

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Análise dos efeitos de RAP2A sobre a ativação do fator de transcrição NF-kappaB na via de sinalização celular dos receptores do tipo Toll (TLRs)

Brener Cunha Carvalho
Orientador: Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte – MG
Julho/2014

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Análise dos efeitos de RAP2A sobre a ativação do fator de transcrição NF-kappaB na via de sinalização celular dos receptores do tipo Toll (TLRs)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Belo Horizonte – MG
Julho/2014

*Digo: o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.*

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, a primeira sociedade na qual aprendi a viver, pelo amor e carinho, pelos ensinamentos, apoio incondicional e pela simples oportunidade de estar com vocês nessa vida. Obrigado Mãe, por me ajudar a colar pontas de lápis nas árvores do “Para Casa” do ensino fundamental, e por tantos ensinamentos e carinho durante toda a minha vida. Obrigado Pai, por me ensinar a valorizar coisas que levarei comigo sempre, por me dar tudo aquilo que você não teve, pelo desprendimento e por me ensinar que a maior herança é o conhecimento. Obrigado Thâminha, sou um ser humano mais completo por tê-la como irmã e amiga. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo vocês!

Muito obrigado Piquena (Cynthia), minha companheira e amiga, que muito além dos conselhos profissionais, é hoje parte do que sou. Obrigado por me esperar quando tantas vezes fiquei até tarde no laboratório. Não tenho palavras que façam justiça ao apoio que você é para mim nesse momento e em tantos outros da minha vida. Te Amo!

Agradeço ao apoio dos amigos, em especial ao Igor Almeida, irmão que escolhi.

Agradeço especialmente ao Prof. Aristóbolo, pela orientação e confiança no presente trabalho, e por contribuir em grande parte com a minha formação acadêmica desde o segundo período da graduação. Obrigado Ari, pela disponibilidade, paciência, dedicação, e por me apresentar de diversas formas à ciência. Tenha a certeza de que seus ensinamentos sempre farão parte da minha vida profissional.

Aos membros do LGI, Heliana, Fernanda, Felipe, Igor e Isadora pela ajuda em vários momentos, pela dedicação e por fazer do nosso laboratório um ambiente prazeroso de se trabalhar. Obrigado àqueles que já passaram pelo LGI, Solange, Paula, Thalita, Kátia, Thaís, com os quais aprendi muito e ainda aprendo tanto. Agradeço à Carolina Damas, pela ajuda com vários experimentos e discussões de vários aspectos deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório IMPAR, na pessoa do Prof. Gazinelli; ao Laboratório de Virologia Comparada, em especial à Prof^a Edel e ao Prof. Flávio; e ao Prof. Rodrigo, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de proteínas, pelo auxílio e disponibilidade dos equipamentos.

Obrigado aos colegas da pós-graduação e das disciplinas cursadas, cuja ajuda e convivência foi imprescindível na minha formação.

Agradeço à Rhuanna e demais membros da secretaria da pós-graduação pela presteza e simpatia.

Às agências financiadoras CNPq, Capes, FAPEMIG e INCTV que possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, na pessoa da Prof^a Cristina Guatimosim Fonseca (coordenadora) e da Prof^a. Luciana de Oliveira Andrade (subcoordenadora), além das professoras Cleida Aparecida de Oliveira e Denise Carmona Cara Machado, que estiveram na coordenação do Programa durante grande parte da realização deste trabalho.

À Deus pela oportunidade da vida, e por me permitir cumprir mais esta etapa.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução	1
1.1 Sistema imune inato e receptores do tipo Toll.....	1
1.2 Fatores de transcrição NF-kappaB.....	5
1.2.1 Vias de ativação de NF-κB.....	7
1.2.2 Regulação negativa de NF-κB	9
1.3 Proteínas Ras.....	11
2. Hipótese e justificativa	13
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo Geral:	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4. Metodologia.....	15
4.1 Células	15
4.2 Estimulação celular com agonistas TLR	17
4.3 Extração de RNA total	18
4.5 Síntese da fita simples de cDNA	19
4.6 Oligonucleotídeos (Primers) e condições de PCR.....	20
4.7 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	21
4.7.1 Análise densitométrica	21

4.8 PCR quantitativa a partir da reação de transcrição reversa (RT-qPCR).....	22
4.9 Plasmídeos	22
4.10 Transformação bacteriana.....	23
4.11 Obtenção de DNA plasmidiano em média escala (Midiprep)	24
4.12 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano livre de endotoxinas (Endo-free).....	25
4.13 Transfecções	26
4.14 Análise da atividade luciferase	28
4.15 Análises estatísticas	28
5. Resultados	29
5.1 Expressão reduzida de <i>Rap2A</i> em macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll	29
5.2 A expressão de <i>RAP2A</i> é reduzida também em monócitos humanos estimulados com LPS.....	36
5.3 Efeito de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida por TNF	38
5.4 Efeito de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonistas de TLRs... ..	42
5.5 Efeito de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida por componentes à jusante da via de sinalização dos TLRs.....	48
6. Discussão	54
7. Conclusões	59
8. Referências	60
9. Figuras Anexas.....	69

ABREVIATURAS

BMDMs – Macrófagos derivados de medula óssea (do inglês *Bone Marrow Derived Macrophages*)

DMEM – Meio Eagle modificado de Dulbecco (do inglês *Dulbecco modified eagle's media*)

DMSO – Dimetilsulfóxido (do inglês *dimethylsulphoxide*)

GAP – Proteína ativadora de GTPase (do inglês *GTPase activator protein*)

GEF – Fator de troca de nucleotídeo guanina (do inglês *guanine Exchange factor*)

IL-1R – Receptor de Interleucina-1 (do inglês *Interleukin-1 receptor*)

I κ B – Inibidor de NF- κ B (do inglês *inhibitor of κ B*)

IKK – Cinase de I κ B (do inglês *I κ B kinase*)

IRAK – Cinase associada ao IL-1R (do inglês *IL-1R-associated kinase*)

IRF – Fator regulador de Interferon (do inglês *Interferon regulatory factor*)

LB – Meio de cultura Luria Bertani

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos (do inglês *Mitogen-activated protein kinases*)

Mal/TIRAP – Adaptador tipo MyD88/Proteína adaptadora contendo o domínio TIR (do inglês *TIR domain-containing adapter protein/MyD88-adaptor-like*)

MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mieloide (do inglês *Myeloid differentiation factor 88*)

NF- κ B – Fator nuclear KappaB (do inglês *Nuclear factor kappaB*)

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – Salina tamponada em fosfato (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão (do inglês *pattern recognition receptors*)

TAK – Cinase ativada por TGF- β (do inglês *TGF- β activated kinase*)

TLRs – Receptores do tipo *Toll* (do inglês *Toll-like receptors*)

TRAF6 – Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (do inglês *TNFR-associated factor 6*)

TRAM – Molécula adaptadora relacionada à TRIF (do inglês *TRIF-related adapter molecule*)

TIR – Domínio intracelular de *Toll*, homólogo ao receptor de interleucina-1 (do inglês *Intracellular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor*)

TNF – Fator de necrose tumoral α (do inglês *Tumor necrosis factor*)

TRIF – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon- β (do inglês *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs. Adaptado de: <i>Albiger et al., 2007</i>	2
Figura 2: NF- κ B é um fator de transcrição crucial para várias funções de diversos tipos celulares. Modificado de: <i>Ghosh & Hayden. Immunological Reviews, 2012</i>	6
Figura 3: Fosforilação e degradação de I κ B e consequente translocação de NF- κ B para o núcleo. Retirado de: <i>Sankar Ghosh & Matthew S. Hayden. Nature, 2008</i>	7
Figura 4: Representação simplificada da via de sinalização MyD88 dependente iniciada em TLR4 que leva à ativação de NF- κ B. Adaptado de: <i>Albiger et al, 2007</i>	8
Figura 5: Análise por RT-PCR da expressão de <i>Rap2A</i> em linhagem de macrófagos murinos estimulados com LPS (1 μ g/ml) ou Poly-IC (100 μ g/ml)	30
Figura 6: Análise por RT-qPCR da expressão de <i>Rap2A</i> em linhagem de macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs).....	32
Figura 7: Análise por RT-qPCR da expressão de <i>Rap2A</i> em linhagem de macrófagos murinos estimulados com LPS (1 μ g/ml) por tempos mais precoces	33
Figura 8: Análise por RT-qPCR da expressão de <i>Rap2A</i> em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) estimulados com agonistas de receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs).....	35
Figura 9: Análise por RT-qPCR da expressão de <i>RAP2A</i> em linhagem de promonócitos humanos estimulada com LPS (1 μ g/ml)	37
Figura 10: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da expressão forçada de <i>RAP2A</i> e <i>RasGEF1B</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com TNF. 39	
Figura 11: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de <i>Rap2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com TNF.	41
Figura 12: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com agonista de TLR4.	43
Figura 13: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com agonista de TLR3..	45
Figura 14: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com agonista de TLR2.	47
Figura 15: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de <i>RAP2A</i> sobre a ativação de NF- κ B induzida por Mal/TIRAP.	49

Figura 16: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por TRAF6 (A) ou TAK1/TAB1 (B).....	51
Figura 17: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo complexo IKK (A e B) ou p65(RelA) (C) ...	53
Figura 18: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de Rap2a murino e Gapdh murino	69
Figura 19: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de TNF murino e Gapdh murino.....	70
Figura 20: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de RAP2A humano e GAPDH humano.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: TLRs e seus ligantes. Modificado de Taro Kawai e Shizuo Akira, (2011); e Anwar et al, (2013)..... 4

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, suas sequências, condições termocíclicas e genes alvos.....20

RESUMO

O reconhecimento de patógenos, um evento essencial para o início das respostas do sistema imune inato, é mediado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores do tipo toll (TLRs). A sinalização celular disparada por meio dos TLRs leva à ativação de vários fatores de transcrição, que por sua vez participam da regulação de genes relacionados à resposta inflamatória. Um fator de transcrição central nesse contexto é o NF-kappaB, que precisa ser devidamente modulado por diversos mecanismos, pois a sua desregulação desempenha um papel fundamental em diversas patologias. Portanto, o melhor entendimento dos mecanismos de modulação de NF-kB pode fornecer novas abordagens terapêuticas para diversas doenças. RAP2A pertence à superfamília Ras, um grupo de proteínas envolvidas em diversos processos celulares e que têm sua atividade regulada por moléculas denominadas GEFs e GAPs. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstram que um GEF denominado RasGEF1B é codificado por um gene de expressão induzida por agonistas TLRs e apresenta um papel regulador negativo sobre a ativação de NF-kB mediada por TLRs (Andrade et al, 2010; Rocha, 2014). Em 2009, Yaman e colaboradores (Yaman et al, 2009) descreveram RAP2A como uma molécula efetora de RasGEF1B. Assim, hipotetizamos que, por ser efetor de RasGEF1B, RAP2A também desempenhe uma função regulatória importante sobre a atividade de NF-kB. Logo, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar o efeito de RAP2A sobre a regulação da ativação de NF-kB na via de sinalização celular disparada por TLRs. Primeiramente, determinamos por meio de PCR o perfil de expressão de RAP2A em resposta à estimulação com agonistas de TLRs em linhagens de macrófagos murinos e monócitos humanos. Interessantemente, os níveis de RAP2A já se encontram elevados nas células não-estimuladas, porém são drasticamente reduzidos logo após a estimulação com agonistas TLRs. A partir de estudos de transfecção e ensaios de gene repórter, mostramos que a superexpressão de RAP2A inibe a ativação de NF-kB induzida por diversas moléculas como TNF, proteínas da via de sinalização dos TLRs e agonistas de TLRs, exceto pelo agonista de TLR3. Nossos dados suportam a ideia que RAP2A seja uma molécula importante que contribua para a regulação da ativação de NF-kB na resposta imune mediada pelos TLRs, e que a redução de sua expressão logo após a exposição das células a agonistas inflamatórios seja um evento crítico para permitir que a ativação de NF-kB seja bem sucedida.

ABSTRACT

Pathogen recognition, a key event for the initiation of innate immune response, is mediated by pattern-recognition receptors (PRRs) such as toll-like receptors (TLRs). Cell signaling triggered through TLRs leads to the activation of several transcription factors, which in turn participate in the regulation of genes related to inflammatory response. A critical transcription factor in this context is the NF- κ B, which needs to be properly modulated by several mechanisms, as its dysregulation plays a key role in several diseases. Therefore, a better understanding of NF- κ B modulation mechanisms may provide new therapeutic approaches for various diseases. RAP2A belongs to the Ras superfamily, a group of proteins involved in various cellular processes which have their activity regulated by molecules called GEFs and GAPs. Studies in our laboratory demonstrate that a GEF called RasGEF1B is encoded by a TLR-inducible gene and has a negative regulatory role on the NF- κ B activation mediated by TLRs (Andrade et al, 2010; Rocha et al., 2014). In 2009, Yaman and colleagues (Yaman et al, 2009) described RAP2A as a RasGEF1B effector molecule. Thus, we hypothesized that RAP2A also plays an important regulatory role on the activity of NF- κ B. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the effect of RAP2A in the regulation of NF- κ B activation in cell signaling pathways triggered by TLRs. First, we determined by RT-PCR and RT-qPCR the expression profile of RAP2A in response to stimulation with TLR agonists on murine macrophages and human monocytes. Interestingly, RAP2A levels are already elevated in unstimulated cells, but are dramatically reduced after TLR agonists stimulation. In transfection studies and reporter gene assays, we evaluated the effect of RAP2A on the NF- κ B activation induced by various molecules such as TNF, TLRs agonists and downstream proteins of the TLRs signaling pathway. The results show that when overexpressed, RAP2A inhibits the activation of NF-kappaB induced by these molecules, except by TLR3 agonist. Our data support the idea that RAP2A is an important molecule that contributes to the regulation of NF-kappaB activation in the immune response mediated by TLRs, and that a repression in its expression after exposure of cells to inflammatory agonists is a critical event to allow a successful activation of NF-kappaB.

1. Introdução

1.1 Sistema imune inato e receptores do tipo Toll

O sistema imune de mamíferos é composto pela imunidade inata e pelo sistema de imunidade adquirida. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e é mediado por fagócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas. A imunidade adquirida está envolvida na eliminação de patógenos em uma fase mais tardia da infecção, assim como na geração de memória imunológica (Akira et al, 2006).

O reconhecimento de patógenos microbianos é um evento essencial para o início das respostas do sistema imune inato tais como a inflamação. Esse processo é mediado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) que reconhecem estruturas moleculares amplamente compartilhadas por patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Os PRRs são ainda capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*), como moléculas endógenas provenientes de células necróticas ou de matriz extracelular. (Janeway, 1989; Lucas & Maes, 2013).

