



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

DORALICE CONCEIÇÃO DA PAZ NETA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE
SIGLE15 EM OSTEOSSARCOMA**

Recife
2024

DORALICE CONCEIÇÃO DA PAZ NETA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE
SIGLEC15 EM OSTEOSSARCOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Coorientadora: Dra. Bárbara de Oliveira Silva

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Paz Neta, Doralice Conceição da.

Avaliação do perfil de expressão do gene siglec15 em osteossarcoma /
Doralice Conceição da Paz Neta. - Recife, 2024.

46p : il., tab.

Orientador(a): Michelly Cristiny Pereira

Cooorientador(a): Bárbara de Oliveira Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Osteossarcoma. 2. Biologia molecular. 3. Bioinformática. I. Pereira,
Michelly Cristiny. (Orientação). II. Silva, Bárbara de Oliveira. (Coorientação).
IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

DORALICE CONCEIÇÃO DA PAZ NETA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE SIGLEC15 EM
OSTEOSSARCOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 22/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Michelly Cristiny Pereira
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Prof. Dra. Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira
Centro Universitário Estácio do Recife

Dra. Valécia de Cássia Mendonça da Costa
Universidade Federal de Pernambuco/ Núcleo de Inovação Terapêutica- Suely Galdino

Dedico este trabalho a Deus, a quem devo o fôlego da vida e têm me sustentado todos os dias. Aos meus pais, por serem minha âncora e por todo apoio recebido. Aos meus avós maternos e paternos, por todos os ensinamentos passados por gerações. Aos meus padrinhos, por sempre torcerem por mim. Aos meus irmãos, meus chatos preferidos. À minha sobrinha Yasmim, que alegra sempre os meus dias. Ao meu gatinho, Simba, pela companhia durante meu processo de escrita e a minha tia Celma (em memória), por ter sido a melhor tia que eu poderia ter.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por ter me sustentado durante todo o meu processo acadêmico, e nos dias mais sombrios, ter enchido meu coração de paz. Toda honra e glória seja dada a ti, Senhor.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dra. Michelly Cristiny Pereira, por cada orientação recebida, pela gentileza e dedicação de sempre. Sou grata por ter sido a única pessoa a responder meu email em busca de iniciação científica, não poderia ter orientadora melhor.

À minha coorientadora Dra^a Bárbara de Oliveira Silva, pela sua dedicação, disponibilidade e maestria em me ajudar nos experimentos. Por cada correção feita no trabalho e pelas caronas recebidas. Gratidão.

Agradeço a Marillya e a Erika pela ajuda recebida durante a metodologia do trabalho. Marillya, a cultura de células não seria a mesma sem seu auxílio. Muito obrigada!

Agradeço imensamente à Universidade Federal de Pernambuco e ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG) por ter me ofertado, a estrutura e os materiais necessários para concluir minha graduação e este estudo, respectivamente. Expresso minha profunda gratidão pelas oportunidades oferecidas, as quais foram fundamentais para meu crescimento pessoal e minha formação acadêmica.

Como peças fundamentais para meu crescimento acadêmico, eu gostaria de agradecer aos meu pais, Severino e Jocélia, por todo amor e apoio recebidos. Ao meu pai, pelo cuidado e dedicação para que eu pudesse focar nos estudos. À minha mãe por cada gesto de amor, cuidado e zelo recebidos e por ser minha maior apoiadora e cobaia oficial. Se cheguei até aqui, é por vocês também.

Aos meus irmãos, Angélica e Henrique, por torcerem sempre por mim e estarem sempre comigo, nem que seja para tirar minha paciência. À minha sobrinha, Yasmim, que alegrou os meus dias no processo de escrita. Te amo titia.

Agradeço também a minha companheira da graduação, Rosana, por cada conversa, alegrias e aflições compartilhadas, que tornaram meus dias na universidade mais leves.

Gostaria de agradecer também a minha dupla de estágio, Rebhecca, que foi uma ótima companhia durante os cinco meses de estágio. Obrigada por compartilhar comigo o processo de estágio e TCC.

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura para onde tu vais, não há obra, nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.

Eclesiastes 9:10

NETA, Doralice Conceição da Paz. **Avaliação do perfil de expressão do gene Siglec15 em osteossarcoma**. 2024. 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

Apesar de ser considerado um câncer raro, o osteossarcoma (OS) é caracterizado por uma alta taxa de mortalidade e uma expectativa de vida geralmente baixa, comumente associada a um prognóstico desfavorável. Aproximadamente 40% dos pacientes com OS apresentam recidiva da doença e desenvolvimento de metástases em menos de três anos após o diagnóstico. Entre as complicações frequentes do OS, destaca-se a metástase pulmonar, que tem sido identificada como a principal causa de óbito nesses pacientes. Nesse contexto, a avaliação da expressão gênica no OS emerge como uma ferramenta importante, para oferecer *insights* valiosos para enfrentar esse desafio durante o tratamento quimioterápico. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão do gene Siglec15 em osteossarcoma. Análises *in silico* nos bancos de dados String-db e OSE foram realizadas para avaliar as interações entre proteínas. A linhagem SAOS-2 foi cultivada e tratada com diferentes concentrações de cisplatina 1 μ M e 40 μ M, respectivamente. A extração do RNA total das células cultivadas foi realizada usando Trizol® (Invitrogen, UK) e a síntese de cDNA pelo *high capacity cdna reverse transcription kit* (Applied Biosystems). A expressão do gene Siglec15 no OS foi avaliada pela reação de polimerase em cadeia da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o método SYBR® Green com *primers* específicos. A análise dos dados gerados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8, com valores de $p < 0,05$ sendo considerados estatisticamente significativos.

Os resultados mostraram que o Siglec15 apresenta uma rede de interação com dez proteínas, incluindo os Siglecs-1,4,7,8 e 11. As interações mais significativas envolveram a mineração de texto e uma interação de dados experimental, demonstrando experimentalmente se ligarem ou estarem no mesmo complexo proteico. No OSE foi possível observar uma relação entre a taxa de sobrevida global e livre de eventos com a expressão do Siglec15. Pacientes com maior expressão do gene apresentaram uma menor sobrevida. Em relação a expressão do Siglec15 na linhagem SAOS-2 tratada com cisplatina, não foi observada diferença significativa,

no entanto não foi descartada a possibilidade da cisplatina modular a expressão do Siglec15, sendo necessários ensaios futuros realizados em triplicata e com outras linhagens de osteossarcoma para melhor compreensão.

Palavras-chave: Biomarcador; Carcinogênese; Expressão gênica; Gene Siglec15; Osteossarcoma

NETA, Doralice Conceição da Paz. **Evaluation of the Siglec15 gene expression profile in osteosarcoma.** 2024 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Despite being considered a rare cancer, osteosarcoma (OS) is characterized by a high mortality rate and a generally low life expectancy, commonly associated with an unfavorable prognosis. Approximately 40% of patients with OS experience disease recurrence and development of metastases in less than three years after diagnosis. Among the frequent complications of OS, lung metastasis stands out, which has been identified as the main cause of death in these patients. In this context, the assessment of gene expression in OS emerges as an important tool, to offer valuable insights to face this challenge during chemotherapy treatment. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the expression of the Siglec15 gene in osteosarcoma. In silico analyzes on the String-db and OSE databases were performed to evaluate interactions between proteins. The SAOS-2 line was cultivated and treated with different concentrations of cisplatin 1 μ M and 40 μ M, respectively. Extraction of total RNA from cultured cells was performed using Trizol® (Invitrogen, UK) and cDNA synthesis using the high capacity cdna reverse transcription kit (Applied Biosystems). The expression of the Siglec15 gene in OS was evaluated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), using the SYBR® Green method with specific primers. The analysis of the data generated was carried out using the GraphPad Prism 8 software, with p values <0.05 being considered statistically significant.

The results showed that Siglec15 presents an interaction network with ten proteins, including Siglecs-1,4,7,8 and 11. The most significant interactions involved text mining and an experimental data interaction, experimentally demonstrating whether bind or be in the same protein complex. In OSE it was possible to observe a relationship between the overall and event-free survival rates with the expression of Siglec15. Patients with higher gene expression had shorter survival. Regarding the expression of Siglec15 in the SAOS-2 line treated with cisplatin, no significant difference was observed, however the possibility of cisplatin modulating the

expression of Siglec15 was not ruled out, requiring future tests carried out in triplicate and with other osteosarcoma lineages for better understanding.

