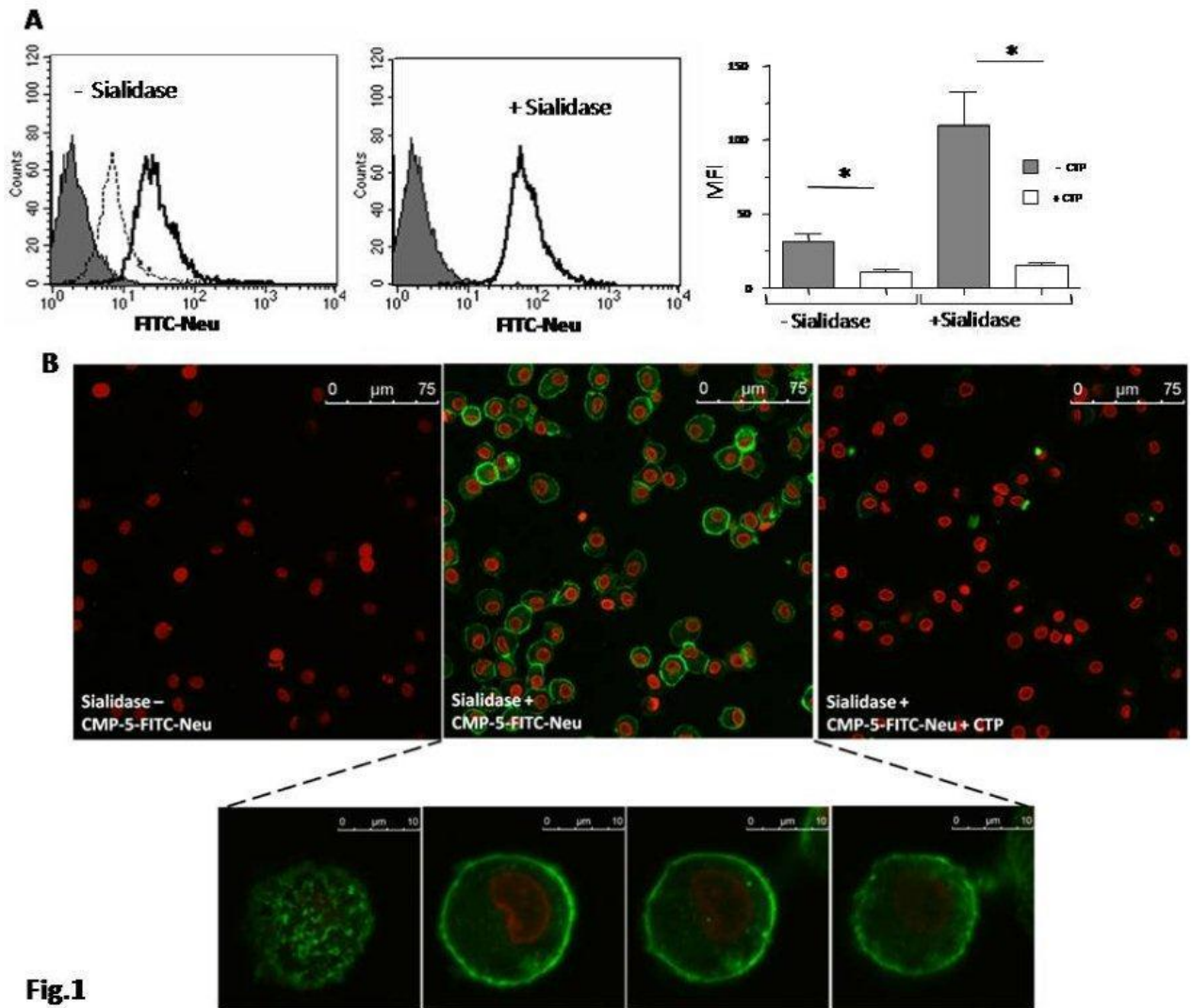


Fig.1

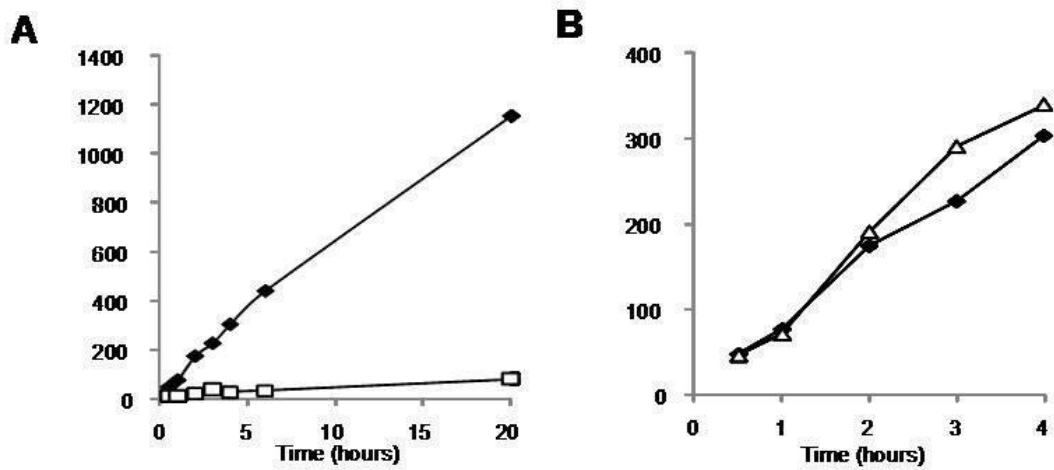


Fig.2