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*) são os PRRs mais bem caracterizados, sendo altamente conservados em vertebrados e invertebrados (Wang et al, 2013; Medzhitov, 2007). O receptor originalmente denominado *Toll*, foi descrito como uma molécula crucial na embriogênese de drosófilas (Anderson et al, 1985). No entanto, Lemaitre e colaboradores (1996), observaram que a ativação de *Toll* em drosófilas apresentava similaridades estruturais e funcionais notáveis com a cascata de ativação de NF-kappaB induzida por citocinas (Lemaitre et al, 1996). Esses autores demonstraram que mutantes de drosófilas com a perda de função no receptor Toll eram altamente susceptíveis à infecção fúngica assim como apresentavam uma expressão defeituosa de um peptídeo antifúngico. No ano seguinte, Medzhitov et al (1997) identificaram um homólogo humano para a proteína Toll de drosófila - o que cunhou o termo “receptor do tipo Toll”- mostrando que um mutante constitutivo do Toll humano transfectado em células humanas era capaz de induzir a expressão de citocinas inflamatórias (Medzhitov et al, 1997). Sabemos atualmente, que os receptores do tipo

Toll são cruciais para a indução do sistema imune no combate a microorganismos patogênicos. Os TLRs estão presentes em células residentes e imunes de várias superfícies importantes de interface hospedeiro-patógeno, como na pele e em mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital (Anwar et al, 2013; Mifsud et al, 2014).

Os TLRs são proteínas transmembrana do tipo I caracterizados por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine rich repeats*), uma única hélice transmembrana e um domínio intracelular que é homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, do inglês *Interleukin-1 receptor*), conhecido como domínio TIR (Toll/IL-1R), o qual é requerido para a transdução de sinal. Todos os ectodomínios dos TLRs compartilham de uma estrutura em “forma de ferradura”, mas a diferente composição dos aminoácidos é que torna possível o reconhecimento de diversos PAMPs e DAMPs (Akira et al, 2006; Albiger et al, 2007; Kawai & Akira, 2010; Takagi, 2011)

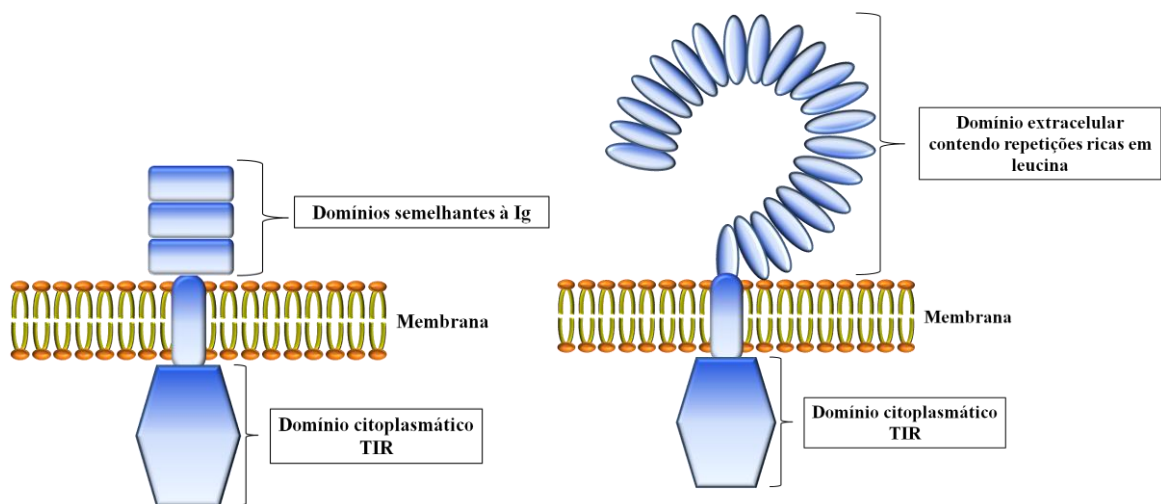


Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs. Os receptores de interleucina 1 (IL-1R) e os receptores do tipo Toll (TLRs) apresentam um domínio intracelular ou citoplasmático semelhante denominado TIR. No entanto, o domínio extracelular desses dois receptores é diferente. Os receptores de IL-1R possuem três domínios semelhantes à imunoglobulina e os TLRs possuem repetições ricas em leucina (LRR) em uma estrutura característica que se assemelha a forma de uma ferradura. Adaptado de *Albiger et al, 2007*.

Até o presente momento, foram identificadas 10 moléculas de TLRs funcionais em humanos (TLRs 1-10), e 12 em camundongos (TLRs 1-9 e TLRs 11-13). Cada TLR detecta distintos PAMPs (Tabela 1) derivados de vírus, bactérias, micobactérias, fungos e parasitas (Kawai & Akira, 2011; Wang et al, 2013). Os receptores TLRs são expressos tanto na superfície da célula quanto associados a vesículas intracelulares (Kawai & Akira, 2011). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, e TLR6 estão localizados na superfície celular e reconhecem uma ampla gama de componentes de membrana derivados de agentes microbianos, enquanto TLR3, TLR7, TLR8, e TLR9 estão localizados em vesículas intracelulares e reconhecem ácidos nucleicos (Blasius & Beutler, 2010). Recentemente foi mostrado que TLR11, um receptor semelhante a TLR5, também é expresso em compartimentos intracelulares (Pifer et al, 2011). Entretanto, alguns TLRs, como por exemplo, TLR2 e TLR4, são removidos da superfície celular após o reconhecimento de moléculas ligantes e são recrutados para o fagossomo de macrófagos (Anwar et al, 2013).

Após o reconhecimento dos PAMPs, a sinalização disparada por TLRs é primariamente mediada via recrutamento de moléculas adaptadoras para o domínio TIR dos TLRs, o que ativa as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs, do inglês *Mitogen-activated protein kinases*) e também vários fatores de transcrição como o NF- κ B (do inglês *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) e IRF3/7 (do inglês *Interferon regulatory factor*). Uma vez ativados, esses fatores são translocados para o núcleo onde se ligam à região promotora de genes inflamatórios, resultado na ativação transcricional de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I. As principais moléculas adaptadoras do domínio TIR dos TLRs são: o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88, do inglês *Myeloid differentiation factor 88*); a proteína adaptadora indutora de IFN-beta que contém o domínio TIR (TRIF, do inglês *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta*), também conhecida como TICAM-1; a proteína adaptadora que contém o domínio TIR, também chamada de molécula adaptadora do tipo MyD88 (TIRAP/Mal, do inglês *TIR domain-containing adapter protein/MyD88-adaptor-like*) e a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adapter molecule*). Com a exceção de TLR3 que utiliza a via TRIF dependente, todos os TLRs recrutam MyD88, sendo que os TLRs 1, 2, 4 e 6 recrutam TIRAP para iniciar a sinalização dependente de MyD88 (Kumar et al, 2011; Takagi, 2011).

Tabela 1: TLRs e seus ligantes. Modificado de Taro Kawai e Shizuo Akira, (2011); e Anwar et al, (2013).

Receptores	Ligantes		
	PAMPs	DAMPs	Adaptador
TLR1/2	Lipoproteínas; Triacil Lipoproteínas (Pam3CSK4).	Não determinado	Mal/MyD88
TLR2/6	Lipoproteínas Diaciladas; Ácido Lpoteicóico (LTA); Zymosan	HSP60, HSP70, Gp96; HMGB1; Fragmentos de Matriz Extracelular	Mal/MyD88
TLR3	dsRNA (poly I:C)	mRNA	TRIF
TLR4	Lipopolissacarídeos (LPS); Proteínas de envelope viral Glicoinositolfosfolipídeos	HSP22, HSP 60,HSP70, HSP72, Gp96; HMGB1; Fragmentos de Matriz Extracelular; Tenascina-C; Fosfolipídeos oxidados; â-defensina 2	Mal/MyD88 TRAM/TRIF
TLR5	Flagelina	Não determinado	MyD88
TLR6/4	Não determinado	Amiloide-â; Lipoproteína oxidada de baixa densidade	MyD88 TRIF
TLR7	ssRNA; Imidazoquinolinas (R848); Análogos de guanosina (loxoribina)	ssRNA do complexo imune	MyD88
TLR8	ssRNA; Imidazoquinolinas (R848)	ssRNA do complexo imune	MyD88
TLR9	CpG DNA não metilado ; Oligodinucleotídeos CpG; Hemozoína	Complexos IgG - cromatina	MyD88
TLR10	Molécula tipo profilina	Não determinado	MyD88
TLR11	Molécula tipo profilina; Bactérias uropatogênicas	Não determinado	MyD88
TLR13	rRNA 23S bacteriano	Não determinado	MyD88

TLR4 ativa tanto a via MyD88 dependente quanto TRIF dependente, utilizando assim todos os quatro adaptadores. Inicialmente, TLR4 recruta TIRAP que facilita o recrutamento de MyD88 para iniciar a primeira fase de ativação de MAPKs e NF- κ B. Para a sinalização TRIF-dependente, TLR4 é transportado para um endossomo via endocitose e forma um complexo com TRAM e TRIF, o qual é requerido para a ativação de IRF3, que induz a produção de interferon beta. Essa via (TRIF dependente) também aciona a segunda fase de ativação de NF- κ B e MAPKs (Kumar et al, 2011).

Os receptores do tipo Toll desempenham um papel importante no início e no desenvolvimento da inflamação contra diversos patógenos, afetando a homeostase do

hospedeiro e permitindo também o princípio da resposta imune adaptativa (Anwar et al, 2013; (Li et al, 2009). Vários estudos utilizam moléculas agonistas de TLRs como potenciais agentes profiláticos e/ou terapêuticos contra doenças infecciosas (Mifsud et al, 2014). Entretanto, exposições subsequentes dos TLRs aos seus ligantes levam a uma insensibilidade ou hiporresponsividade dos mesmos, o que é conhecido como tolerância (LaRue & McCall, 1994). Além disso, os receptores do tipo Toll desempenham um importante papel na tolerância à microbiota comensal do intestino por exemplo (Kamdar et al, 2013). A ativação dos TLRs é controlada por vários sinais específicos e reguladores, pois a ativação descontrolada ou prolongada dos TLRs pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e choque séptico (Yan et al, 2012; Li, 2009; Lucas & Maes, 2013).

Portanto, o melhor conhecimento sobre a modulação das vias inflamatórias e dos mecanismos complexos das vias iniciadas por TLRs, pode levar a um melhor entendimento sobre diversas doenças e possibilitar novas abordagens terapêuticas.

1.2 Fatores de transcrição NF-kappaB

A molécula de NF- κ B foi descoberta em 1986 por Rajan Sen e David Baltimore quando estes pesquisadores tentavam entender o mecanismo de ativação de sequências do gene da cadeia leve kappa de imunoglobulina em linfócitos B. Sen e Baltimore procuravam em extratos nucleares por moléculas que pudessem participar desse mecanismo e descobriram uma proteína que se ligava a uma sequência nucleotídica potencializadora (“enhancer”) do gene que codifica a cadeia leve kappa em células B, a qual nomearam NF- κ B (Doyle & O'Neill, 2006; Ghosh & Hayden, 2012; Sen & Baltimore, 1986).

Desde o seu descobrimento, a família de fatores de transcrição NF- κ B foi objeto de pesquisas intensas em várias áreas da ciência biomédica, e hoje se sabe que a via de NF- κ B é importante para a funcionalidade de diversos tipos celulares e tem papel crucial em vários eventos da imunidade, na inflamação, na proliferação e na sobrevivência celular (figura 2). Na imunidade e nos processos inflamatórios, NF- κ B é importante para a produção de citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão celular,

para produção de substâncias antimicrobianas, diferenciação celular, entre outros processos. Existem ainda, vários estudos que relacionam NF- κ B a patologias como o câncer e doenças metabólicas (Baker et al, 2011; Doyle & O'Neill, 2006; Ghosh & Hayden, 2012; Hayden & Ghosh, 2011).

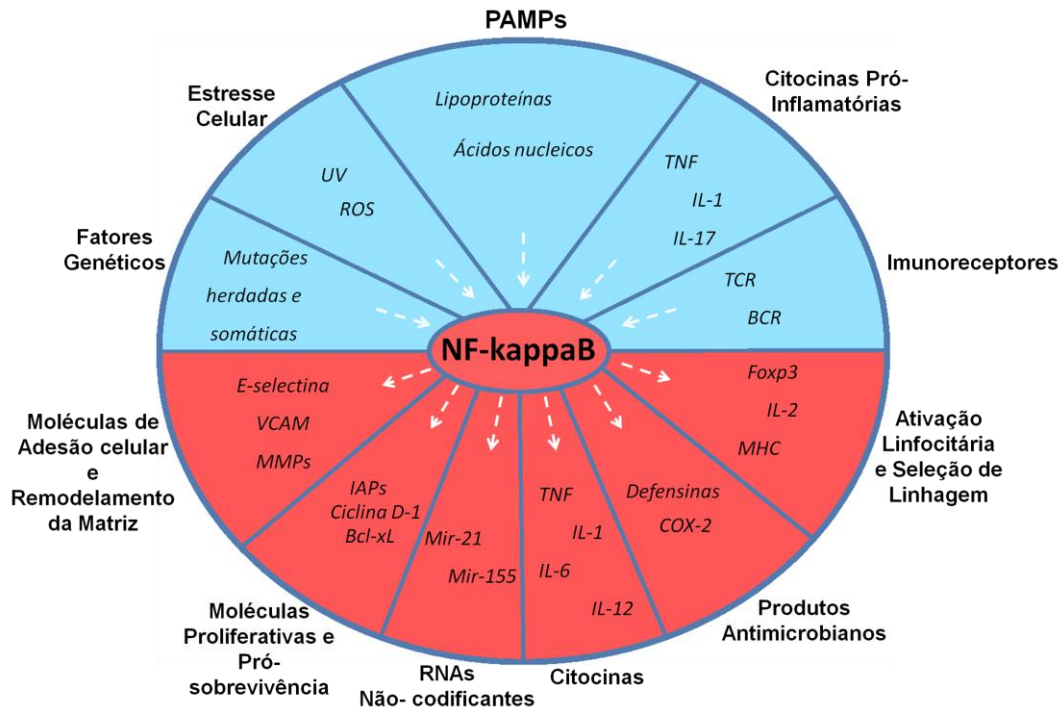


Figura 2: NF- κ B é um fator de transcrição crucial para várias funções de diversos tipos celulares. Sinais que variam de citocinas pró-inflamatórias a estresses incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e a luz ultravioleta (UV) levam à ativação de NF- κ B. Por sua vez, NF- κ B regula a transcrição de vários genes importantes na imunidade, inflamação, proliferação e sobrevivência celular. Modificado de: (Ghosh & Hayden, 2012)

Existem cinco membros na família dos fatores de transcrição NF- κ B em mamíferos: RelA (p65), RelB, c-Rel e as proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) e NF- κ B2 (p100), que são processadas em p50 e p52, respectivamente. Essas proteínas formam dímeros que se ligam a regiões κ B em sequências regulatórias de vários genes causando a indução ou repressão da transcrição dos mesmos (Hayden & Ghosh, 2004; Pahl, 1999).