Key words: Biomarker; Carcinogenesis; Gene expression; Siglec15 gene; Osteosarcoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do osteossarcoma no fêmur.....	13
Figura 2 –Estrutura da cisplatina.....	18
Figura 3 – Receptores humanos da família Siglec.....	20
Figura 4 – Rede de associação do Siglec15 com outras proteínas.....	23
Figura 5 – Localização do gene Siglec15.....	28
Figura 6 – Estrutura cristalizada da proteína Siglec15	29
Figura 7 –Rede de associação do Siglec15 com outras proteínas.....	30
Figura 8 –correlação entre a expressão do gene Siglec15 com a idade e diagnóstico da doença.....	33
Figura 9 – Análise de sobrevivência geral.....	34
Figura 10 – Análise de sobrevivência livre de eventos.....	35
Figura 11 – Expressão do Siglec15 na linhagem SAOS-2 sob efeito da cisplatina...	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estadiamento cirúrgico de Enneking.....	17
Quadro 2 – Expressão de Siglecs e as principais condições clínicas e/ou doenças associadas.....	20
Quadro 3 – Dados dos parceiros funcionais do Siglec15.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAP12	Proteína ativadora DNAX de 12 kDa
CPCNP	Câncer de Pulmão de Células Pequenas
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
IFN- γ	Interferon-gama
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITAM	Motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora
ITIM	Motivos inibitórios baseados em tirosina
KLRK1	Receptor semelhante a lectina de células assassinas
LDH	Lactato desidrogenase
M-CSF	Fator estimulante de colônia de fagócito mononuclear sintetizado por células mesenquimais
MAG	Siglec-4
MAPK	Via da proteína quinase ativada por mitógeno
NCAM	Molécula de adesão de células neurais
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Osteossarcoma
OSE	Explorador de Osteossarcoma
PBS	Tampão fosfato-Salino
RANKL	Ativador de receptor do ligante NF- κ B
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	Via Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TNM	Classificação de tumores malignos
TP53	Proteína Supressora de Tumor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.1 Caracterização do osteossarcoma.....	18
2.1.2 Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento	20
2.1.3 Cisplatina.....	23
2.1.4 Siglecs.....	24
2.1.5 Siglec15 e osteossarcoma.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1.1 Análise <i>in silico</i>	31
4.1.3 Cultura de células.....	32
4.1.4 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	32
4.1.5 Expressão por RT-qPCR.....	32
4.1.6 Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Aspectos moleculares.....	33
5.2 Expressão <i>in silico</i> do Siglec15.....	38
5.3 Expressão do Siglec15 na linhagem SAOS-2.....	40
6. CONCLUSÃO.....	42
7. PERSPECTIVAS.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Osteossarcoma (OS) é um câncer ósseo primário, maligno, raro e agressivo que atinge geralmente as epífises dos ossos longos que podem causar dor localizada ou alterações na estrutura óssea. Possui incidência bimodal com pico aos 18 e 60 anos de idade, sendo mais observado em homens (Beirdi *et al.*, 2022).

Apesar de ser um câncer raro, o OS apresenta uma alta taxa de mortalidade com baixa expectativa de vida, geralmente associado a um prognóstico desfavorável. Cerca de 40% de pacientes com OS apresentam recidiva do câncer e metástase em menos de três anos após o diagnóstico (Fan *et al.*, 2021). Uma das complicações comuns do OS é a metástase pulmonar que vem sendo relacionada como a principal causa de morte associada a esses pacientes. Nesse contexto, avaliar a expressão de genes em OS pode ter implicações significativas para superar esse desafio durante o tratamento quimioterápico (Yang *et al.*, 2020).

As Siglecs são proteínas transmembranas de reconhecimento glicano, que compõem uma família expressa em diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, células B, células T, células dendríticas e células natural killer (Fan, m. *et al.* 2021; Tang *et al.*, 2023). Estudos destacam seu papel fundamental na regulação do desenvolvimento, diferenciação e remodelação óssea (Ye *et al.*, 2023; Duan *et al.*, 2020).

A proteína transmembranar do tipo I também conhecida como Siglec15 possui uma estrutura de lectina ligada ao ácido siálico que induz a formação de osteoclastos inibindo a proliferação da ativação de células T (Wang *et al.*, 2019). Estudos destacam que o RNA mensageiro do Siglec15 está superexpresso em vários tipos de câncer, como o câncer de pulmão, câncer de mama, câncer pancreático e câncer de bexiga (Li *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022).

Foi evidenciado a expressão positiva do SIGLEC15 em amostras de tecido de OS , destacando que esse gene pode inibir a proliferação celular, induzindo a apoptose e proptose por meio da via de sinalização STAT3 (Song *et al.*, 2023). Além disso, também foi observado que este gene estimula a progressão de células de OS ao inibir a vida da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Ou seja, sua alta

expressão associa-se à metástase pulmonar e prediz um prognóstico desfavorável nesses pacientes (Jang *et al.*, 2022).

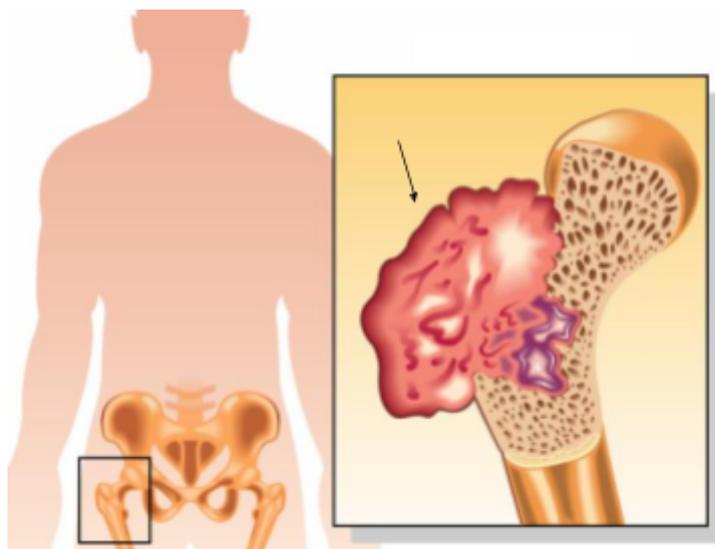
Nesse contexto, estudar a avaliação do perfil de expressão do gene Siglec15 em osteossarcoma pode auxiliar no entendimento da patogênese do OS, podendo identificar biomarcadores permitindo uma abordagem mais personalizada para o tratamento desses pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Caracterização do osteossarcoma

Osteossarcoma (OS), também conhecido como sarcoma osteogênico ou sarcoma osteoblástico, é um tumor primário maligno composto por células mesenquimais que produzem osso osteóide e imaturo (Biazzo,A.;DePaolis,M.,2016). Ele é frequentemente encontrado nos ossos longos dos membros, próximo à placa de crescimento metafisária. Os locais mais comuns para a sua ocorrência são o fêmur, a tíbia e o úmero, embora também possa afetar a mandíbula, o crânio ou a pelve com menos frequência (Figura 1).

Figura 1. Formação do osteossarcoma no fêmur (seta preta)



Fonte: Dreamstime.com

OS representa aproximadamente 56% dos sarcomas ósseos, com uma incidência na população geral de 2-3/milhão/ano. Esse tipo de câncer constitui entre 3% a 6% de todos os cânceres infantis e cerca de 1% dos cânceres em adultos. A distribuição da doença é bimodal, o primeiro pico ocorrendo em uma faixa etária média de 10-19 anos, e o segundo após os 65 anos, sendo mais comum em homens. A taxa de sobrevivência em 5 anos varia entre 60% a 70% (Ritter, J.; Bielack, S.S. 2010).

No Brasil, a incidência do OS está incluída nos dados do câncer infantojuvenil, com uma estimativa de 8460 novos casos em 2022. O câncer infantojuvenil engloba um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais, podendo ocorrer em qualquer parte do organismo. Além do OS, esse grupo inclui outros tipos de câncer, como a leucemia, linfoma não hodgkin, e retinoblastoma (INCA,2022). A causa do OS ainda não é bem estabelecida, porém nas crianças parece ocorrer de forma esporádica. Em adultos, alguns casos estão associados à doença de Paget ou a outros tipos de câncer (Simpson, Emily; Brown, Heather L.,2018).

Os fatores de risco para o OS incluem principalmente histórico de doença de Paget ou outra lesão óssea benigna, radiação, síndrome de Li-fraumeni e retinoblastoma hereditário. No entanto, diversos fatores influenciam o prognóstico do paciente, como idade, volume do tumor, resposta histológica à quimioterapia pré-operatória, margem de ressecção cirúrgica, etc (Kansara *et al.*, 2014).

Algumas síndromes hereditárias predispoem ao OS, como as mutações germinativas da síndrome de Li-fraumeni no supressor tumoral *TP53*, um distúrbio autossômico dominante raro, onde cerca de 12% dos pacientes desenvolvem OS (Srivastava *et al.*, 1993), e as mutações no gene supressor de tumor *RB1*, regulador chave da progressão do ciclo celular, que aumentam a incidência de OS (Hansen *et al.*, 1985).

Grande parte dos OS secundários desenvolvem-se a partir da exposição à radiação ionizante, sendo que o OS induzido por radiação é dose-dependente, com aumento da incidência à medida que mais pacientes sobrevivem após a irradiação para o tratamento de outros tumores primários (Le vu *et al.*,1998).

O OS caracteriza-se pelo crescimento radial, formando uma massa arredondada que expande e exerce pressão sobre os tecidos vizinhos. Essa massa tumoral tem a capacidade de gerar metástases, principalmente nos pulmões, mas também pode desenvolver metástases intraósseas, onde os nódulos tumorais crescem além da margem

reativa, porém dentro do mesmo osso (Kundu, Zile Singh.,2014). A metástase representa o estágio final da doença, com um prognóstico desfavorável, sendo o principal desafio para a terapia de OS. Aproximadamente 20% dos pacientes com OS já apresentam metástase no momento do diagnóstico (YANG *et al.*, 2020).