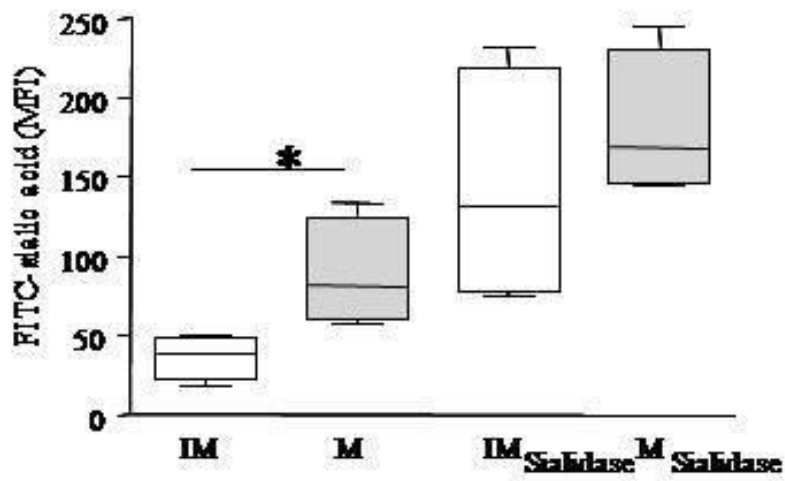


Fig.3

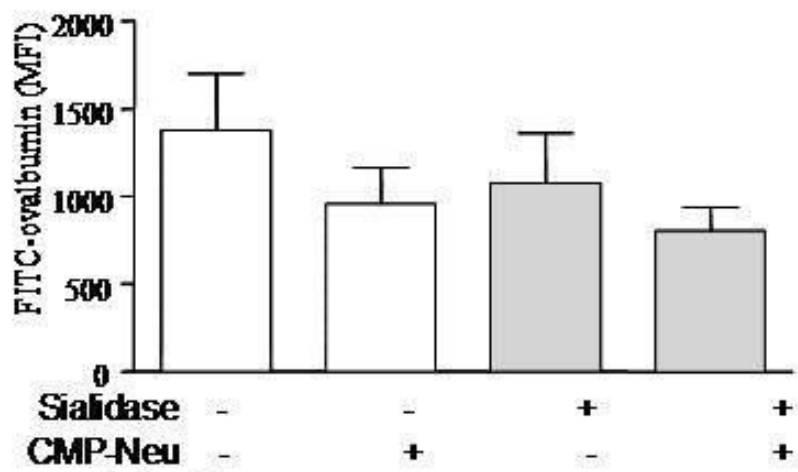


Fig.4