No citoplasma, os dímeros de NF- κ B estão associados a proteínas inibitórias denominadas I κ B, o que os deixa em condição inativa. Quando há estímulo para a ativação de NF- κ B, as proteínas I κ B são fosforiladas e assim marcadas para ubiquitinação e conseguinte degradação por proteassomas, liberando os dímeros de NF-

κ B que então são translocados para o núcleo (figura 3). A fosforilação de I κ B ocorre por meio do complexo IKK (I κ B cinases), que é composto por duas cinases cataliticamente ativas, IKK α e IKK β , e uma subunidade regulatória denominada IKK γ (NEMO, do inglês *Nuclear factor κ B essential modulator*) (Oeckinghaus et al, 2011).

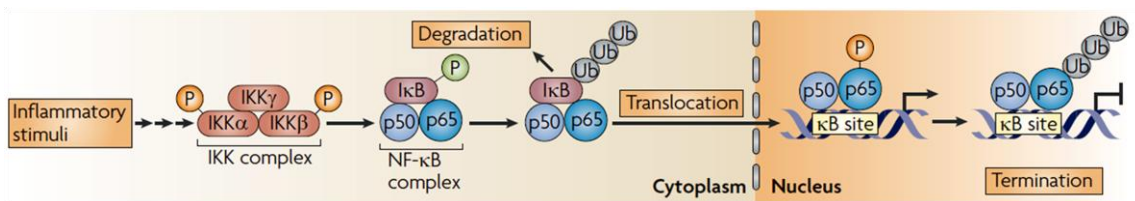


Figura 3: Fosforilação e degradação de I κ B e consequente translocação de NF- κ B para o núcleo. Ao final da cascata de sinalização para ativação de NF- κ B após um estímulo inflamatório, as proteínas I κ B são fosforiladas pelo complexo IKK e degradadas, liberando os dímeros de NF- κ B para o núcleo. *Retirado de: (Ghosh & Hayden, 2008)*

Os cinco polipeptídeos do grupo de NF- κ B pertencem à mesma família devido à presença de uma sequência homóloga próxima à região N-terminal denominada região de homologia Rel (RHR, *Rel homology region*), que tem aproximadamente 300 resíduos. O RHR é responsável pela maioria das funções críticas de NF- κ B, incluindo a associação com os inibidores I κ B e a ligação ao DNA dentro do núcleo, sendo dividido em três regiões estruturais: domínio N-terminal (NTD, *N-terminal domain*), domínio de dimerização (DD, *dimerization domain*), e o sinal de localização nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) (Ghosh et al, 2012).

1.2.1 Vias de ativação de NF- κ B

As vias de sinalização que culminam na ativação de NF- κ B podem ser classificadas em canônica e não-canônica. A via canônica, ou clássica, pode se iniciar por meio de estímulos reconhecidos por diferentes receptores, como os receptores de TNF (TNFR, *TNF receptors*), de IL-1 (IL-1R, *IL-1 receptor*), receptores de antígenos, ou PRRs como os receptores do tipo Toll. A via não-canônica, ou alternativa, é induzida por membros específicos da família de TNF, e em contraste com a via clássica, a via alternativa é independente de NEMO (Hayden & Ghosh, 2012).

A ativação clássica de NF- κ B via TLRs pode ser tanto MyD88 dependente quanto TRIF dependente, o que está relacionado à molécula de TLR acionada, como descrito previamente. No caso de TLR4, por exemplo, as duas vias são ativadas, sendo que MyD88 recruta IRAK-4 (*IL-1R-associated kinases-4*), IRAK-4 forma um complexo com IRAK1, e este complexo é responsável pela ligação de TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*), que por sua vez recruta os complexos TAK1 (*TGF- β activated kinase*) e IKK, levando à ativação de NF- κ B (figura 4). A via TRIF de TLR4 ativa predominantemente IRF3 que induz a produção de interferons do tipo I, mas também ativa NF- κ B ao recrutar RIP1 (*Receptor interacting protein 1*) que por sua vez recruta e ativa TRAF6, TAK1 e IKK (Hayden & Ghosh, 2012).

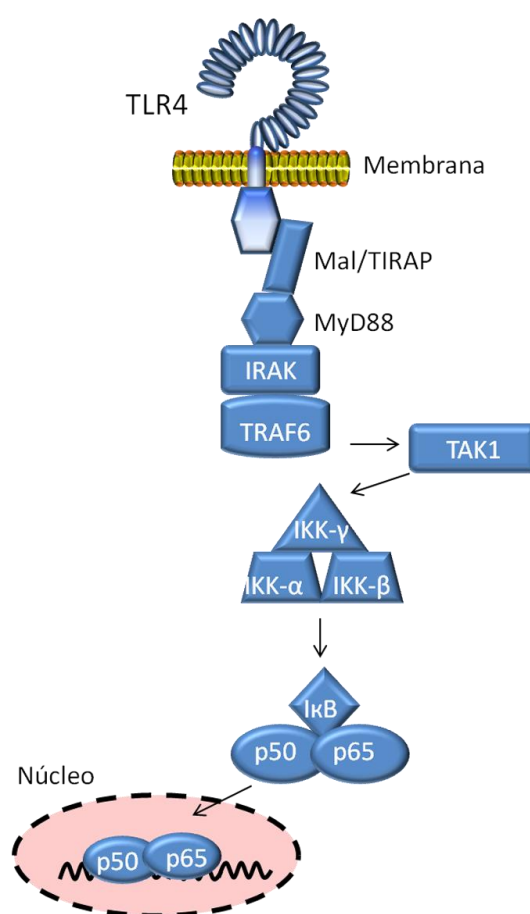


Figura 4: Representação simplificada da via de sinalização MyD88 dependente iniciada em TLR4 que leva à ativação de NF- κ B. MyD88 recruta IRAK que é responsável pela ligação de TRAF6, que por sua vez recruta os complexos TAK1 e IKK, levando à ativação de NF- κ B e sua consequente translocação para o núcleo. A via de TLR2 ocorre de forma semelhante, enquanto a via de TLR3 utiliza como molécula adaptadora a proteína TRIF, e não Mal/TIRAP e MyD88. Baseado em: (Kawai & Akira, 2007)

Outro modo de ocorrer a ativação da via de sinalização canônica de NF- κ B acontece por meio do receptor 1 de TNF (TNFR1, *tumor necrosis factor receptor 1*). A estimulação de TNFR1 leva à ligação de TRADD (*TNFR, associated protein with a death domain*) nesse receptor, que fornece uma plataforma para o recrutamento de FADD (*Fas receptor-associated death domain*) e TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*). FADD pode induzir morte celular por apoptose ou necroptose, enquanto TRAF2 coopera com RIP1 para o recrutamento dos complexos TAK1 e IKK, levando à ativação de NF- κ B (Hayden & Ghosh, 2012; Oeckinghaus et al, 2011).

1.2.2 Regulação negativa de NF- κ B

NF- κ B é um regulador crítico de múltiplas funções biológicas incluindo a imunidade e sobrevivência celular, e a sua ativação imediata é essencial para a defesa do hospedeiro contra várias classes de agentes patogênicos. Portanto, a regulação de NF- κ B deve ser finamente regulada, pois sua desregulação pode resultar em condições patológicas como inflamações crônicas, choque séptico, autoimunidade e câncer (Harhaj & Dixit, 2011; Harhaj & Dixit, 2012; Ruland, 2011).

A principal proteína inibitória de NF- κ B é I κ B, que mascara a sequência de localização nuclear (NLS) de NF- κ B impedindo-o de ser translocado para o núcleo, além de inibir sua habilidade de se ligar ao DNA. Portanto, para que NF- κ B seja ativado, I κ B precisa ser fosforilada por meio do complexo IKK. Além disso, estudos já mostraram que I κ B α , quando expresso no compartimento nuclear, não só inativa a transcrição dependente de NF- κ B, como também transporta NF- κ B de volta para o citoplasma (Arenzana-Seisdedos et al, 1997; Beg et al, 1992; DiDonato et al, 1996; Henkel et al, 1992).

A ativação de IKK é promovida por mudanças conformacionais em IKK γ após a ligação de ubiquitinas a esta proteína. Embora a ubiquitinação seja uma modificação pós-traducional reversível mais conhecida por marcar uma proteína para a degradação mediada por proteassomos, estudos recentes têm demonstrado numerosas funções não-proteolíticas da ubiquitinação, incluindo o transporte de proteínas e ativação de cinases e proteases. De fato, várias deubiquitinases (DUB), enzimas que degradam a ubiquitina que foi adicionada a uma proteína-alvo, estão criticamente envolvidas na regulação

negativa da sinalização canônica de NF- κ B, e a DUB mais bem estudada que modula negativamente NF- κ B é denominada A20 (Harhaj & Dixit, 2011; Ruland, 2011).

A proteína A20, também conhecida como TNFAIP3 (do inglês, *TNF-alpha-induced protein 3*), foi identificada em 1990 como um gene de expressão rapidamente induzida em resposta à estimulação por TNF em células endoteliais de veia umbilical humana (Opipari et al, 1990). Em 1996, vários grupos mostraram que a super expressão de A20 inibe a ativação de NF- κ B em resposta à estimulação por TNF ou IL-1 (Cooper et al, 1996; Jaattela et al, 1996; Song et al, 1996). Em um desses estudos, foi indicado que A20 interage com TRAF2, um molécula chave na sinalização da via de TNF (Song et al, 1996). Um trabalho interessante de Lee e colaboradores, mostra que fibroblastos de embrião murino (MEFs, do inglês *Mouse Embryonic Fibroblasts*) deficientes de A20 exibem uma indução persistente da via de NF- κ B induzida por TNF- α e IL-1, caracterizada por uma ativação prolongada de IKK e consequente degradação de I κ B α (Lee et al, 2000). Existem ainda, estudos que mostram a interação de A20 com TRAF6 (Heyninck & Beyaert, 1999) e apontam RIP1 como outro potencial alvo de A20 (Heyninck et al, 1999). Na verdade, sabe-se hoje que A20 modula negativamente não apenas a via de TNFR1, mas também inibe a sinalização da via canônica de NF- κ B disparadas por PRRs e receptores de antígeno. É importante ressaltar que a expressão de A20 é diretamente induzida pela atividade de NF- κ B, ou seja, A20 faz parte de um mecanismo de retro-alimentação negativa (Ruland, 2011).

Outra proteína importante que age por meio de deubiquitinação na regulação negativa de NF- κ B é CYLD (do inglês, *Cylindromatosis*), que é capaz de deubiquitinar moléculas como TRAF2, TRAF6, TAK1 e IKK γ . Diferentemente de A20, a expressão de CYLD não é diretamente induzida por NF- κ B, mas a sua atividade é ainda controlada de uma maneira dependente de estímulo, por fosforilação ou localização celular (Ruland, 2011). Existem ainda várias proteínas e diferentes mecanismos de regulação negativa de NF- κ B descritos na literatura. Estudos sobre proteínas da família Ras que cumpram este papel também já foram descritos. Um exemplo, é o da proteína κ B-Ras, que em um trabalho publicado por Tago e colaboradores, foi relacionada à regulação negativa da via de NF- κ B (Tago et al, 2010).

1.3 Proteínas Ras

A superfamília Ras de pequenas proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina (do inglês, *small guanine nucleotide-binding G proteins*), também chamadas de pequenas proteínas G devido à sua baixa massa molecular, compreendem mais de 150 membros em humanos, e com base nas funções e similaridade de sequências são divididas em cinco famílias principais: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. São proteínas monoméricas de baixo peso molecular que varia de 20 a 25 kDa, e que regulam diversos processos celulares incluindo a progressão do ciclo celular, sobrevivência, organização do citoesqueleto de actina, polaridade e movimentação celular e transporte vesicular e nuclear (Bos et al, 2007; Vigil et al, 2010).

As pequenas proteínas G alternam entre uma forma inativa, ligada a GDP, e outra ativa, ligada a GTP. A troca entre as duas formas, é controlada pelos fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*), que catalisam a troca de GDP por GTP, e pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs, *GTPase-activating proteins*), que inativam as pequenas proteínas G ao induzir a hidrólise do GTP. Embora todas as proteínas da superfamília Ras apresentem o mesmo mecanismo de regulação, cada subfamília tem seu próprio grupo de GEFs e GAPs (Bos et al, 2007; Cherfils & Zeghouf, 2013; van Dam et al, 2011).

A família Ras compreende 36 membros em mamíferos e é dividida em três grupos principais: Ras, Ral e Rap (Cherfils & Zeghouf, 2013). O grupo das proteínas Ras propriamente ditas é o fundador da linhagem de proteínas G de baixo peso molecular (Bos et al, 2007; Johnson & Chen, 2012), e seus três membros canônicos H-Ras, N-Ras e K-Ras foram identificados devido a sua frequente ativação oncogênica em tumores humanos (Castellano & Santos, 2011). Após a estimulação por um fator de crescimento ou outro estímulo extracelular, um receptor tirosina cinase (RTK) ativa um GEF que por sua vez ativa Ras, e esta desencadeia três vias efetoras primárias: a via Raf/MEK/ERK, envolvida na proliferação celular, sobrevivência, mitose e migração; a via PI3K, importante componente da transformação celular; e a via RalGDS, que ativa RalA e RalB, as duas isoformas do grupo Ral (Colicelli, 2004; Friday & Adjei, 2008; Johnson & Chen, 2012). O grupo das proteínas Ral (Ras-like) compartilha aproximadamente 50% de homologia com Ras, e estão envolvidas em processos

celulares como transporte de vesículas e progressão do ciclo celular (Downward, 2003; Johnson & Chen, 2012).

O grupo de proteínas Rap também apresenta cerca de 50% de homologia com Ras e possui cinco membros: Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B e Rap2C, que possuem uma sequência de aminoácidos idêntica em suas regiões efetoras (Johnson & Chen, 2012; Paganini et al, 2006). Embora as proteínas Rap sejam amplamente expressas, a quantidade relativa de membros individuais pode variar consideravelmente dependendo do tecido ou do tipo de célula considerada (Paganini et al, 2006). As isoformas Rap1A e Rap1B são as mais bem estudadas, enquanto que as proteínas Rap2 foram menos investigadas (Johnson & Chen, 2012; Paganini et al, 2006). As proteínas Rap têm sido ligadas principalmente à regulação da adesão celular, e, além disso, Rap1 tem sido implicada no estabelecimento de polaridade, proliferação celular e no controle de interações célula-célula (Gloerich et al, 2012; Johnson & Chen, 2012).