De acordo com o componente histológico predominante na matriz, o OS pode ser classificado como de alto grau, grau intermediário e baixo grau. Os tumores de alto grau possuem crescimento mais rápido e ocorrem principalmente em crianças e adolescentes. Os tumores classificados como de alto grau compreendem os tipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, célula pequena, telangiectásica e justacortical (Ritter, J.; Bielack, S.S., 2023). O OS osteoblástico ocorre predominantemente na matriz óssea com elevada produção de osteóide, o condroblástico na matriz cartilaginosa e o fibroblástico apresenta estroma de células fusiformes e com pequena quantidade de osteóide (Kundu, Zile Singh.,2014). O telangiectásico têm alto grau de malignidade, possui etiologia desconhecida e ocorre na segunda e terceira década de vida, com predominância no sexo masculino. Os tumores de grau intermediário são menos comuns do que OS de alto e baixo graus e o principal subtipo é o periosteal. Por outro lado, os tumores de baixo grau apresentam um crescimento mais lento e se assemelham às células ósseas normais, sendo os principais subtipos o tumor parosteal e intramedular ou intraósseo bem diferenciado (Wang *et al.*, 2020).

No osteossarcoma periosteal, os locais de comprometimento impactam as diáfises e metáfises de ossos longos, como a tíbia e o fêmur. Por outro lado, o osteossarcoma parosteal, de baixo grau, tem seu início na superfície do osso, com o local de envolvimento afetando a superfície distal posterior do fêmur, bem como a superfície proximal da tíbia e do úmero (Chen *et al.*, 2023).

2.1.2 Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamentos

A manifestação mais comum do OS é a dor localizada, que inicialmente é leve e ao longo do tempo, torna-se mais intensa, muitas vezes acompanhada por inchaço e restrição do movimento articular. Sintomas sistêmicos, como febre, perda de peso, linfadenopatia e complicações respiratórias, são menos frequentes. Em alguns casos, a

fratura óssea pode ser o primeiro sinal da doença (SILVA, Suellen da Costa e., 2016).

As neoplasias ósseas em geral apresentam uma variedade de comportamentos genéticos, o que dificulta o diagnóstico precoce. No OS o diagnóstico pode ser desafiador e depende da análise histológica, uma vez que pode apresentar semelhanças com o histiocitoma fibroso maligno, fibrossarcoma ou tumores de células gigantes (Seton, Margaret., 2013).

A radiografia geralmente é o primeiro exame realizado quando há suspeita de OS. O exame por raios X pode mostrar a destruição do córtex, a elevação do periósteo e a extensão extraóssea. A radiografia pode ser acompanhada pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para confirmar ou descartar a presença de lesões malignas. Além disso, a RMN possibilita uma boa visualização dos tecidos moles envolvidos, fornecendo informações importantes para auxiliar tratamentos que visam a preservação do membro (Righi *et al.*, 2015)

As lesões ósseas suspeitas devem sempre passar por biópsias, para a confirmação do diagnóstico. No entanto, o diagnóstico definitivo é dado por exame anatomopatológico em que o médico avalia macroscopicamente e microscopicamente as células e os tecidos (Harrison DJ *et al.*, 2018). Alguns exames laboratoriais podem auxiliar no diagnóstico e no prognóstico do OS. O achado laboratorial de maior valor diagnóstico é a elevação dos níveis de fosfatase alcalina. Quanto ao prognóstico, destaca-se a Lactato Desidrogenase (LDH), em que níveis elevados estão associados a pior prognóstico (Rech.Jr *et al.*, 2014).

Com a confirmação histológica do OS, faz-se necessário definir o estadiamento para determinar a localização e extensão do tumor. A cintilografia óssea e a tomografia computadorizada de tórax são utilizadas para demonstrar a presença ou não de metástases ósseas e pulmonares, respectivamente (Righ *et al.*, 2015).

O estadiamento do OS pode ser definido pela Classificação de Tumores Malignos (TNM), pelo grau de diferenciação celular ou ainda pelo sistema de estadiamento adotado pela Musculoskeletal Tumor Society Staging System (MSTS) para os tumores musculoesqueléticos, conhecido como estadiamento de Enneking, que é baseado no grau cirúrgico, extensão local, e presença ou ausência de metástases (Quadro 1). A maioria dos tumores de alto grau são classificados como extracompartimental, indicando que a invasão tumoral não ultrapassa o córtex ósseo ou a

cartilagem articular, apesar da presença significativa de mitoses e atipias celulares (Samalet *et al.*, 2015).

Quadro 1. Estadiamento cirúrgico de Enneking para tumores malignos

Estágio	Grau	Sítio	Metástase
IA	Baixo (G1)	Intracompartimental (T1)	M0
IIA	Baixo (G1)	Extracompartimental (T2)	M0
IB	Alto (G2)	Intracompartimental (T1)	M0
IIB	Alto (G2)	Extracompartimental (T2)	M0
III	Qualque G	Qualque T	Metástases

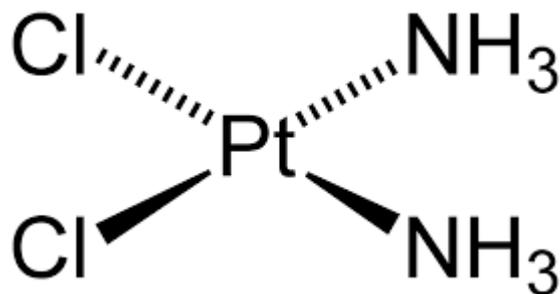
Fonte: Adaptado de Enneking *et al* (2018).

A base para o tratamento curativo para o OS é a cirurgia. No entanto, a taxa de sobrevivência dos pacientes tratados apenas com a cirurgia não ultrapassa os 20% (Bernthal *et al.*, 2012). O tratamento engloba a ressecção cirúrgica juntamente com a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante. Para o OS metastático a quimioterapia é baseada em altas doses de metotrexato, doxorrubicina, e cisplatina, conhecido como o regime MAP, com possível adição da ifosfamida (Tsukamoto *et al.*, 2020). As duas opções principais de tratamento cirúrgico disponíveis são as cirurgias ablativas (amputação e desarticulação) e a de preservação dos membros (Jesus-Garcia.,2013). A quimioterapia neoadjuvante é aplicada entre a nona e décima segunda semana, apresenta efeitos positivos, tais como a redução do tamanho da lesão e tratamento de micrometástases, os quais são benéficos para a melhoria do resultado da cirurgia (Meyers *et al.*, 2015). A radioterapia pode ser empregada tanto após a cirurgia, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor e tratar áreas específicas após o procedimento. Além disso, estudos clínicos sugerem que a radioterapia adjuvante pode contribuir para uma redução do risco de recidiva local (Pakos *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2016). Em alguns casos, as terapias-alvo e a imunoterapia são essenciais, pois alteram as características moleculares específicas das células cancerosas fortalecendo o sistema imunológico na luta contra o câncer (Matthias *et al.*, 2019; Jafari *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2021).

2.1.3 Cisplatina

A cisplatina é um composto inorgânico contendo o cátion Pt^{2+} como centro metálico e os ligantes cloretos e amônias em configuração cis na esfera de coordenação (figura 2). É um agente alquilante que interfere no processo de divisão celular, ligando-se ao DNA e causando danos às cadeias duplas do mesmo. Isso leva à inibição da replicação do DNA e à morte das células cancerígenas. Foi descoberto por Barnett Rosenberg e seus colegas em 1965, durante pesquisas sobre os efeitos da eletricidade em bactérias, onde foi caracterizada como um agente antibacteriano antes de ser reconhecida como um medicamento anticâncer (Bhattacharjee *et al.*, 2022).

Figura 2. Estrutura da cisplatina



Fonte: Wikipédia

A cisplatina entrou em testes clínicos de fase I em 1971 e foi aprovada para o tratamento do câncer de próstata em 1978. A cisplatina também é altamente eficaz no tratamento de câncer de pulmão, ovário, linfoma, melanoma, etc (Dasari; Bernard Tchounwou, 2014). O efeito citotóxico da cisplatina resulta da sua capacidade de se ligar ao DNA, formando adutos que resultam em ligações intra e intercadeias, induzindo alterações estruturais. Esse mecanismo de ação do fármaco está intimamente relacionado à inibição da transcrição e replicação do DNA, culminando na indução da apoptose das células tumorais. Além disso, a cisplatina também promove a geração de radicais livres, a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes e a ativação da

cascatas das caspases, os quais são determinantes no processo de apoptose celular (Rebillard; Lagadic-Gossman; Dimanche-Boitrel, 2008).

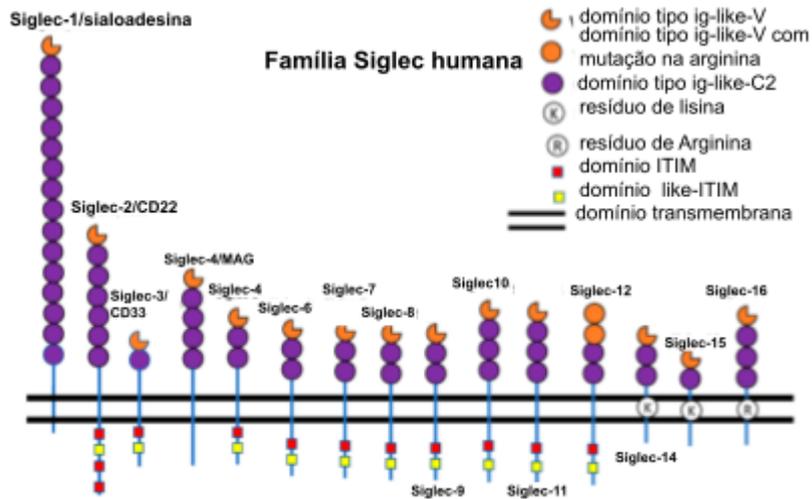
Apesar da eficácia significativa da cisplatina, seus efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, juntamente com a eventual resistência adquirida após prolongada administração, limitam sua utilização. Vários fatores contribuem para essa resistência, incluindo a desativação do fármaco por proteínas e peptídeos contendo enxofre no plasma, reparo do DNA, redução da acumulação intracelular e aumento do efluxo (Cepeda; Kelland, 2007).

2.1.5 Siglecs

Lectinas semelhantes às imunoglobulinas de ligação ao ácido siálico (Siglecs), constituem uma família de proteínas de superfície celular que se ligam especificamente aos ácidos siálicos presentes em glicoproteínas e glicolipídeos. Entre os humanos, são expressos 14 Siglecs, sendo 13 deles encontrados em diversos tipos de células do sistema imunológico. Desses, 9 carregam motivos inibitórios baseados em tirosina imunorreceptora (ITIM), os quais tendem a suprimir as respostas imunes e 3 possuem cargas positivas em seus domínios transmembranares, mediando a associação com a proteína ativadora DNAX de 12 kDa (DAP12) para ativar respostas imunes (Lenza *et al.*, 2020).

Os Siglecs foram classificados em dois subconjuntos com base nas semelhanças de sequência e conservação evolutiva. Os Siglecs relacionados a CD33, mostram um baixo grau de conservação entre ortólogos, e os Siglec-1, 2, 4 e 15, são altamente conservados em mamíferos (Huang *et al.*, 2023). Cada Siglec possui um domínio Ig de conjunto V mais externo (N-terminal), contendo com um sítio de ligação de sialoglicano centrado por um resíduo conservado de arginina, que liga o carboxilato de ácido siálico (Siddiqui *et al.*, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Receptores humanos da família Siglec



Fonte: Adaptado de Siddiqui *et al.*, 2019

Diferentes Siglecs ligam-se a sialoglicanos distintos, o que pode desencadear para iniciar respostas moleculares e celulares específicas que são fundamentais para a função das células nas quais são expressos (Gonzalez-Gil *et al.*, 2021). Quando expressos de forma aberrante nas células tumorais, contribuem para o crescimento e progressão do tumor (Varki *et al.*, 2015). A expressão dos diferentes tipos de Siglecs associados a doenças está citado no Quadro 2.

Quadro 2. Expressão de Siglecs e as principais condições clínicas e/ou doenças associadas.

Siglecs	Expressão	Condições clínicas e/ou Doenças relacionadas
Siglec-1	Macrófagos	Cânceres, doença infecciosa
Siglec-2	Células B	Linfoma de células B, sepse, lúpus, artrite reumatoide, etc.

Siglec-3	Progenitores mielóides, monócitos, macrófagos, mastócitos, microglia, células dendríticas	Leucemias mielóides agudas e crônicas, síndromes mielodisplásicas, etc
Siglec-4	oligodendrócitos, células de Schwann	Lesão nervosa traumática, neuropatia
Siglec-5	Monócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas	Distúrbios de neutrófilos
Siglec-6	Placenta (trofoblasto), células B	Pré-eclâmpsia
Siglec-7	Células NK, monócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas	Mastocitose sistêmica, cânceres de leucemia de mastócitos
Siglec-8	Eosinófilos, mastócitos, basófilos	Asma alérgica, gastrite eosinofílica, urticária crônica
Siglec-9	Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, células T	cânceres, Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, artrite reumatoide
Siglec-10	Células B, macrófagos	Sepse, cânceres, doença do enxerto versus hospedeiro
Siglec-11	Microglia, macrófagos	Problemas neurológicos
Siglec-14	Neutrófilos, monócitos, macrófagos	Lúpus, DPOC
Siglec-15	Osteoclastos, macrófagos	Cânceres, osteoporose
Siglec-16	Macrófagos	

Fonte: Adaptado de Murugesan *et al.*, 2021

O Siglec-1, presente em macrófagos, desempenha um papel crucial na captação de patógenos sialilados, na apresentação de antígenos e na regulação da tolerância imunológica a autoantígenos (Duan *et al.*, 2020). Por outro lado, o Siglec-2, altamente expresso em células B e conservado evolutivamente, atua como um receptor imunoinibitório, caracterizado por múltiplos domínios ITIM intracelulares. Já o Siglec-3 é um receptor inibitório expresso em diversas células, incluindo células progenitoras mielóides, monócitos, macrófagos, mastócitos, microglia cerebral e células dendríticas (Murugesan *et al.*, 2020).

A glicoproteína associada à mielina, MAG (Siglec-4) é expressa por

células mielinizantes do sistema nervoso, incluindo oligodendrócitos no sistema nervoso central e células de Schwann no sistema nervoso periférico. Além disso, é altamente conservada em vertebrados em todo seu domínio extracelular (Quarles *et al.*, 2007).

O Siglec-7, identificado como um receptor imunoinibitório em células Natural Killer (NK), surge como um alvo promissor para terapias voltadas ao controle imunológico no tratamento do câncer. A evidência sugere que o bloqueio do Siglec-7 nas células NK pode liberá-las da inibição mediada por esse receptor, amplificando assim a capacidade de eliminação do tumor (Murugesan *et al.*, 2021). O Siglec-8 é expresso em eosinófilos humanos, mastócitos e em menor expressão em basófilos (Youngblood *et al.*, 2020). O agrupamento de Siglec-8 com anticorpos ou glicanos sintéticos desencadeia a apoptose de eosinófilos e inibe a liberação de mediadores inflamatórios dos mastócitos (Duan *et al.*, 2021).

O Siglec-9 é amplamente expresso em leucócitos humanos e suas funções imunoinibitórias e de checkpoint foram estudadas em relação à inflamação e à evasão imunológica no câncer (Rodrigues *et al.*, 2021). Além disso, o agrupamento de Siglec-9 na superfície celular de neutrófilos, seja por meio de um anticorpo monoclonal ou de um ligante de sialoglicano polivalente, desencadeia a apoptose dos neutrófilos. Esse efeito é amplificado quando os neutrófilos estão ativados. Ademais, a participação do Siglec-9 em macrófagos tem como resultado a inibição da fagocitose (Delaveris *et al.*, 2021).

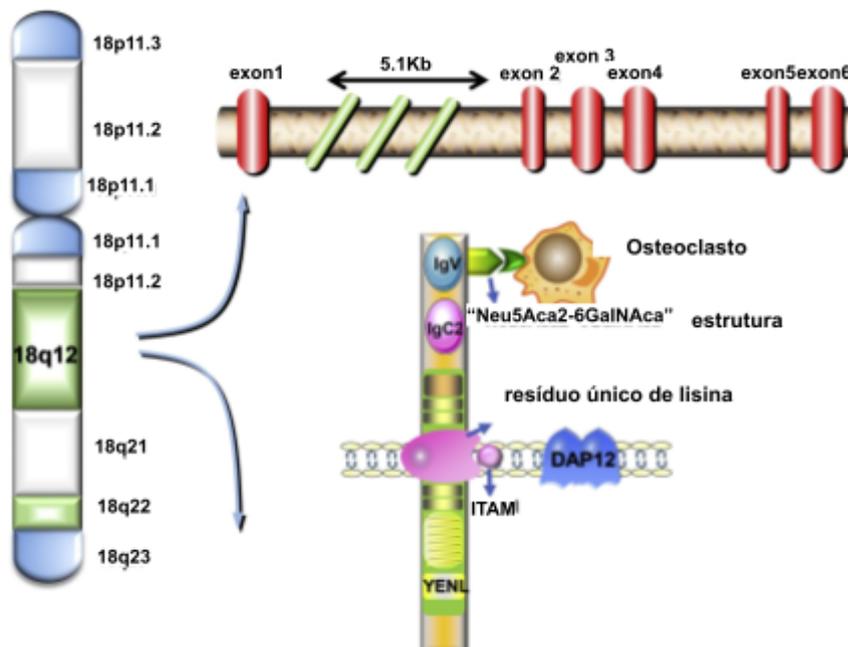
Siglec-11 é um receptor inibitório expresso em macrófagos, e exclusivamente em humanos, na microglia cerebral (Wang *et al.*, 2010). Em humanos, variantes distintas de splicing do Siglec-11 são expressas em macrófagos (com 5 domínios semelhantes a Ig) e microglia (com 4 domínios semelhantes à Ig). Notavelmente, a forma microglial exibe uma afinidade aprimorada ao ácido polisiálico, sendo este expresso por um grupo restrito de proteínas, sendo a molécula de adesão de células neurais (NCAM) o principal transportador de ácido polisiálico no cérebro. O envolvimento do Siglec-11 com o ácido polisiálico resulta na inibição das respostas inflamatórias tanto em macrófagos quanto em microglia (Shahraz *et al.*, 2015).