Bigler e colaboradores mostraram que Rap2A está envolvida na expressão de PSA (do inglês, *prostate-specific antigen*) andrógeno-dependente, assim como no crescimento andrógeno-dependente da progressão do câncer de próstata em linhagens celulares humanas (Bigler et al, 2007). Em um trabalho de 2010, Kawabe e colaboradores concluem que uma via de sinalização envolvendo Rap2A regula o crescimento de neuritos em neurônios de mamíferos (Kawabe et al, 2010). Rap2A também está envolvida na polarização de células intestinais que leva à formação da borda em escova (Gloerich et al, 2012). Yaman e colaboradores mostraram ainda que RasGEF1B funciona como um fator de troca de nucleotídeo guanina para Rap2A (Yaman et al, 2009). Este é um dado importante para a formulação da hipótese no presente trabalho, pois análises funcionais realizadas no nosso laboratório (LGI- Laboratório de Genes Inflamatórios) demonstram que RasGEF1B é um regulador negativo da atividade de NF- κ B mediada por TLRs (Lima, 2012; Valverde, 2011; Rocha-manuscrito em preparação).

2. Hipótese e justificativa

RAP2A foi descrita como molécula efetora de RasGEF1B (Yaman et al, 2009). Dados obtidos em nosso laboratório (LGI, Laboratório de Genes Inflamatórios) demonstram que a proteína RasGEF1B é codificada por um gene de expressão induzida por agonistas TLRs. Além disso, estudos funcionais realizados no LGI mostram que RasGEF1B é um regulador negativo da atividade de NF- κ B mediada por TLRs (Lima, 2012; Valverde, 2011; Rocha-manuscrito em preparação). Tomando em conjunto essas observações, hipotetizamos que RAP2A também desempenha uma função regulatória importante sobre a atividade de NF- κ B.

A ativação das células seja por PAMPs microbianos, ligação de citocinas aos seus receptores ou pelo reconhecimento de antígenos é mediada pela ativação do fator de transcrição NF- κ B que controla a expressão de vários genes pró-inflamatórios. As observações feitas nos últimos 20 anos de que muitas doenças comuns, incluindo o câncer, doenças autoimunes e até o choque séptico estão associadas com a desregulação da atividade do NF- κ B, provocaram um grande interesse no estudo desse fator de transcrição e nas vias de sinalização que controlam a sua atividade. Diante desse cenário, ao investigar os efeitos de RAP2A na via de sinalização dos TLRs que leva à ativação de NF- κ B podemos contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de regulação envolvendo esse fator de transcrição no controle da resposta inflamatória e até mesmo na compreensão dos mecanismos de controle de patologias como doenças inflamatórias crônicas e o câncer.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de RAP2A sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B mediada pela via de sinalização de receptores do tipo Toll (TLRs).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar, por meio de RT-qPCR, se a expressão de RAP2A é modulada em resposta à estimulação com agonistas de TLRs em linhagens de macrófagos murinos e monócitos humanos;
- Avaliar, por estudos de transfecção e ensaios de gene repórter, o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por TNF;
- Avaliar, por estudos de transfecção e ensaios de gene repórter, o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonistas de TLRs;
- Avaliar, por estudos de transfecção e ensaios de gene repórter, o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por proteínas críticas da via de sinalização dos TLRs como Mal/TIRAP, TRAF-6, TAK1/TAB1, IKK- α , IKK- β e p65/RelA;

4. Metodologia

4.1 Células

Neste estudo, foram utilizadas células HEK293, THP-1, RAW264.7 e BMDMs. HEK293 é uma linhagem imortalizada de células epiteliais de rim de embrião humano contendo o antígeno tipo 5 de adenovírus. Para o seu cultivo, as células HEK293 eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e, imediatamente, eram descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão de células era transferida para uma garrafa estéril de cultura de células (TPP, 25cm²) contendo 5mL de meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's, LGC), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-Invitrogen) e antibióticos (100µg/mL estreptomicina / 100 U/mL penicilina, Gibco-Invitrogen). As células eram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após 4 horas, o meio era desprezado com a finalidade de eliminarmos debris celulares e DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) proveniente do meio de congelamento, além das células inviáveis que não aderiram à superfície da garrafa de cultura. Ao atingirem 80-90% de confluência, era realizada a passagem para outra garrafa de cultura estéril (TPP, 75 cm²) para a manutenção das células. Para realizar as passagens, o meio de cultura era desprezado do frasco e a monocamada de células era então lavada com PBS1X (NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1Mm; KCl 2mM). Em seguida, eram adicionados 2mL de Tripsina 0,4%-EDTA (Gibco-Invitrogen) por frasco, que era incubado a 37°C por 1 minuto. Posteriormente, eram adicionados 4 mL de meio completo fresco, parte do volume total era desprezado dependendo da quantidade de células e o restante era ressuspensão totalizando um volume de 20mL.

Para se realizar o congelamento esperava-se que as células atingissem de 80 a 90% de confluência, então eram lavadas em PBS 1X e tripsinizadas como descrito anteriormente, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Hybri-Max, Sigma). Um mililitro dessa suspensão era colocado em tubo de congelamento (TPP), e transferido para um freezer a -70°C. Após 24-48 horas, os tubos eram transferidos para botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

As células RAW264.7 são uma linhagem imortalizada de macrófagos murinos amplamente utilizada em estudos relacionados com a resposta inflamatória (Olsson &

Sundler, 2006; Ramana et al, 2006), por expressarem os receptores do tipo Toll (TLRs) (Applequist et al, 2002), além de outras características de células fagocíticas profissionais. Os procedimentos para o seu cultivo, passagens e congelamento eram semelhantes aos já descritos para as células HEK293, exceto que o soro fetal bovino utilizado era proveniente da HyCLONE (USA) ou Cultilab (Brasil), e as garrafas estéreis para cultura de células de 25 e 75 cm² utilizadas eram de superfície não-tratada, provenientes de outro fabricante (NUNC).

As células THP-1 são monócitos provenientes de sangue periférico humano retirados de indivíduo portador de leucemia monocítica aguda (Tsuchiya et al, 1980). Diferentemente das demais linhagens celulares utilizadas no presente trabalho, as células THP-1 não se aderem às garrafas de cultura, ou seja, são cultivadas em suspensão no meio. Para iniciar o cultivo, as células eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular era então colocada em uma garrafa estéril de cultura de células (TPP, 25 cm²) contendo meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% SFB (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco) e antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As células eram incubadas em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% CO₂. Entre 24 e 48h após esse procedimento, era realizada a passagem de todo o conteúdo do frasco de cultura para uma garrafa de cultura de 75cm² (TPP) onde as células eram mantidas com 30-40 mL de meio. Para manter as células em cultivo, a cada 2-3 dias metade da suspensão celular era desprezada (dependendo da quantidade de células) e quantidade similar de meio RPMI-1640 suplementado era adicionado à cultura. Para o congelamento, as células eram centrifugadas a 180 x g por 5 minutos, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Hybri-Max, Sigma).

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 (selvagens). Os animais foram eutanasiados e os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia) e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células foram removidas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril.

Para a diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB (Soro Fetal Bovino), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. O sobrenadante de células L929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos. A suspensão de células foi colocada em placas de Petri estéreis e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 7 dias, sendo que no quarto dia o meio foi renovado pela adição de 10 mL de meio RPMI contendo 20% de SFB e 30% de sobrenadante de cultura de células L929, como descrito acima. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa foi lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de PBS à cultura na placa, seguido de incubação no gelo por 10 minutos. As células aderidas na placa, já diferenciadas como macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), foram removidas por ressuspensão com PBS gelado, e transferidas para tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 200 x g / 5 min a 4°C e ressuspensos em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% SFB, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929. As células foram então incubadas em estufa a 37°C, atmosfera a 5% CO₂ e mantidas até o dia seguinte quando foram estimuladas.

4.2 Estimulação celular com agonistas TLR

Para análise da expressão gênica em resposta à estimulação com agonistas de TLRs, foram utilizadas as células RAW264.7 ou BMDMs murinas, e THP-1 humanas. As células RAW264.7 ou BMDMs foram plaqueados em placa de 24 wells (JetBioFil) na densidade de 3×10^5 células por poço num volume de 500µL de meio DMEM completo. Os estímulos foram feitos com LPS O55:B5 (agonista de TLR4)(Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 1µg/mL, poly-IC (agonista de TLR3)(Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 100µg/mL, e Pam3CSK4 (agonista de TLR2)(Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 100ng/mL. Um grupo de células não estimuladas foi usado como controle, enquanto que os outros grupos foram estimulados nos intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 horas para cada agonista.

As células THP-1, devido a sua natureza de cultura em suspensão, eram primeiramente transferidas para tubos Falcon de 50mL (JetBioFil) e centrifugadas a 180 x g por 5 minutos antes da contagem. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em PBS 1X e novamente ressuspensas em meio RPMI completo. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e posteriormente plaqueadas em placas de seis poços (Corning, USA) na concentração de 3×10^6 células por poço em um volume de 2mL cada. Os estímulos foram realizados de forma semelhante ao que foi feito para as células RAW264.7, com os mesmos agonistas e nos mesmos tempos. Ao término das estimulações, tanto para as células THP-1 quanto para os macrófagos murinos, foi seguido o protocolo de extração de RNA total descrito a seguir.

4.3 Extração de RNA total

Para as células THP-1, ao término das estimulações com os agonistas TLRs, as suspensões celulares foram transferidas para tubos cônicos de 15mL (Corning). Apesar da sua natureza de cultura em suspensão, parte das células THP-1 se aderem ao poço da placa após o estímulo com agonistas de TLRs. Portanto, para a extração do RNA de células que se encontravam aderidas, um mililitro do reagente TRIzol (Invitrogen) foi adicionado ao poço seguido de homogeneização do conteúdo das placas em shaker orbital. Para a obtenção do RNA total das células em suspensão, os tubos de 15mL foram centrifugados a 180 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento de cada tubo foi então ressuspensionado a partir do homogenato com TRIzol recuperado do respectivo poço. O homogenato final obtido foi transferido para tubo de microcentrífuga 1,5mL (Axygen Scientific) e então incubado por 5 minutos à temperatura ambiente.

Para as células RAW264.7 e BMDMs, que são aderentes à placa, o meio de cultura foi desprezado, e 500 μ L do reagente TRIzol (Invitrogen) foi imediatamente adicionado por poço. A placa de cultura células foi deixada por 15 minutos em shaker orbital para homogeneização do reagente e após este tempo o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de microcentrífuga identificados de 1,5mL (Axygen Scientific) e as amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente.

Após estes procedimentos, para a extração do RNA total nos dois tipos celulares foi seguido o protocolo do reagente TRIzol segundo recomendado pelo fabricante. Ao final, o RNA foi solubilizado em água DEPC (Invitrogen) com o auxílio de uma

micropipeta. Em seguida as amostras foram incubadas a 55°C durante 10 minutos e posteriormente estocadas a -20°C. Para a quantificação do RNA total, 1µL de cada amostra foi lida em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA), que determina a concentração de RNA total em ng/µL, assim como a razão RNA:proteína das absorbâncias 260nm e 280nm medidas.

4.5 Síntese da fita simples de cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi adicionado a uma solução contendo: 0,5µg de oligo-dT₁₈, uma mistura de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) (Invitrogen) a 10mM e água DEPC para completar um volume total de 13 µL. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos, e em seguida colocadas no gelo por 2 minutos. Foram então adicionados 7µL de uma mistura contendo 4µL de solução tampão MMLV first-strand buffer (Invitrogen), 2µL de DTT 0,1M (Invitrogen), e 1µL de enzima MMLV-RT (Invitrogen), obtendo-se o volume final de 20µL. Esta solução foi incubada a 37°C por 50 minutos. Para inativação da enzima transcriptase reversa MMLV, a mistura foi posteriormente incubada a 70°C durante 15 minutos. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C.

4.6 Oligonucleotídeos (Primers) e condições de PCR

Para a realização das PCRs foram utilizadas as condições descritas na tabela abaixo:

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, suas seqüências, condições termocíclicas e genes alvos.

Gene alvo/Tipo de PCR	Iniciadores	Seqüência 5' → 3'	Condições termocíclicas	
Rap2Aa Murino/RT-PCR	RT-mRap2a FWD	CGATGCGCGAGTACAAAGTG	94°C/5 min. 94°C/30 seg. } 62°C/30seg. } 25 ciclos 72°C/1m.45s. } 72°C/5 min.	
	RT-mRap2a REV	GCCTAGACGAATCCTGTCCG		
Gapdh Murino/RT-PCR	RT-mGapdh FWD	CCTCAACTACATGGTCTAC		94°C/5 min. 94°C/30 seg. } 52°C/30seg. } 25 ciclos 72°C/1m.45s. } 72°C/5 min
	RT- mGapdh REV	CCTCCACAATGCCAAAGT		
Rap2a Murino/RT-qPCR	QRT-mRap2a FWD	AATACGACCCCACCATCGAG		
	QRT-mRap2a REV	ACCTTCTCATACCGCTTCACG		
RAP2A Humano/RT-qPCR	QRT-HuRAP2A FWD	ATGCGCGAGTACAAAGTGGT		
	QRT-HuRAP2A REV	GCGACGAATCCACCTCGAT		
Gapdh Murino/RT-qPCR	QRT-mGapdh FWD1	TATGTCGTGGAGTCTACTGGT	95°C/10 min. 95°C/15 seg. } 60°C/30seg. } 40 ciclos 72°C/30seg. } 72°C/30seg.	
	QRT-mGapdh REV1	GAGTTGTCATATTTCTCGTGG		
GAPDH Humano/RT-qPCR	QRT-HuGAPDH FWD	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT		
	QRT-HuGAPDH REV	ACGACCAAATCCGTTGACTC		
Tnf Murino/ RT-qPCR	QRT-HuGAPDH FWD	ACAGAAAGCATGATCCGCG		
	QRT-HuGAPDH REV	GCCCCCATCTTTGGG		

4.7 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para realização de RT-PCR foram utilizados 2 μ L de cada amostra de reação da fita simples de cDNA obtida. A este volume foi adicionada uma mistura contendo 0,125 μ L da enzima Taq DNA polimerase (5U/ μ l, Phoneutria), 2,5 μ L de Tampão IO 10X (Phoneutria), 0,75 μ L de MgCl₂ 50mM (Phoneutria), 0,5 μ L de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 10mM, e 16,625 μ L de H₂O Milli-Q autoclavada. Foram colocados também 1,25 μ L de cada um dos iniciadores a 10 μ M relativos à amplificação do gene alvo (tabela 2), totalizando um volume de 25 μ L por reação. As misturas foram então submetidas aos ciclos programados de temperatura no termociclador MyCycler (BioRad) nas condições adequadas. Ao final, os amplicons eram fracionados em gel de agarose e submetidos à eletroforese para visualização dos resultados. Brevemente, após a adição de tampão Loading Buffer 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 50mM pH 8.0, glicerol 10%, Bromophenol blue 0,25% e Xylenecyanol 0,25%) a um volume da reação de PCR, os amplicons eram fracionados no gel 1% preparado em solução tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/mL). A eletroforese foi realizada a 100 V, e ao final da corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas através de câmera acoplada a sistema de fotodocumentação UV (MultiDoc-ItTM, UVP).