2.1.6 Siglec15 e osteossarcoma

A lectina 15 semelhante à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (Siglec15) é uma proteína transmembrana que reconhece glicanos sialilados e promove a diferenciação de osteoclastos pela ligação ao DAP12, proteína de ligação a tirosina quinase, apresentando apenas um domínio IgV e um domínio IgC2 (Tsukazaki *et al.*, 2021). Também conhecida como HsT1361, a proteína Siglec15 foi descoberta e estudada pela primeira vez por Takash e colaboradores (2007), como um dos Siglecs mais conservados evolutivamente em vertebrados.

Com base na estrutura, o Siglec15 apresenta algumas diferenças em relação aos outros membros da família Siglec. Ele está localizado no cromossomo 18q13.4, ao contrário dos demais membros que são distribuídos de 19q13.3 a 19q13.4 (Takamiya *et al.*, 2013). Além disso, em vez de conter ITMs, o Siglec15 possui um domínio V-set que se liga preferencialmente às estruturas Neu5Aca2-6GalNAca, o que é essencial para manter a morfologia celular e a atividade de reabsorção dos osteoclastos (Figura 4) (Kang *et al.*, 2020).

Figura 4. Estrutura do gene Siglec15.



Fonte: Adaptado de Kang *et al.*, 2020

A proteína Siglec15 contém um resíduo carregado positivamente em seu domínio transmembranar, sendo considerado, portanto como um Siglec ativador. que foi identificado como um membro , expresso seletivamente em células mielóides e osteoclastos e que geralmente são ausentes em outras células e tecidos do sistema imune (Sun *et al.*, 2021). Siglec15 liga-se preferencialmente ao Sialil-Tn, um O-glicano curto com um resíduo de ácido siálico, cuja superexpressão está associada a vários tipos de câncer epitelial (Munkley, Jennifer., 2016). Foi originalmente caracterizado como um modulador de osteoclastos e estudos anteriores sobre a função da proteína Siglec15 focaram em seus papéis na diferenciação de osteoclastos (Hiruma *et al.*, 2011; Ishida-Kitagawa *et al.*, 2012; Kameda *et al.*, 2015). Kameda e colaboradores (2015) demonstraram que o Siglec15 está envolvido na remodelação óssea fisiológica através da modulação da sinalização do Ativador do receptor do ligante do fator nuclear Kappa-B (RANKL).

Estudos revelam que a depleção de Siglec15 pode promover a formação óssea e diminuir a reabsorção óssea, indicando que ele desempenha papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação da osteoclastogênese que poderia ser um alvo terapêutico não apenas para suprimir a reabsorção óssea, mas também facilitar a remodelação óssea com aumento da massa óssea (Yusuke *et al.*, 2015 ;Yoshiharu *et al.*, 2020). Além disso, vem sendo identificado como um supressor imunológico fundamental envolvido na imunorregulação e um alvo promissor potencial para imunoterapia contra o câncer (Sun *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2019). Os membros imunorreguladores da família Siglec são receptores de superfície celular em células do sistema imunológico que podem reconhecer sialoglicanos em células tumorais, com o objetivo de exercer efeitos inibitórios ou estimuladores no microambiente tumoral (Adams *et al.*, 2018).

Siglec15 pode ser positivamente regulado em macrófagos de tipo M2 induzidos por Fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), no entanto, essa regulação não é observada em macrófagos de tipo M1 (Rina *et al.*). Nos tumores, a expressão do mRNA do Siglec15 não se restringe a um espectro limitado. Ao invés disso, observa-se uma superexpressão do mRNA do Siglec15 em diversas doenças malignas, incluindo câncer de bexiga, rim, pulmão e fígado (Kang *et al.*, 2020).

A expressão de Siglec15 é regulada negativamente pelo Interferon-gama (IFN- γ) em macrófagos derivados de monócitos e linhagem celular RAW 264.7. Essa regulação

depende do fator estimulador de colônias de macrófagos (Wang, Jun et al., 2019). Além disso, a presença de macrófagos associadas a expressão de Siglec15 foi observada em tumores no microambiente tumoral de adenocarcinoma pulmonar (Takamiya *et al.*, 2013) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (Wang *et al.*)

Embora tenha sido relatado que Siglec15 é altamente expresso em vários tumores sólidos (Liu *et al.*, 2021; Hao *et al.*, 2020), a relação específica entre ele e o osteossarcoma ainda é pouco estudada. Um estudo conduzido por Song e colaboradores (2022) avaliou o papel da expressão do gene Siglec15 em células de OS. Nesse estudo foi observado que a redução ou *Knockdown* desse gene tinha efeito na inibição da proliferação celular e na indução da apoptose e piroptose por meio da via Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3/Bcl-2).

Estudos recentes destacam que o Siglec15 pode está associado a indução da progressão maligna de células de OS ao inibir a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), mediada pela proteína fosfatase 1 (DUSP1)). A alta expressão desse foi relacionada à metástase pulmonar e ao prognóstico desfavorável em pacientes com OS (Fan *et al.*, 2021 ; Jiang *et al.*, 2023). Metástases pulmonares também apresentaram maior expressão significativa do gene Siglec15 em relação ao OS primário (Zheng *et al.*,2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do gene Siglec15 em osteossarcoma como possível biomarcador em osteossarcoma

3.1 Objetivos específicos

Realizar análise *in silico* do gene e proteína Siglec15

Investigar a expressão do gene Siglec15 em linhagem de osteossarcoma

4 METODOLOGIA

4.1.1 Análise *in silico*

Para análise dos aspectos moleculares do Siglec15 foi utilizado o banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A avaliação de possíveis interações entre Siglec15 e outras proteínas foi avaliada pelo banco de dados STRINGdb® (Versão 12.0; Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins: <http://string-db.org/>). O STRING é um banco de dados destinado à análise e previsão da conectividade funcional entre proteínas, abrangendo tanto associações diretas (físicas) quanto indiretas (funcionais). Utilizando essa ferramenta, foi possível criar uma rede de interações proteína-proteína (PPI) para a proteína Siglec15, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada de suas funções e eficácia.

Para a análise da expressão de Siglec15 em pacientes com osteossarcoma, foi utilizado o OSE (Explorador de osteossarcoma), um banco de dados que oferece uma plataforma on-line de exploração e análise para dados clínicos integrados, de perfil molecular e de imagem tecidual do osteossarcoma. o OSE oferece uma gama de funções, incluindo descoberta de coorte, painel do paciente, visualização de imagens e análise online.

4.1.2 Cultura de células

A linhagem celular de osteossarcoma SAOS-2 (ATCC:HTB-85) utilizada em nosso estudo foi obtida através do banco de células do Núcleo de Pesquisa em Inovação terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Ela foi cultivada em meio DMEN-High suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após atingir a confluência necessária de 70%, as células foram semeadas em placas de 24 poços (7,5 x 10⁴/por poço) na presença de 1µM e 40 µM de cisplatina (Accord®), respectivamente por 72 horas. As amostras foram semeadas em duplicata e a SAOS-2 sem adição de cisplatina foi utilizada como controle do experimento.

O Trizol® (Invitrogen, UK) foi adicionado às células após-tratamento com

cisplatina e em seguida, armazenadas em freezer a -80°C até a realização da extração do RNA.

4.1.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O sobrenadante das placas celulares ($7,5 \times 10^4$ células) foi submetido à extração de RNA total com 300 μL de Trizol® (Invitrogen). Foram adicionados 75 μL de clorofórmio em cada tubo de 1,5 mL e agitados vigorosamente por 20 segundos, e em seguida as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C .

A solução aquosa translúcida (onde encontra-se o RNA) das amostras foi transferida para novos tubos de 1,5 mL, no qual foi adicionado 187,5 μL de isopropanol a 100%. Após uma homogeneização cuidadosa, as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C para a precipitação do pellet. Depois, o sobrenadante foi descartado, e o pellet obtido foi lavado com 375 μL de etanol a 75% e centrifugado a 7500 rpm durante 5 min a 4°C . Em seguida o sobrenadante foi descartado, e os tubos foram colocados para secar por 3 horas. Após a evaporação total do etanol, o pellet foi ressuspenso em 15 μL de água RNA free e incubado em banho seco por 10 minutos a 55°C . O material obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoFisher) para avaliar a quantidade e qualidade do RNA e armazenado a -80°C .

Para a síntese de cDNA foi realizada com 500 ng de RNA utilizando o high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante.

4.1.5 Expressão por RT-qPCR

A expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o método SYBR® Green (Applied Biosystems) em um termociclador QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems). Os primers do

gene Siglec15 utilizados na reação foram: 5'-CAGCACCGAGATGTTGACGA-3' (senso) e 5'-ACGATCGCTATGAGAGTCGC-3'(anti-senso). O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A expressão relativa de RNA foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.1.6 Análise estatística

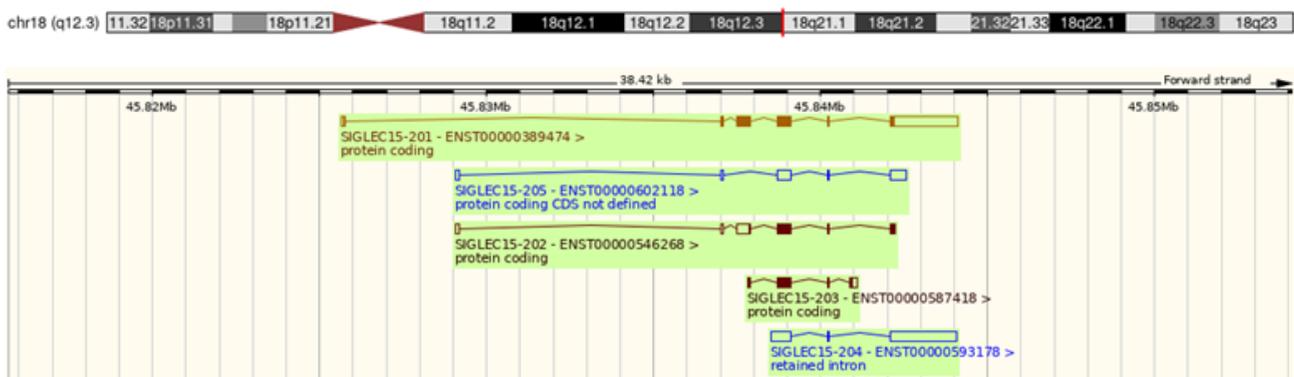
O software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para o tratamento estatístico dos dados. Para os resultados que obedeceram à distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico t (Student). Já para os resultados não-paramétricos, o teste utilizado foi o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos moleculares

O gene Siglec15 está localizado no braço curto (p) do cromossomo 18 humano, mais precisamente na região 18q12.3, é constituído por 6 exons codificantes. Ele se estende em cerca de 2.948 pares de bases (45,825,675-45,844,094 à *forward strand* – 5'-3') e codifica uma proteína de 328 aminoácidos com massa molar de 35,653 (Figura 5).

Figura 5. Localização do gene Siglec15

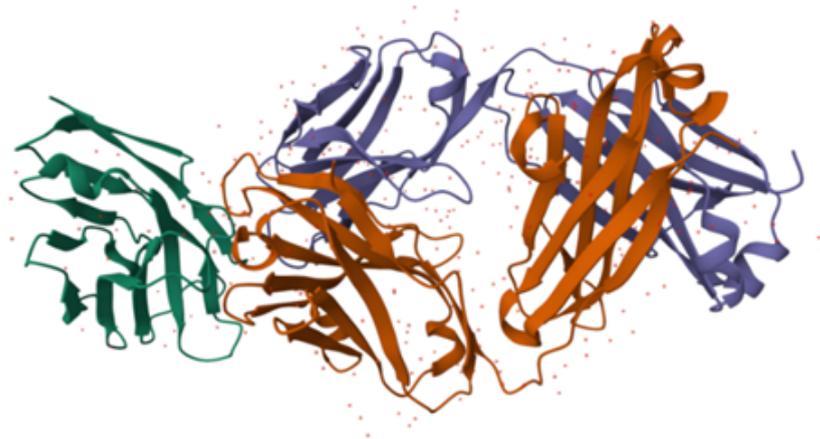


Fonte: NCBI

Em relação à sua estrutura, a proteína Siglec15 é uma proteína transmembranar do

tipo I composta por: (i) dois domínios semelhantes a imunoglobulina (Ig), (ii) um domínio transmembranar contendo um resíduo de lisina e (iii) uma cauda citoplasmática curta (Figura 6).

Figura 6. Estrutura cristalizada da proteína Siglec15

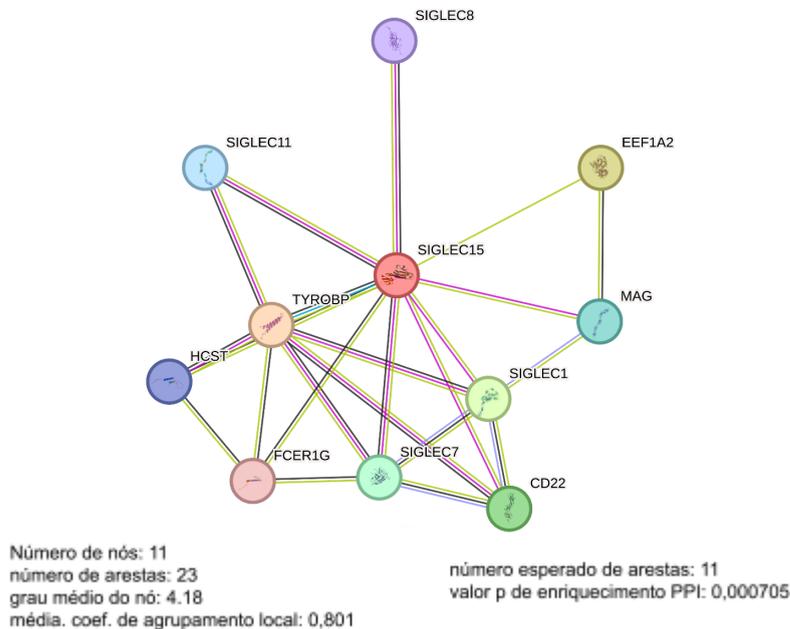


Fonte: PBD – 7ZOZ

Para observar com quais proteínas o Siglec15 possui interação, foi construída a rede de interação proteína-proteína utilizando o banco de dados String-db. Os resultados mostraram que a rede tinha 11 nós e 23 arestas com grau médio de nó 4,18. O coeficiente médio de agrupamento local foi de 0,801. O número esperado de arestas eram 11 , e o valor p de enriquecimento foi de 0,000705 (Figura 7).

As linhas de cores diferentes indicam o tipo de evidência descrita: verde: mineração de texto, rosa: determinado experimentalmente, azul: de banco de dados selecionados, preto: co-expressão e lilás: homologia de proteínas.

Figura 7. Rede de associação do Siglec15 com outras proteínas

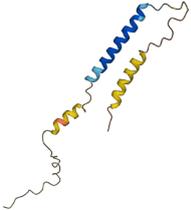


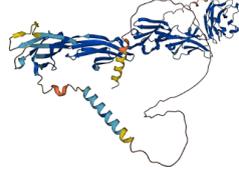
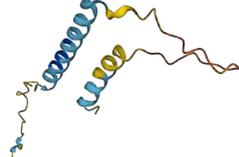
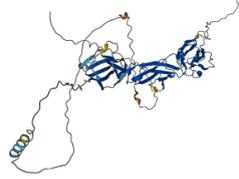
Fonte: String-db.or

Como pode ser observado na figura 7, o Siglec15 apresenta uma maior evidência com as outras proteínas em relação à mineração de texto que indica as análises estatísticas de cocitação em um grande número de textos científicos, que inclui todos os resumos do Pubmed (Amberger *et al.*, 2015). Em segundo lugar, a rede interação proteína-proteína também evidenciou uma interação de dados experimental, demonstrando experimentalmente se ligarem ou estarem no mesmo complexo proteico (Oughtred *et al.*, 2021).

A descrição, função biológica e estrutura 3D conhecida ou prevista dos parceiros funcionais do Siglec15 estão evidenciadas no quadro 3.

Quadro 3 . Dados dos parceiros funcionais do Siglec15

Proteína	Descrição	Função Biológica	Estrutura 3D conhecida ou prevista
TIROBP	Proteína de ligação à tirosina quinase	Se associa de forma não covalente a receptores de ativação encontrados na superfície de uma variedade de células do sistema imune.	
EEF1A2	Fator de alongamento 1-alfa2	Esta proteína promove a ligação dependente de GTP do aminoacilRNA ao sítio A dos ribossomos durante a biossíntese de proteínas.	
SIGLEC-1	Sialoadesina	Atua como um receptor endocítico mediando a endocitose dependente de clatrina. Molécula de adesão restrita a macrófagos que medeia a ligação dependente do ácido siálico aos linfócitos.	
CD22	receptor de células B CD22	Media interações de células B entre células B. Pode estar envolvido na localização de células B em tecidos linfóides.	
SIGLEC-7	Lectina 7 semelhante a Ig de ligação ao ácido siálico	Molécula de adesão putativa que medeia a ligação dependente do ácido siálico às células. Liga-se preferencialmente ao ácido siálico ligado a alfa-2,3 e alfa-2,6.	

MAG (SIGLEC-4)	Glicoproteína associada à mielina	Molécula de adesão que medeia interações entre células mielinizantes e neurônios, ligando-se a gangliosídeos neuronais contendo ácido siálico e às glicoproteínas RTN4R e RTN4RL2 (por similaridade).	
SIGLEC-11	Lectina 11 semelhante a Ig de ligação ao ácido siálico	Molécula de adesão putativa que medeia a ligação dependente do ácido siálico às células.	
HCST	Transdutor de sinal de células hematopoiéticas	A proteína adaptadora transmembrana se associa ao receptor semelhante a lectina de células assassinas (KLRK1), formando o receptor de ativação KLRK1-HCST em células linfóides e mieloides.	
SIGLEC-8	Lectina 8 semelhante a Ig de ligação ao ácido siálico	Molécula de adesão putativa que medeia a ligação dependente do ácido siálico aos glóbulos vermelhos.	
FCER1G	Subunidade gama do receptor épsilon de imunoglobulina de alta afinidade	Proteína adaptadora contendo um motivo de ativação imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) que transduz sinais de ativação de vários imunorreceptores.	