4.7.1 Análise densitométrica

As imagens capturadas como descrito acima eram salvas em formato JPEG e depois convertidas em TIFF Bitmap. As densitometrias eram realizadas no programa ImageQuant, as imagens de gel abertas eram salvas em formato .gel e o espaço das bandas a serem analisadas eram selecionados. Era realizada a correção de background (local average) e o volume de pixels era calculado pelo programa. Os valores obtidos para o gene a ser analisado eram divididos pelos valores obtidos para o gene normalizador, e os resultados eram plotados em gráficos no programa GraphPadPrism5.

4.8 PCR quantitativa a partir da reação de transcrição reversa (RT-qPCR)

Os critérios para os estudos de RT-qPCR se basearam em conformidade com as instruções de MIQE (Bustin et al, 2009). Para realização de RT-qPCR os cDNAs eram diluídos em água mili-Q na proporção de 1:10, então uma alíquota de 4,8µL de cada amostra diluída era adicionada a 10,2µL de uma mistura contendo 7,5µL de 2X SYBR Green Master Mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific), 1,2µL de água mili-Q e 0,75µL de cada iniciador (“forward” e “reverse”) a 10µM específico do gene alvo a ser amplificado de acordo com a tabela 2. Estes procedimentos eram realizados em placas de 96 poços (MicroAmp Fast Optical 96-well com código de barras, AppliedBiosystems), que eram seladas, vortexadas e centrifugadas a 400 x g por xx minutos antes de serem transferidas para termociclador de tempo real (Step One Plus, AppliedBiosystems) e então submetidas aos ciclos de temperatura conforme citado na tabela 2. Ao final de todas as programações de ciclos, era incluído um passo adicional para determinar as curvas de dissociação. Ao final das reações os dados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores obtidos eram transferidos para o programa GraphPadPrism5 para plotagem gráfica e análises estatísticas.

4.9 Plasmídeos

Para as transfecções foram utilizados os seguintes plasmídeos:

- **pcDNA3.1-RasGEF1B/V5**, contém sequência codificadora de RasGEF1B murino clonada no vetor pcDNA3.1/V5-HisA (Dall'orto, 2007)
- **pCIneo-Myc-RAP2A**, contém sequência codificadora de RAP2A humano clonado em pCI-Neo em fusão com o epítipo Myc, gentilmente cedido por Ken-ichi Kariya (Kawabe et al, 2010).
- **pFLAG-CMV4**, plasmídeo vetor de expressão eucariótica com epítipo FLAG (Sigma).
- **pGL3-E-Sel**, sequência codificadora da luciferase de vaga-lume sob controle transcricional do promotor do gene de E-Selectina regulado por NF-κB. (Schindler & Baichwal, 1994).

- **pRL-TK**, sequência codificadora da luciferase de *Renilla* (um celenterado) sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1 (neste promotor ligam-se fatores transcricionais eucarióticos) (Promega).
- **pFLAG-IKK α** , contém sequência codificadora de IKK α com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).
- **pHA-IKK β** , contém sequência codificadora IKK β com epítipo HA, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).
- **pFLAG-Mal/TIRAP**, contém sequência codificadora de Mal/TIRAP com epítipo FLAG (Fitzgerald et al, 2001).
- **pFLAG-p65**, contém sequência codificadora do monômero p65 de NF-kB com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).
- **pcDNA-TAB1**, contém sequência codificadora de TAB1 (Sakurai et al, 1999)
- **pFLAG-TAK1**, contém sequência codificadora de TAK1 com epítipo FLAG (Sakurai et al., 1999)
- **pFLAG-TLR2, -TLR3 e -TLR4**, contém a sequência codificadora de TLRs humanos com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic Foundation)
- **pFLAG-TRAF6**, contém sequência codificadora de TRAF6 com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).
- **pcDNA3-CD14**, contém sequência codificadora da molécula de CD14 humana, gentilmente cedido pelo Dr. Douglas Golenbock (University of Massachusetts Medical School, USA).
- **pFLAG-CMV1-hMD-2**, contém sequência codificadora da molécula de MD-2 humana com epítipo FLAG, gentilmente cedido pelo Dr. Douglas Golenbock (University of Massachusetts Medical School, USA).

4.10 Transformação bacteriana

As bactérias XL-1 Blue quimiocompetentes eram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e deixadas em gelo para descongelamento. Três microlitros de plasmídeo - com concentração entre 0,2 e 0,5 μ g/ μ l - eram adicionados a 100 μ L das bactérias competentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico em banho de água a 37°C por 45 segundos e incubação no gelo por 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1mL de meio Luria Bertani (LB) (Triptona 10g/L;

NaCl 5g/L; extrato de levedura 5g/L) sem antibiótico e a mistura foi colocada sob agitação a 220 r.p.m. em shaker (Incubadora de agitação orbital Marconi, Modelo MA410) por 1 hora a 37°C. Após este tempo, a amostra foi centrifugada a 200 x g por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em 100µL de meio LB sem antibiótico. O volume da ressuspensão foi plaqueado em placas de Petri contendo ágar a 1,5% preparado em meio LB com ampicilina (Sigma-Aldrich) a 100µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas.

4.11 Obtenção de DNA plasmidiano em média escala (Midiprep)

A partir de uma colônia coletada da placa da transformação (item 4.1), foi realizado um pré-inóculo em 4mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) que por sua vez foi cultivado por 8 horas a 37°C sob agitação a 200 r.p.m. (Incubadora de agitação orbital Marconi, Modelo MA410). Ao final deste tempo, cinquenta microlitros da suspensão bacteriana eram inoculados em 50mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e cultivados sob agitação a 200 r.p.m. em shaker por 16 horas a 37°C. O DNA plasmidiano foi obtido através do kit “GenElute™ HP Plasmid Midiprep” (Sigma), seguindo parcialmente o protocolo do fabricante, uma vez que algumas adaptações foram necessárias como, por exemplo, a extensão dos tempos de centrifugação de modo a se adequar ao limite de rotação do rotor BioLine da centrífuga (Heraeus Multifuge X3, Thermo Scientific) , porém sem prejuízos no rendimento de DNA plasmidiano obtido. Todas as soluções, colunas e materiais plásticos (colunas, seringas, tubos) utilizados durante o procedimento de obtenção do DNA plasmidiano foram fornecidas pelo kit. Brevemente, a suspensão bacteriana foi transferida para tubo cônico de 50mL e centrifugada a 2.739 x g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado ao final. Em seguida, o sedimento foi completamente solubilizado em 4mL da Solução de Ressuspensão Celular. Logo após, foram adicionados ao conteúdo 4mL de Solução de Lise e o mesmo foi invertido por 6 a 8 vezes e incubado à temperatura ambiente por 3 a 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4mL de Solução de Neutralização a 4°C e o conteúdo foi misturado gentilmente, invertendo o tubo de 4 a 6 vezes. Após formar um precipitado, foram adicionados 3mL da Solução de Ligação e o tubo foi invertido de 1 a 2 vezes. A solução foi transferida para uma seringa de 20mL e incubada por 5 minutos. Enquanto isso, a coluna de ligação foi equilibrada ao serem adicionados 4mL da solução de preparação da coluna, seguido de centrifugação a 2.739 x g por 3 minutos e descarte do eluato. Posteriormente, com o auxílio do êmbolo da

seringa, toda a mistura contida na seringa foi transferida para a coluna de ligação, seguido de centrifugação a 2.739 x g por 3 minutos e descarte do eluato. A coluna foi lavada pela adição de 4mL da solução de lavagem 1, seguida de centrifugação a 2.739 x g por 3 minutos, e depois com 4mL de solução de lavagem 2, e foi novamente centrifugada a 2739 x g por 7 minutos. Após esses procedimentos, a coluna de ligação foi transferida para um novo tubo e a ela foi adicionado 1mL da solução de eluição. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 2.739 x g durante 7 minutos, a coluna foi então descartada e o DNA plasmidiano recuperado da eluição foi estocado à -20°C.

4.12 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano livre de endotoxinas (Endo-free)

Plasmídeos livres de endotoxinas foram obtidos com o objetivo de serem utilizados nos experimentos de gene repórter onde eram conduzidos os estudos de transfecção com TLR4. A obtenção de plasmídeo em média escala livre de endotoxinas foi realizada com o kit “GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep” (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante, com as modificações nos passos de centrifugação como mencionado anteriormente. Quarenta microlitros da suspensão bacteriana foram inoculados em 40 mL de meio LB com ampicilina (50µg/mL) e mantidos sob agitação a 37°C, overnight. Após esse tempo a cultura foi transferida para tubos de 50 ml e centrifugada a 2.739 x g durante 15 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1,2 mL da solução de ressuspensão aos sedimentos. Logo após foram adicionados 1,2 mL da solução de lise, invertendo o tubo 6-8 vezes, até a solução ficar clara e viscosa. Em seguida os debris celulares foram precipitados adicionando 800 µL da solução de neutralização, invertendo o tubo 6-8 vezes e centrifugando o mesmo a 15.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 300 µL da solução de remoção de endotoxinas ao lisado, invertendo o tubo por 1 minuto. Após esse tempo o tubo foi resfriado no gelo por 5 minutos, aquecido a 37°C por mais 5 minutos e centrifugado a 2.739 x g por 7 minutos, então a fase clara, contendo o DNA plasmidial sem endotoxinas foi transferida para outro tubo, então a etapa anterior foi repetida. Novamente a fase clara foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 800 µL da solução de ligação ao DNA, invertendo o tubo por 6-8 vezes. Em um tubo de coleta foi colocada uma coluna e nela foram adicionados 3 mL da solução de preparação da coluna, a qual foi centrifugada a 2.739 x g por 3 minutos, descartando-se o eluato em

seguida. Após a centrifugação, a solução obtida na fase anterior foi transferida para a coluna, e repetia-se a centrifugação. Após adicionar 3 mL da solução de lavagem à coluna, a mesma foi novamente centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente. Depois da centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo, e nela foi adicionado 650 µL de água livre de endotoxinas para eluição do DNA plasmidial, seguida pela centrifugação a 2.739 x g por 7 minutos. Ao final dessa última centrifugação a coluna foi descartada e o DNA plasmidiano obtido foi armazenado à -20°C.

4.13 Transfecções

Para os estudos de transfecção foram utilizadas as células HEK293 empregando-se o método polímero catiônico por meio do uso do reagente PEI (Polietilenoimina, PolySciences, EUA). As células eram cultivadas conforme já descrito e ao atingirem de 80 a 90% de confluência eram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspendidas em meio DMEM suplementado fresco. Uma alíquota de 20 microlitros deste volume era obtida e colocada em uma mistura para a contagem de células como descrito a seguir: 20µL da suspensão celular, 30µL de meio DMEM e 50µL de azul de Trypan (Trypan Blue Solution 0,4%, Sigma). Cerca de 10µL dessa mistura eram transferidos para câmara de Neubauer para a contagem e após serem feitos os cálculos era realizado ajuste do volume de células de modo que fossem plaqueados $1,0 \times 10^5$ células por well em uma placa de 24 poços (JetBioFil) totalizando um volume de 500µL por well. Para a transfecção eram preparadas misturas com os plasmídeos da seguinte maneira: em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL uma quantidade determinada de DNA era adicionada a 100µL de meio DMEM livre de soro (SFM, do inglês *serum-free medium*). Em seguida, era adicionado à mistura o reagente de transfecção PEI numa proporção de 5:1 (5µL de PEI para cada 1µg de DNA plasmidiano). A mistura era submetida à agitação vigorosa em vórtex durante 10 segundos, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Ao término desses procedimentos, eram adicionados 200µL de meio completo (DMEM contendo 10% SFB e antibióticos) à mistura, a qual era homogeneizada por inversão e centrifugada brevemente. A mistura de transfecção (PEI + DNA) era então adicionada às células, gotejando-a por toda a extensão do poço de forma a distribuí-la uniformemente. A placa era submetida a movimentos circulares

algumas vezes para que se garantisse a distribuição uniforme da mistura de transfecção nos poços. Finalmente, a placa era incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Nos estudos realizados para examinar o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF-κB, as células HEK293 foram transfectadas com o gene repórter para o NF-kappaB (pGL3-E-Sel; 400ng por poço) e o plasmídeo para normalização das leituras (pRL-TK; 100ng por poço) em combinação com diferentes quantidades do plasmídeo para expressão de RAP2A (pCIneo-Myc-RAP2A; 500ng ou 1µg ou 2µg por poço, como indicado nos gráficos). A quantidade total de DNA transfectado por poço nos diferentes grupos experimentais foi mantida constante pela adição do vetor pFLAG-CMV4, em todos os experimentos.

Para indução da ativação de NF-κB por TNF, as células HEK293 eram transfectadas com pGL3-E-Sel e pRL-TK, além de RAP2A, e após 24h eram estimuladas com TNF murino recombinante (Sigma) 10ng/mL por 8 horas, sendo o extrato celular obtido como descrito adiante.

Para examinar o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida por agonistas TLRs ou por componentes da via de sinalização de TLRs, as células HEK293 eram co-transfectadas com plasmídeos de expressão contendo a sequência codificadora de receptores TLRs (TLR2, TLR3 ou TLR4), ou de moléculas da via de sinalização de TLRs que culmina na ativação de NF-κB tais como Mal/TIRAP, TRAF-6 e TAK-1, ou de componentes do complexo IKK tais como IKK-α e IKK-β, ou ainda do monômero p65(RelA) da via clássica de NF-κB, em diferentes experimentos. Nos experimentos em que TLR2, TLR3 e TLR4 eram transfectados, as células foram estimuladas por um período de 18 horas com Pam3CSK4 (100 ng/mL), ácido poliriboinosínico policitidílico (poly-rI:rC) (100 µg/mL) ou LPS O55:B5 (1µg/mL), respectivamente. Ainda, nos experimentos de transfecção com TLR4, foram co-transfectados CD14 e MD-2, uma vez que o reconhecimento e ativação por LPS dependem desses componentes. Para a obtenção dos extratos celulares, o meio das culturas de células era aspirado por sucção a vácuo e à monocamada em cada poço eram adicionados 200µL de tampão de lise passiva (PLB 1X, do inglês *Passive Lysis Buffer*) fornecido pelo kit “Dual-Luciferase Reporter System” (Promega). A placa era então colocada em agitação em shaker orbital por 15 minutos e depois guardada em freezer a -20°C até que fossem realizados os

procedimentos para a leitura da atividade luciferase das amostras como descrito a seguir.