Fonte: Adaptado de String-db.or

Conforme observado na interação entre proteínas, o Siglec15 interage também com os Siglecs-1,4,7, 8 e 11. Um estudo de Zhang *et al.*, 2021, observou a supressão do crescimento tumoral, quando o Siglec-1 era instalado na superfície do tumor. Siglec-7 é expresso em vários tipos de células do sistema imunológico e além de influenciar a função das células imunológicas, vários estudos associaram a expressão do siglec-7 à

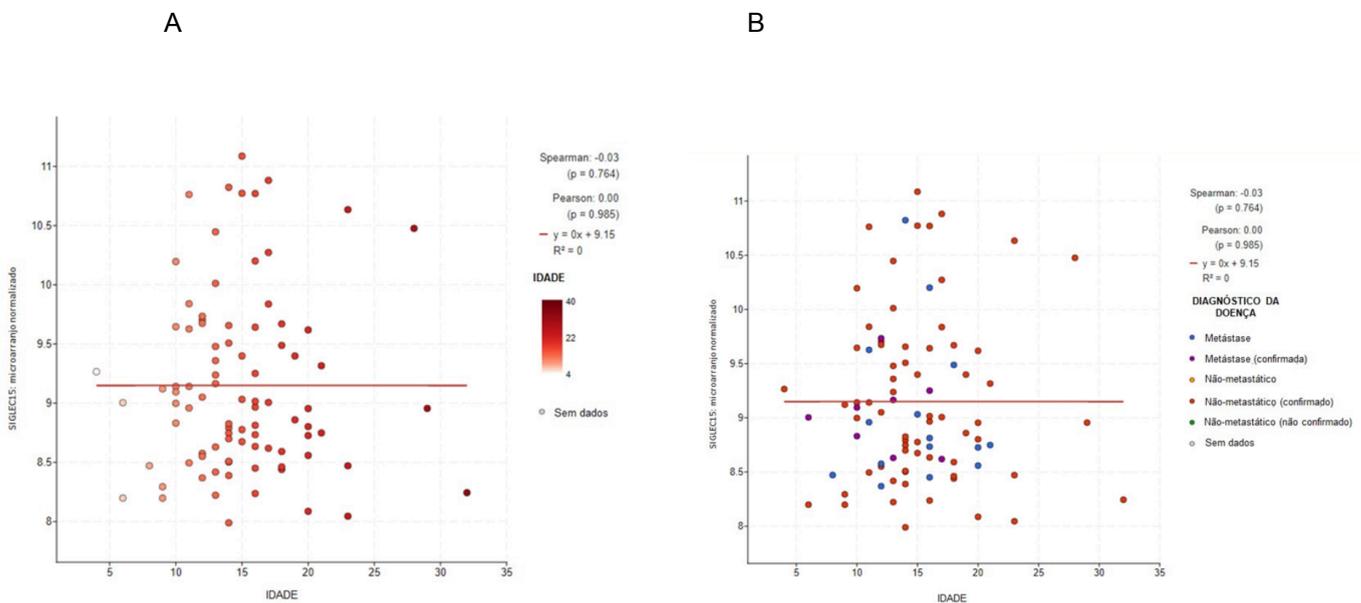
baixa sobrevida de pacientes com câncer (Jandus *et al.*, 2014; Stanczak *et al.*, 2018; Chang LY *et al.*, 2022).

A expressão diminuída do Siglec-8 têm sido associada com mau prognóstico em câncer gástrico (Cao *et al.*, 2016), e recentemente foi investigado o seu papel no câncer de mama (Trebo *et al.*, 2021). No entanto, por mais que esse Siglecs possuam uma interação com o Siglec15, não foi possível encontrar na literatura estudos correlacionando-os com o OS.

5.2 Expressão *in silico* do gene Siglec15

Em relação à correlação entre a expressão do Siglec15 e a idade dos pacientes com OS, não foi visto uma diferença significativa. Do mesmo modo, não houve uma diferença significativa entre a expressão do gene Siglec15 e diagnóstico da doença, ou seja, em pacientes com ou sem metástase (Figura 8. A-B).

Figura 8. correlação entre a expressão do gene Siglec15 com a idade e diagnóstico da doença



Fonte: Yang *et al.* Osteosarcoma Explorer

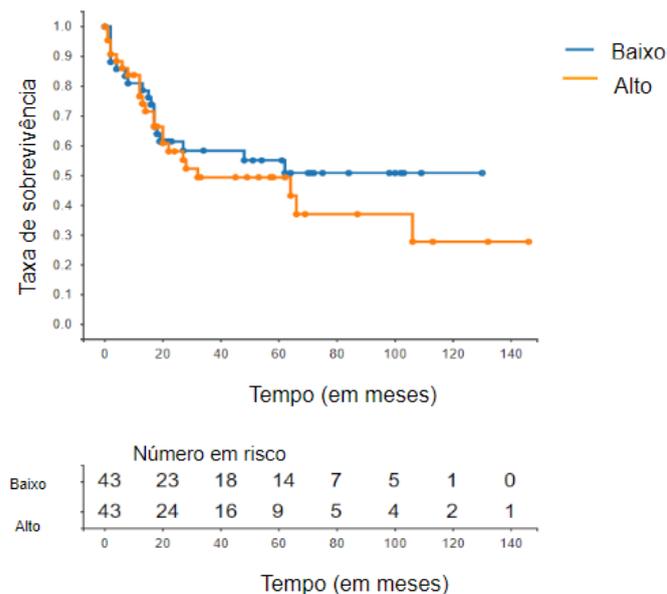
Foi analisada a relação da expressão do Siglec15 com a sobrevida de pacientes com

osteossarcoma utilizando o banco de dados OSE (Explorador de Osteossarcoma). Pacientes com alta expressão de Siglec15 apresentaram uma menor taxa de sobrevivência global e sobrevivência livre de eventos (figura 9 e 10). Foi possível observar também que maior expressão do Siglec15 promove menor taxa de sobrevivência em meses.

No estudo de Fan *et al.*, 2021, a análise de Kaplan-Meier indicou que a alta expressão de Siglec15 poderia prever um mau prognóstico de pacientes com OS. Além disso, a análise mostrou que a taxa de sobrevida global no grupo com alto Siglec15 foi menor do que no grupo com baixo Siglec (P=0,024). Song *et al.*, 2022 analisaram os parâmetros clinicopatológicos de 52 pacientes com osteossarcoma e encontraram forte significância entre a expressão de Siglec15 e o estágio do osteossarcoma.

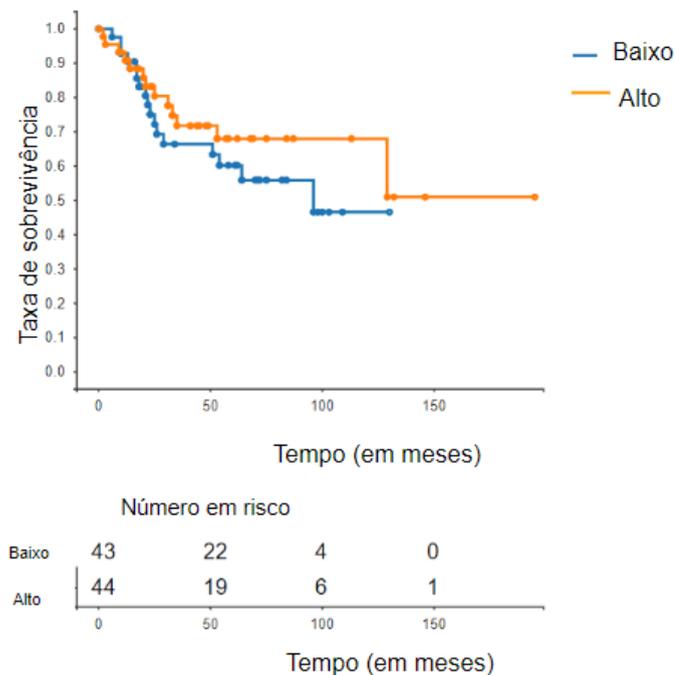
Ademais pela análise da relação entre a sobrevida global de 52 pacientes e a expressão de Siglec15, descobriu-se que o nível de expressão de Siglec15 estava negativamente correlacionado com a sobrevida global de pacientes com osteossarcoma. Esse estudos corroboram com as análises realizadas no banco de dados OSE, demonstrando que níveis altos do gene Siglec15 influenciam negativamente na sobrevida dos pacientes com OS.

Figura 9. Análise de sobrevivência geral (expressão Siglec15)



Fonte: Yang *et al.*, 2023 Osteosarcoma Explore

Figura 10. Análise de sobrevivência livre de eventos (expressão Siglec15)



Fonte: Yang *et al.*, 2023 Osteosarcoma Explorer

5.3 Expressão do Siglec15 na linhagem SAOS-2 sob a influência da cisplatina

As células SAOS-2 de osteossarcoma foram avaliadas quanto a expressão de Siglec15 pós tratamento com cisplatina, um quimioterápico padrão para este tipo de neoplasia. É possível observar que as células tratadas apresentaram um aumento da expressão de Siglec15, no entanto sem significância significativa (Figura 11).

O gráfico gerado a partir do ensaio de RTq-PCR demonstrou que a cisplatina não alterou com significância a expressão do gene Siglec15, apresentando um desvio padrão alto. Possivelmente, umas das razões para a análise não ter tido uma associação significativa da expressão do Siglec15 nas condições estudadas, envolva o n° amostral, tendo em vista que foi realizado apenas um experimento em duplicata e os estudos que demonstram a expressão do Siglec15, repetiram os ensaios três vezes (Fan *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022 e Zheng *et al.*, 2022).

Diante disso, faz-se necessário um estudo posterior para avaliação da expressão do

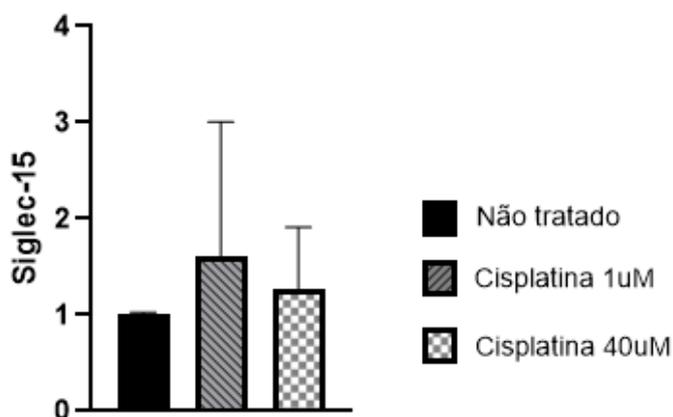
Siglec15 sob efeito da cisplatina, realizando três experimentos diferentes com adição de outras linhagens de OS para observar se a condição se repete.

O Siglec15 vêm sendo associado com a progressão em vários tipos de câncer incluindo o osteossarcoma. Fan *et al.*, 2021, avaliaram a expressão do Siglec15 em células de OS *in vitro* e *in vivo* e descobriram que a regulação negativa do Siglec15 além de diminuir a proliferação, diminuiu a migração e invasão de células de OS.

Eles avaliaram a expressão do Siglec15 em linhagens de células OS diferentes: 143B, KHOS, U2OS, MNNG / HOS e SW1353, observando que a expressão de Siglec15 era maior em células 143B e células MNNG/HOS do que em outras linhagens celulares. Ademais, alta expressão de Siglec15 foi associada à metástase pulmonar, indicando prever um mau prognóstico de pacientes com OS.

Um estudo realizado por Song e colaboradores (2022), descobriu que o knockdown, ou seja, a redução da expressão de Siglec15 em linhagens celulares de osteossarcoma inibiu significativamente a proliferação enquanto promovia a apoptose. A cisplatina é um dos quimioterápicos utilizados durante o tratamento do OS, no entanto, estudos como o de Dasari e Tchounwou (2014) destacam que a cisplatina também pode desencadear estresse genotóxico, ativando múltiplas vias de transdução de sinal. Esse fenômeno pode não apenas promover a apoptose, mas também contribuir para a toxicidade sistêmica e para o desenvolvimento de resistência ao tratamento.

Figura 11. Expressão do Siglec15 na linhagem SAOS-2 sob efeito da cisplatina



média ± o desvio padrão da duplicata de um experimento (*P< 0,05; **P<0,01)

6. CONCLUSÃO

O gene Siglec15 apresenta associação com outras proteínas, incluindo interação com os Siglecs-1,4,7,8 e 11 que também estão associados ao microambiente tumoral. Pacientes que possuem uma maior expressão do Siglec15 apresentaram uma menor taxa de sobrevida global e livre de eventos. A cisplatina não demonstrou efeito significativo em relação à expressão do gene Siglec15 na linhagem SAOS-2, no entanto, novos ensaios são necessários para confirmar o efeito deste quimioterápico na expressão deste gene e avaliar o gene Siglec15 como possível biomarcador de prognóstico em osteossarcoma.

7. PERSPECTIVAS

Desenvolvimentos futuros nesta linha de pesquisa incluem a análise da expressão do gene Siglec15 em diferentes linhagens de osteossarcoma e com experimentos independentes utilizando um conjunto de concentrações de cisplatina.

REFERÊNCIAS

- BEIRD, Hannah C.; BIELACK, Stefan S.; FLANAGAN, Adrienne M.; *et al.* Osteosarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41572-022-00409-y>>. Acesso em: 11 mar. 2024.
- BORGES, Jhonatan Henrique. A nanotecnologia associada a cisplatina no tratamento e diagnóstico do câncer: mecanismo de ação, preparo e toxicidade. 2022. Disponível em: <<https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/1573>>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- CAO, X. *et al.* Identification and characterization of three Siglec15-related immune and prognostic subtypes of breast-invasive cancer. **International Immunopharmacology**, v. 106, p. 108561, maio 2022.
- CHEN, X. *et al.* Analysis of a novel immune checkpoint, Siglec-15, in pancreatic ductal adenocarcinoma. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 268–278, maio 2022.
- DOOSTKAM, A. *et al.* Sialic acid: an attractive biomarker with promising biomedical applications. **Asian Biomedicine**, v. 16, n. 4, p. 153–167, 1 ago. 2022.
- DUAN, Shiteng; PAULSON, James C. Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 38, n. 1, p. 365–395, 2020. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-102419-035900>>. Acesso em: 11 mar. 2024.
- FAN, Mengke; ZHANG, Guochuan; XIE, Mingfang; *et al.* Siglec15 as a New Perspective Therapy Target in Human Giant Cell Tumor of Bone. **Current Oncology**, v. 29, n. 10, p. 7655–7671, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1718-7729/29/10/605>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- FAN, M. *et al.* Siglec15 Promotes Tumor Progression in Osteosarcoma via DUSP1/MAPK Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 710689, 16 jul. 2021.

HIRUMA, Y.; HIRAI, T.; TSUDA, E. Siglec15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, n. 3, p. 424–429, 10 jun. 2011.

HU, J. et al. Siglec15 shapes a non-inflamed tumor microenvironment and predicts the molecular subtype in bladder cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 7, p. 3089–3108, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Tipos de câncer. Câncer infantojuvenil. Rio de Janeiro: INCA, 2022d. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/infantojuvenil>. Acesso em: 10 Dez. 2023.

JAFARI, F. et al. Osteosarcoma: A comprehensive review of management and treatment strategies. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 49, p. 151654, dez. 2020.

JIANG, Kui-Ying; QI, Li-Li; KANG, Fu-Biao; *et al.* The intriguing roles of Siglec family members in the tumor microenvironment. **Biomarker Research**, v. 10, n. 1, p. 22, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40364-022-00369-1>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

JIANG, Kui-Ying; QI, Li-Li; LIU, Xin-Bo; *et al.* Prognostic value of Siglec15 expression in patients with solid tumors: A meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.1073932>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

KANG, Fu-biao; CHEN, Wei; WANG, Ling; *et al.* The diverse functions of Siglec15 in bone remodeling and antitumor responses. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104728, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661819324363>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

KUNDU, Zile Singh. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 48, n. 3, p. 238–246, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052020/>>. Acesso em: 16 fev. 2024.

LI, B. et al. Expression signature, prognosis value, and immune characteristics of Siglec15 identified by pan-cancer analysis. **Oncolmmunology**, v. 9, n. 1, p. 1807291, 1 jan. 2020.

LIANG, Haifeng; CHEN, Qing; HU, Zhichao; *et al.* Siglec15 facilitates the progression of non-small cell lung cancer and is correlated with spinal metastasis. **Annals of Translational Medicine**, v. 10, n. 6, p. 281, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9011207/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

PEREIRA, Margarida Valente. **Nefrotoxicidade induzida por cisplatina: mecanismos de ação e biomarcadores**. masterThesis, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ul.pt/handle/10451/53041>>. Acesso em: 15 mar. 2024.

SIRUFO, Maria Maddalena; DE PIETRO, Francesca; BASSINO, Enrica Maria; *et al.* Osteoporosis in Skin Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4749, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/13/4749>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

SONG, Keliang; MA, Jinfeng; GAO, Yang; *et al.* Knocking down Siglec15 in osteosarcoma cells inhibits proliferation while promoting apoptosis and pyroptosis by targeting the Siglec15/STAT3/Bcl-2 pathway. **Advances in Medical Sciences**, v. 67, n. 2, p. 187–195, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1896112622000141>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

TAKAHASHI, Naoyuki; KOBAYASHI, Yasuhiro; UDAGAWA, Nobuyuki. Chapter 5 - Osteoclasts. *In*: BILEZIKIAN, John P.; MARTIN, T. John; CLEMENS, Thomas L.; *et al.* (Orgs.). **Principles of Bone Biology (Fourth Edition)**. [s.l.]: Academic Press, 2020, p. 111–131. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148419000051>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

TANG, Xi-Yang; LUO, Zhong-Lin; XIONG, Yan-Lu; *et al.* The Proliferative Role of Immune Checkpoints in Tumors: Double Regulation. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5374, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/14/21/5374>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

WANG, J. *et al.* Siglec15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy. **Nature medicine**, v. 25, n. 4, p. 656–666, abr. 2019.

YANG, C. et al. Bone Microenvironment and Osteosarcoma Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 6985, 23 set. 2020.

YE, Zi; WANG, Yetong; XIANG, Binqing; *et al.* Roles of the Siglec family in bone and bone homeostasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115064, 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223008557>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

YE, Z. et al. Roles of the Siglec family in bone and bone homeostasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115064, 1 set. 2023.

ZHENG, Bingxin; SONG, Keliang; SUN, Lingling; *et al.* Siglec15-induced autophagy promotes invasion and metastasis of human osteosarcoma cells by activating the epithelial–mesenchymal transition and Beclin-1/ATG14 pathway. **Cell & Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 109, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13578-022-00846-y>>. Acesso em: 7 dez. 2023.