4.14 Análise da atividade luciferase

Os ensaios eram realizados utilizando-se o Kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) a partir dos extratos celulares totais obtidos dos experimentos de transfecção. Após descongelamento, as amostras eram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL (Axygen Scientific). Após centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos, 5µL do extrato celular de cada amostra era transferido por poço de uma placa de 96 wells opaca, de cor branca (FluoroNunc, Nunc, EUA). Em cada poço eram adicionados 40µL do reagente LARII (Promega), seguido da leitura das amostras em luminômetro (LumiCount™, Packard Instruments). Logo após a leitura da luciferase de vagalume a placa era retirada do aparelho e então eram adicionados 40µL do reagente Stop & Glo (Promega) a cada poço para a leitura da luciferase de Renilla. Os valores obtidos das leituras são registrados e salvos automaticamente pelo programa Reader (Packard Instruments, USA). A atividade relativa da luciferase era determinada pela razão do valor da leitura da luciferase de vagalume (pGL3-E-Sel) sobre o valor da leitura da luciferase da Renila (pRL-TK).

4.15 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Foi utilizada análise de variância Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni nas análises agrupadas com mais de dois grupos. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos. A plotagem dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPrism5.0*.

5. Resultados

5.1 Expressão reduzida de *Rap2A* em macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll

O principal objetivo do presente trabalho foi de avaliar o efeito de RAP2A sobre NF-kappaB, um fator de transcrição crítico na resposta inflamatória. Contudo, uma vez que não há dados na literatura que relatem sobre a expressão de RAP2A após estímulos inflamatórios, nós decidimos analisar a expressão do gene murino e humano em resposta à estimulação com agonistas TLRs. Inicialmente, a partir de macrófagos murinos RAW264.7 não tratados ou estimulados com LPS ou poly-IC, analisamos a expressão de *Rap2a* por RT-PCR. Observamos que a expressão de *Rap2a* já se encontra em níveis elevados nas células não-estimuladas, notando-se um decréscimo em sua expressão logo após o tratamento com LPS ou poly-IC (Figura 5). De modo a corroborar essa observação, decidimos analisar a expressão de *Rap2a* por PCR quantitativa da transcrição reversa (RT-qPCR), por ser uma técnica bastante sensível e precisa.

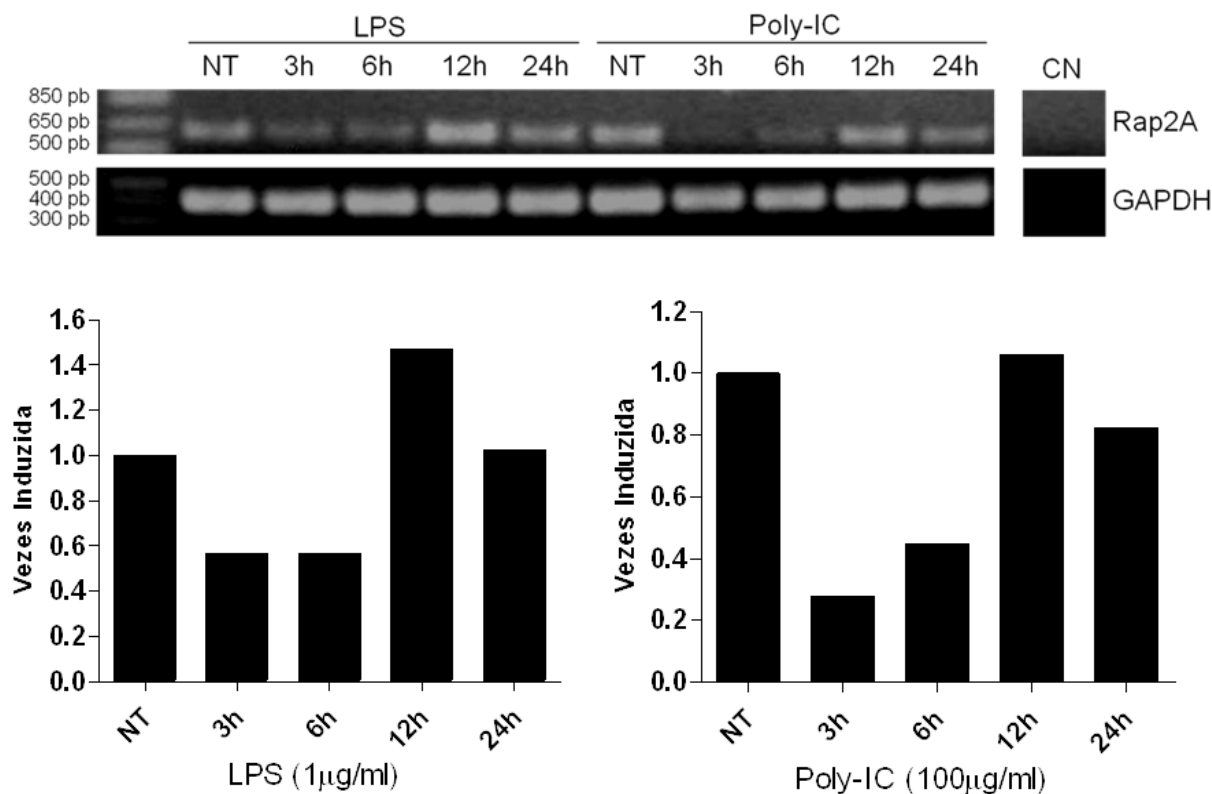
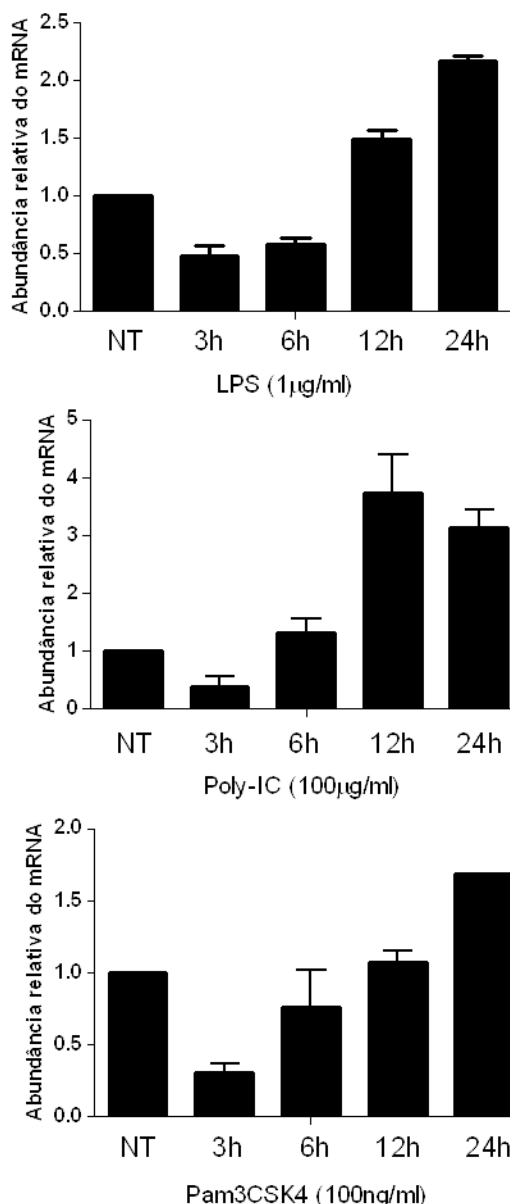


Figura 5: Análise por RT-PCR da expressão de Rap2A em linhagem de macrófagos murinos estimulados com LPS (1 μ g/ml) ou Poly-IC (100 μ g/ml). Células RAW264.7 foram deixadas sem estimulação (NT) ou estimuladas com os agonistas TLRs em diferentes intervalos de tempo nas concentrações indicadas. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito à primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-PCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de Rap2A (593pb) e GAPDH (401pb). Após o fracionamento dos produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, as bandas foram visualizadas através de luz ultravioleta e a imagem capturada em câmera CCD. Análises densitométricas a partir do resultado do gel de agarose são representadas nos gráficos no painel inferior.

Ao analisarmos os resultados gerados a partir de RT-qPCR utilizando-se os cDNAs obtidos de outro experimento com macrófagos RAW264.7 estimulados ou não com agonistas de TLR 2, 3 e 4, podemos observar que a expressão de *Rap2a* sofre uma significativa redução nos intervalos de tempo em 3h e 6h para todos os estímulos testados (Figura 6-A). Importante observar que no tempo de 3h fica evidente uma redução da expressão de *Rap2a* em mais de 50% para os estímulos com LPS e poly-IC, e uma redução de aproximadamente 70% para o estímulo com Pam3CSK4. Quando a expressão de *Rap2a* foi avaliada em tempos mais tardios, i.e., 12 e 24 horas, observamos a natureza transiente de sua regulação uma vez que seus níveis são retomados aos níveis basais de expressão, ou até mesmo mais elevados. Esses resultados sugerem que *Rap2a* é um gene cuja expressão em macrófagos é reprimida logo após o estímulo de vias inflamatórias disparadas através dos TLRs. Ainda, análises realizadas para outro gene alvo a partir dos mesmos cDNAs, mostram o conhecido perfil de expressão de *Tnfa*, que codifica a citocina pró-inflamatória TNF, que é fortemente induzido após estímulos inflamatórios (figura 6-B). Como pode ser observado, há uma correlação inversa na expressão de *Rap2a* e *Tnfa* em resposta ao tratamento com agonistas TLRs tanto nas primeiras horas (3h) quanto em tempos tardios (12h e 24h) após o estímulo.

Uma vez que a maior redução na expressão de *Rap2a* ocorreu logo após 3 horas de estimulação com os agonistas TLRs, nos perguntamos o quão precoce ocorreria a queda na expressão de *Rap2a*. Para isso, macrófagos RAW264.7 foram tratados por 30 minutos, 1h, 2h, 4h e 6h com LPS, e os RNAs totais obtidos para análise da expressão de *Rap2a* por RT-qPCR.. Como pode ser observado nos resultados da Figura 7, até 1h após o tratamento com LPS não existem diferenças significativas em relação ao controle (células não estimuladas). No entanto, o início da queda na expressão de *Rap2a* parece ocorrer entre 1h e 2h após o tratamento com LPS. Além disso, observamos que a repressão máxima da expressão de *Rap2a* parece ocorrer entre 2h e 4h após o tratamento.

A) Expressão de Rap2A



B) Expressão de TNF

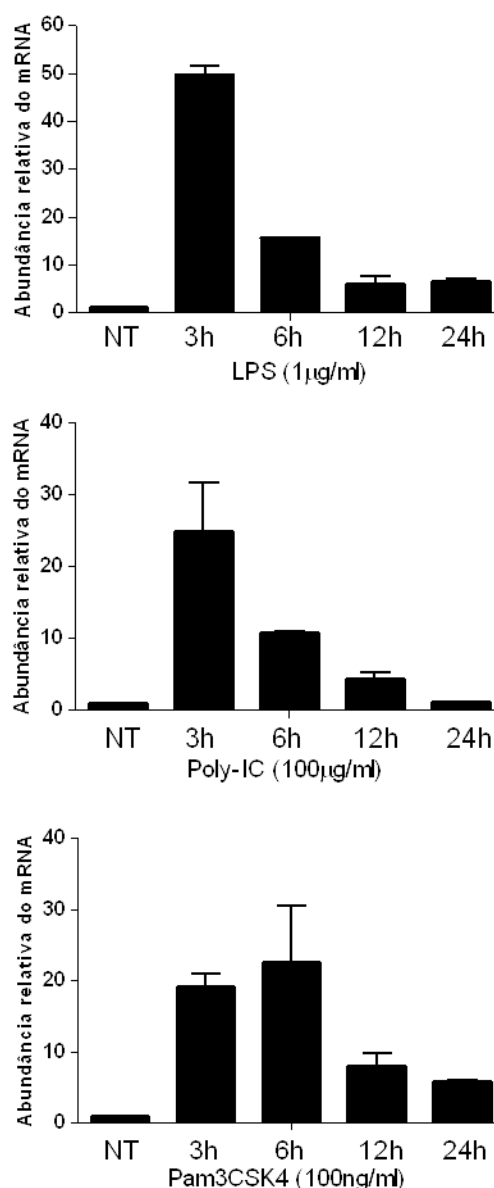


Figura 6: Análise por RT-qPCR da expressão de *Rap2A* em linhagem de macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo *Toll* (TLRs). Células RAW264.7 foram deixadas sem tratamento (NT) ou foram estimuladas conforme indicado na figura. Ao final da estimulação, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de *Rap2A* e *GAPDH* (normalizador). Ao final das reações os dados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão calculados a partir de duplicata técnica da qPCR.

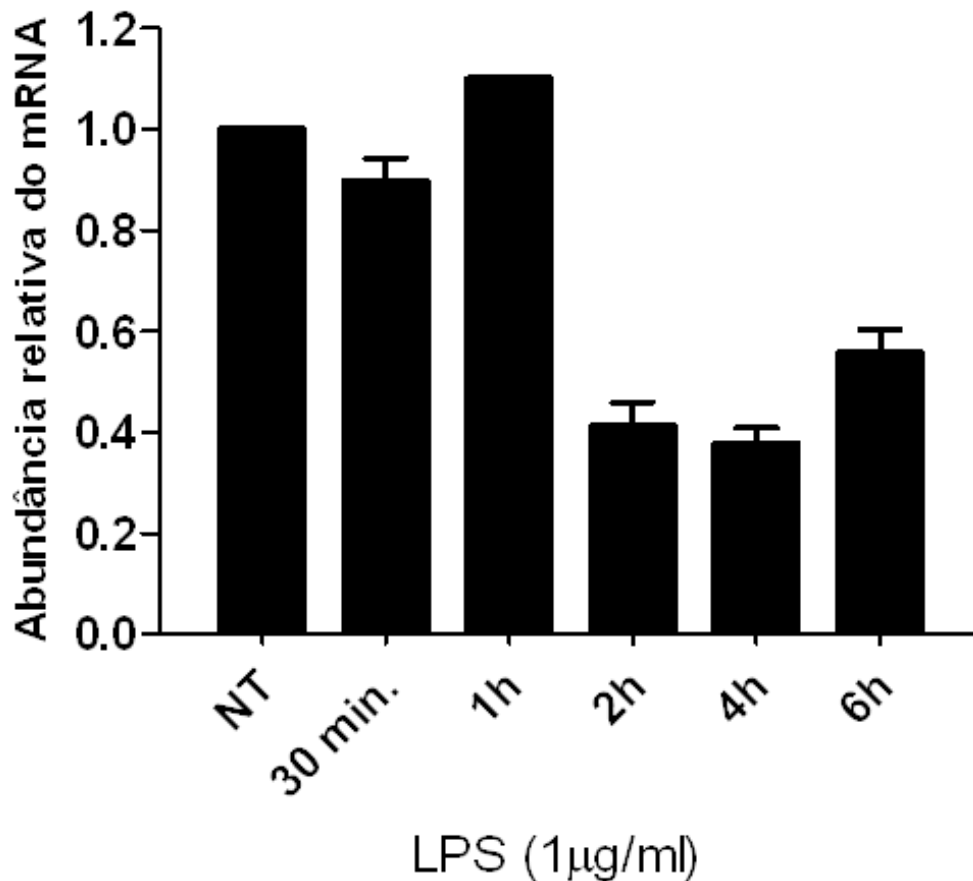


Figura 7: Análise por RT-qPCR da expressão de *Rap2A* em linhagem de macrófagos murinos estimulada com LPS (1µg/ml). Células RAW264.7 foram deixadas sem tratamento (NT) ou foram estimuladas com LPS (1µg/ml) conforme indicado na figura. Ao final da estimulação, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de *Rap2A* e *GAPDH* (normalizador). Ao final das reações os dados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão calculados a partir de duplicata técnica da qPCR.

Realizamos também um estudo em culturas primárias de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDMs), e observamos que a expressão de *Rap2a* é reprimida drasticamente em resposta ao LPS, ao passo que em resposta ao poly-IC, essa repressão ocorre de modo menos intenso (Figura 8-cedida por Aristóboło Mendes da Silva). Esses resultados suportam a idéia que, de fato, a expressão de *Rap2a* é reduzida em macrófagos logo após a estimulação com agonistas TLRs.

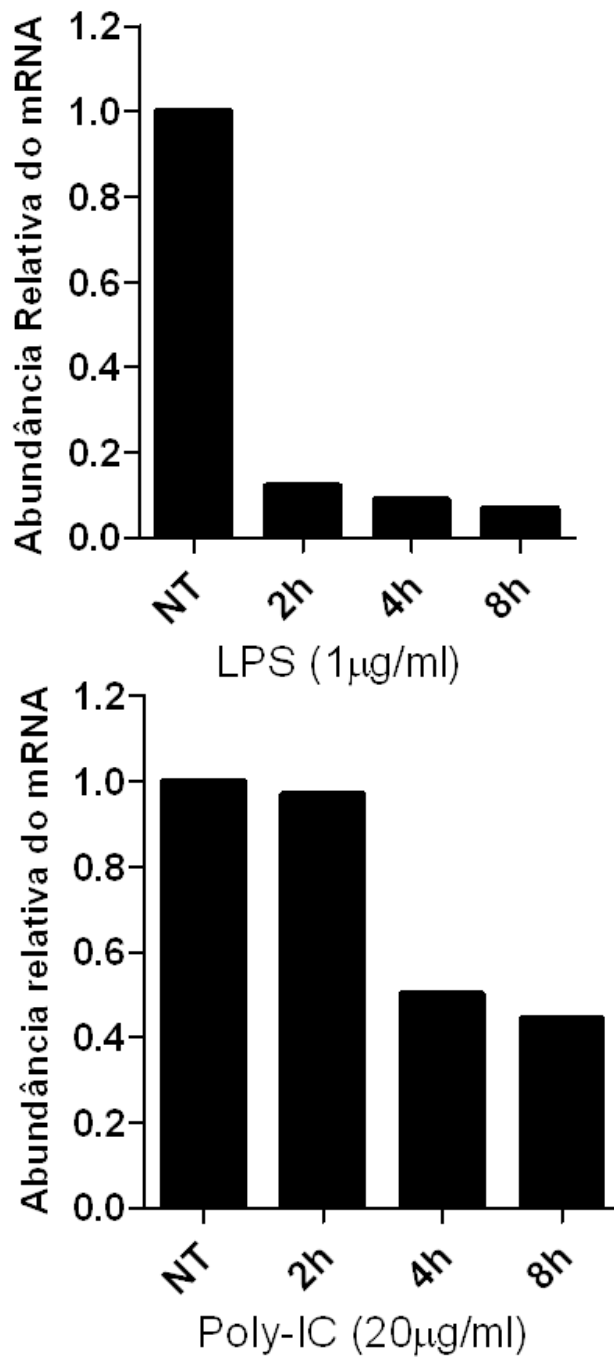


Figura 8: Análise por RT-qPCR da expressão de *Rap2A* em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) estimulados com agonistas de receptores do tipo *Toll* (TLRs). BMDMs foram deixadas sem tratamento (NT) ou foram estimuladas conforme indicado na figura. Ao final da estimulação, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de *Rap2A* e *GAPDH* (normalizador). Ao final das reações os dados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Resultado cedido por Aristóbolo Mendes da Silva)

5.2 A expressão de *RAP2A* é reduzida também em monócitos humanos estimulados com LPS

Decidimos averiguar também a expressão de *RAP2A* em uma linhagem celular de monócitos humanos. Para tanto, células THP-1 foram estimuladas com LPS por diferentes intervalos de tempo. Logo após a estimulação em intervalos de tempo de 3h e 6h, observa-se que há forte queda na expressão de *RAP2A*, com uma rápida diminuição de aproximadamente 75% após 3h de tratamento (Figura 9). Após 9h de estímulo com LPS, a expressão de *RAP2A* continua em um nível mais baixo quando comparada às células não tratadas, embora pareça haver uma tendência de seus níveis retornarem aos basais de células não estimuladas. Porém, nos tempos de 12h e 24h, a expressão de *RAP2A* volta a sofrer redução.

Estes resultados sugerem que, em monócitos humanos THP-1, *RAP2A* também tem sua expressão reduzida logo após o estímulo com LPS de forma semelhante ao perfil observado para os macrófagos murinos. Entretanto, a redução na expressão de *RAP2A* em monócitos humanos parece ser mais duradoura que em macrófagos murinos.

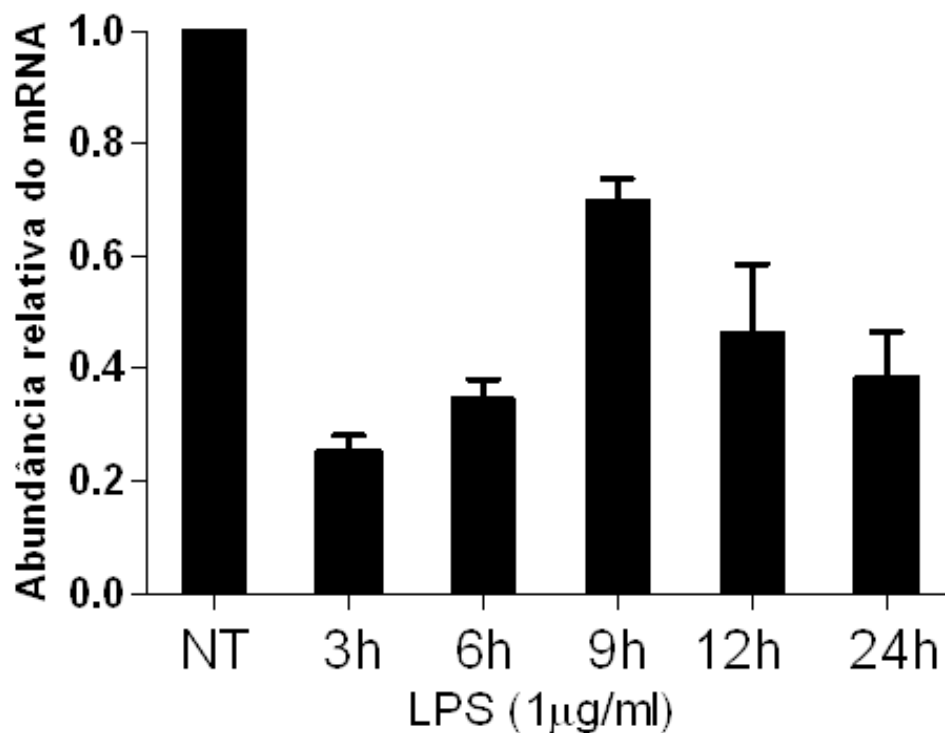


Figura 9: Análise por RT-qPCR da expressão de *RAP2A* em linhagem de promonócitos humanos estimulada com LPS (1 µg/ml). Células THP-1 foram deixadas sem estimulação (NT) ou estimuladas com LPS (1 µg/ml) conforme indicado na figura. Ao final da estimulação, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de *RAP2A* e *GAPDH*. Ao final das reações os dados eram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores são expressos como média ± desvio padrão calculados a partir de duplicata técnica da qPCR.

5.3 Efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por TNF

A ligação de TNF ao seu receptor em uma célula é capaz de ativar diferentes vias de sinalização, incluindo vias que levam à ativação de NF- κ B. Logo, para verificar a influência de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B, células HEK293 foram transfectadas com pGL3-E-Sel e pRL-TK e com diferentes combinações dos plasmídeos pCI-neo-RAP2A e pcDNA3.1-RasGEF1B-V5, e posteriormente estimuladas com TNF. Como é observado na Figura 10, o tratamento com TNF das células transfectadas com os genes repórteres e que foram co-transfectadas com o vetor pFLAG-CMV4 apenas, resultou em ativação significativa de NF-kappaB. Nas células em que RAP2A é superexpresso e que posteriormente foram tratadas com TNF, observamos que a ativação de NF-kappaB também ocorreu, no entanto, de maneira atenuada – uma diferença de 36% menor – se comparada à de células transfectadas com o vetor pFLAG-CMV4.

Rocha et al. (2014) mostram que RasGEF1B, uma outra proteína regulatória em estudo em nosso laboratório, participa na regulação negativa da ativação de NF- κ B não apenas quando é induzido por agonistas de TLRs, mas também na ativação de NF- κ B induzida por TNF (Valverde, 2011; Rocha et al., 2014) No gráfico da figura 10, esses dados são corroborados ao analisarmos as células estimuladas com TNF e transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-RasGEF1B/V5, pois similarmente ao observado para RAP2A, a ativação de NF-kappaB ainda ocorre, porém de maneira atenuada quando comparada ao grupo de células controle transfectadas com o vetor. Como um dos princípios norteadores desse estudo baseou-se na hipótese que RAP2A é um efetor de RasGEF1B na regulação da ativação de NF-kappaB, nós analisamos o efeito combinado de RasGEF1B e RAP2A nas células tratadas com TNF. Como pode ser observado na figura 10, não há um efeito atenuante significativo na ativação de NF- κ B induzida por TNF quando essas duas proteínas são co-expressas.

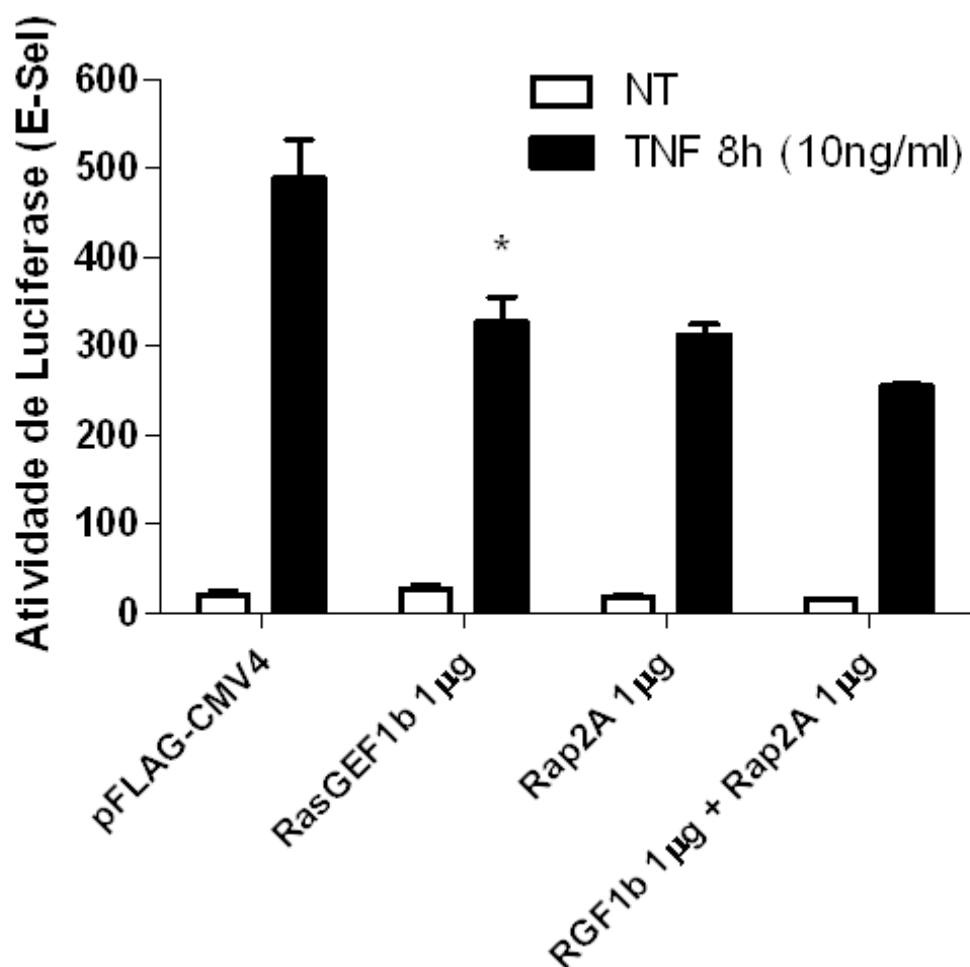


Figura 10: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da expressão forçada de RAP2A e RasGEF1B sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com TNF. As células foram co-transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A e/ou pcDNA3.1-RasGEF1B/V5, como indicado na figura. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem estimulação ou então estimuladas com TNF (10ng/ml) por 8 horas. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade de luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. As transfecções foram realizadas em triplicata. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. *P < 0.05, em relação à pFLAG-CMV4, tratado.

Nosso próximo passo foi determinar se uma maior expressão de RAP2A poderia resultar em menor ativação de NF-kappaB após o tratamento das células com TNF. Para isso, células HEK293 foram transfectadas com os genes repórteres e quantidades crescentes de RAP2A e posteriormente tratadas com TNF. Como pode ser observado no resultado apresentado na Figura 11, ocorreu ativação significativa de NF-κB após o tratamento com TNF. No entanto, à medida em que quantidades crescentes de RAP2A foram transfectadas, tal ativação foi reduzida significativamente. Ainda, pode ser observado que a redução máxima da atividade de NF-κB ocorreu nas células transfectadas com 1μg de RAP2A, onde há uma redução de aproximadamente 41% em relação as células onde não há superexpressão de RAP2A. Não foi observado um efeito mais potente quando a quantidade transfectada de RAP2A foi de 2 microgramas.

Baseando-se nos resultados mostrados nas figuras 10 e 11, pode-se afirmar que RAP2A exerce efeito regulador negativo sobre a ativação de NF-κB em resposta ao TNF.

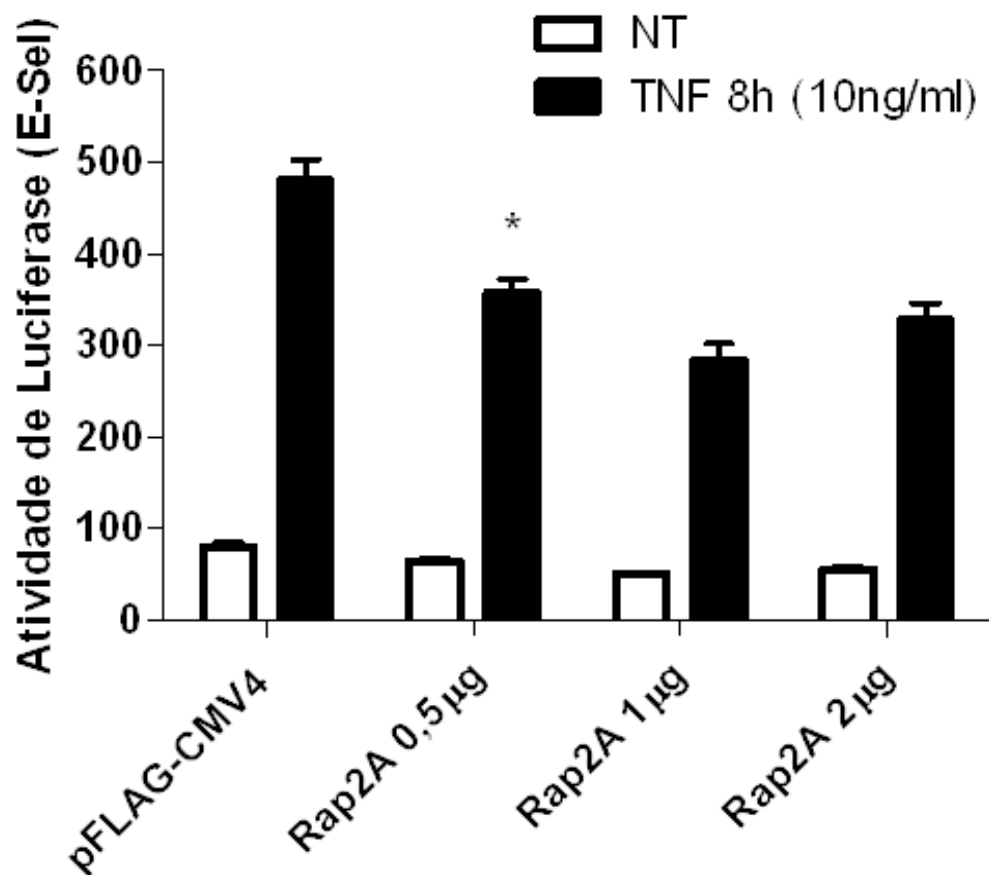


Figura 11: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de Rap2A sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com TNF. As células foram co-transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição, ou não, do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem tratamento ou foram estimuladas com TNF (10ng/ml) por 8 horas. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade de luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. As transfecções foram realizadas em triplicata. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. *P < 0.05, em relação à pFLAG-CMV4, tratado.

5.4 Efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonistas de TLRs

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por PAMPs agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs). Para isso, células HEK293 foram transfectadas com os genes repórteres e com diferentes TLRs, a saber: o TLR2, TLR3 ou TLR4/MD2/CD14, e posteriormente estimuladas com seus respectivos agonistas. Num primeiro experimento, avaliamos o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por LPS. Pode ser observado que nas células que foram transfectadas com TLR4/MD2/CD14 e com o plasmídeo pFLAG-CMV4, e posteriormente tratadas com LPS, houve uma ativação significativa de NF- κ B. No entanto, quando RAP2A foi co-transfectado com TLR4/MD2/CD14 nas células HEK293, e posteriormente tratadas com LPS, essa ativação não foi tão forte, sendo observada uma redução de aproximadamente 70% na ativação de NF- κ B quando comparamos ao grupo tratado onde não há superexpressão de RAP2A (Figura 12). Esses resultados indicam que RAP2A, quando superexpresso, exerce um efeito regulador negativo sobre a ativação de NF- κ B disparada por LPS/TLR4/MD2/CD14.

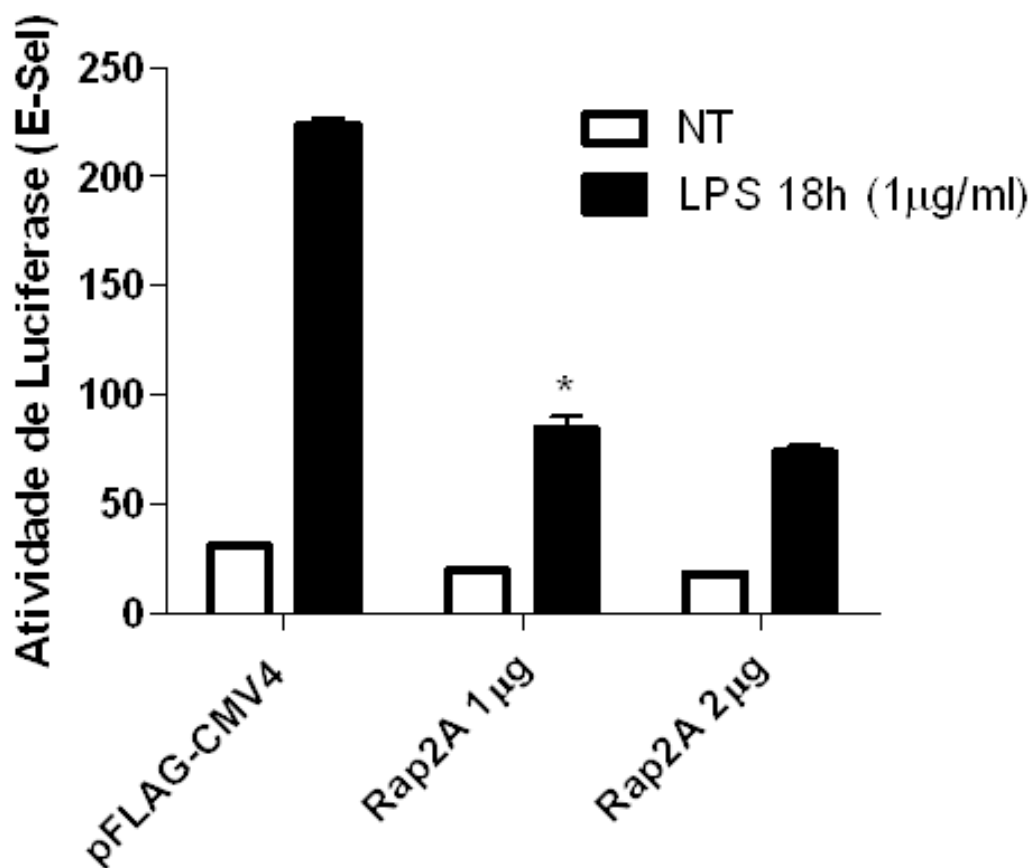


Figura 12: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo tratamento com agonista de TLR4. As células foram cotransfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng), pCMV-FLAG-TLR4, CD14 e MD2 em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição, ou não, do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem estimulação ou foram estimuladas com LPS (1 µg/ml) por 18 horas. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade de luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. O gráfico apresentado é representativo de dois experimentos independentes e as transfecções foram realizadas em triplicata para cada experimento. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. $P < 0.05$, em relação à pFLAG-CMV4, tratado.

Num segundo experimento, avaliamos o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por poly-IC. Para isso, células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos repórteres, TLR3 e duas quantidades de RAP2A. A figura 13 apresenta o resultado representativo de dois experimentos realizados independentemente, porém em condições similares já descritas anteriormente. Como pode ser observado, ocorreu uma ativação significativa de NF- κ B quando as células transfectadas com pFLAG-CMV4 foram tratadas com poly-IC, sendo que o aumento de atividade de luciferase é cerca de 6 vezes. No entanto, não houve diminuição da ativação de NF- κ B nas células que foram transfectadas com RAP2A e tratadas com poly-IC, diferentemente do que foi observado nos experimentos realizados com LPS. De fato, ao compararmos as células que foram transfectadas com pCIneo-Myc-RAP2A e aquelas transfectadas com pFLAG-CMV4 e posteriormente tratadas com o agonista de TLR3, concluímos que não há diferenças significativas da atividade de luciferase.

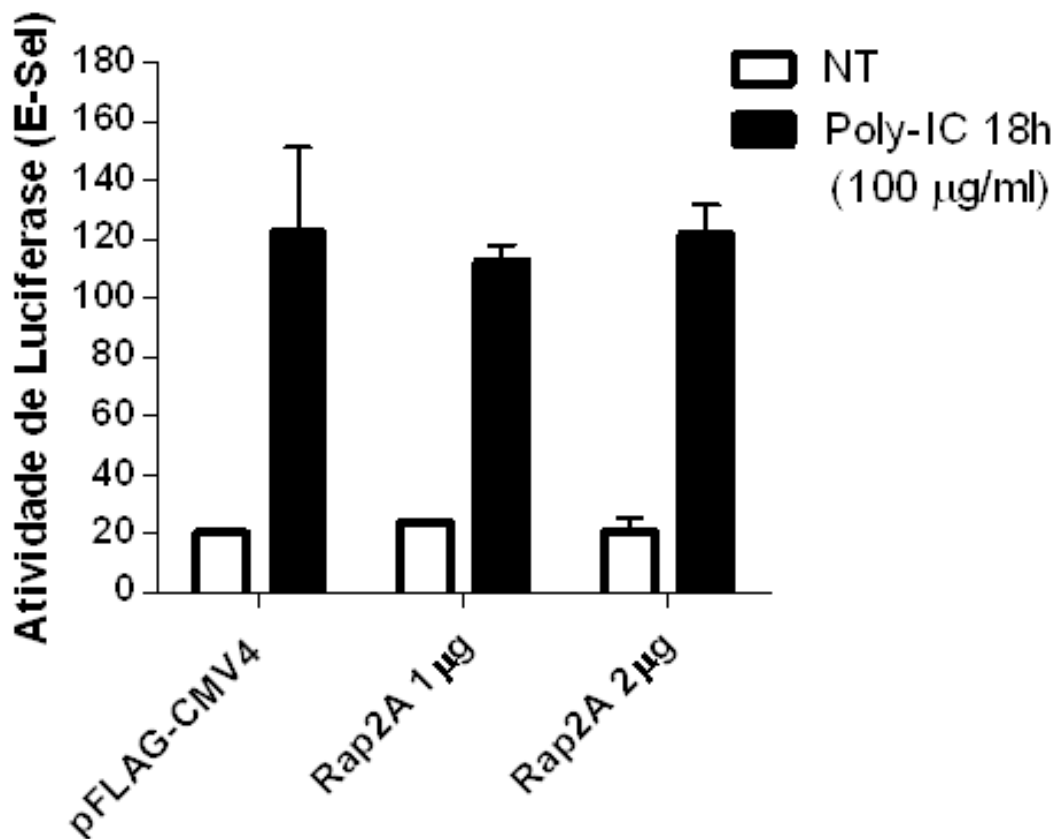


Figura 13: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida pelo tratamento com agonista de TLR3. As células foram transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) e pCMV-FLAG-TLR3 em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-Rap2A. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição, ou não, do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem estimulação ou foram estimuladas com poly-IC (100µg/ml) por 18h. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade de luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. O gráfico apresentado é representativo de dois experimentos independentes e as transfecções foram realizadas em triplicata para cada experimento. Os valores são expressos como média ± desvio padrão.

Por fim, analisamos o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida por Pam3CSK4. Para isso, células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos repórteres, TLR2 e duas quantidades de RAP2A. Como pode ser observado no ensaio de gene repórter mostrado na figura 14, as células HEK293 foram tratadas com Pam3CSK4, e, como esperado, ocorre uma ativação significativa de NF-κB. A exemplo do que foi observado anteriormente para os experimentos onde as células foram estimuladas com LPS, podemos observar que há uma queda de cerca de 70% na ativação de NF-κB ao compararmos o grupo de células transfectadas com vetor pFLAG-CMV4 àquele transfectado com 2μg de pCIneo-Myc-RAP2A.

Portanto, esses resultados sugerem que RAP2A exerce um efeito de regulação negativa sobre a ativação de NF-κB induzida por Pam3CSK4 via TLR2.

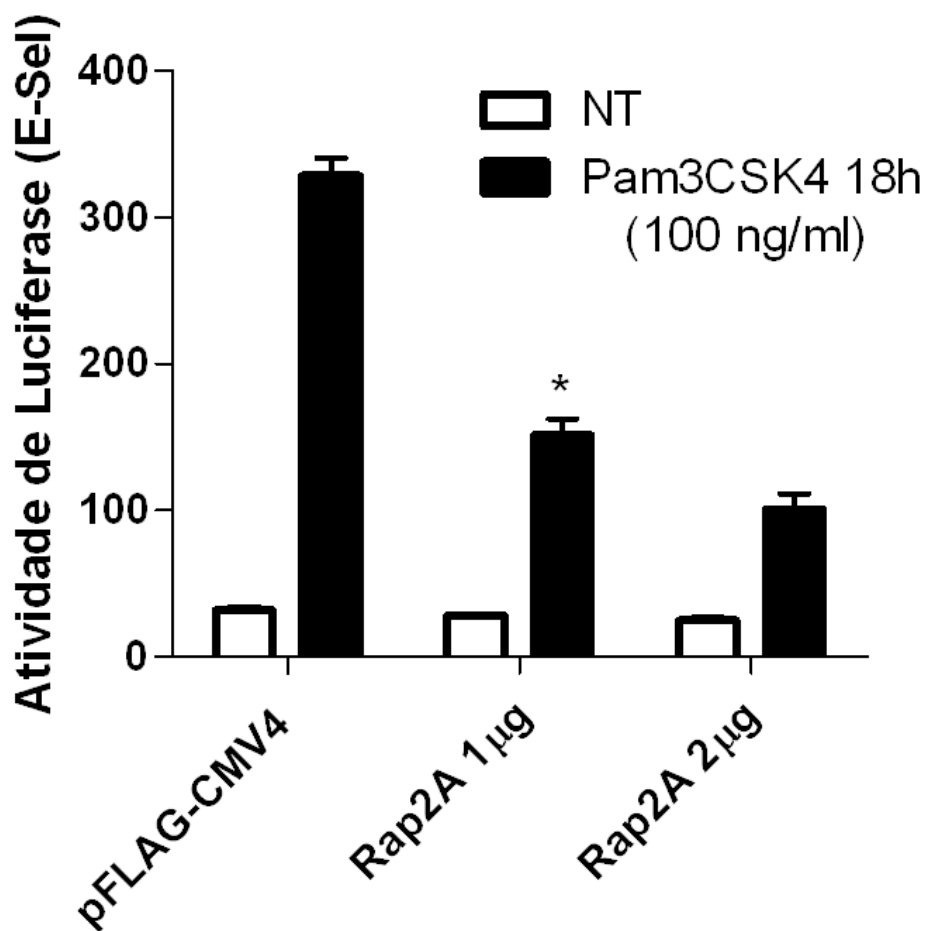


Figura 14: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida pelo tratamento com agonista de TLR2. As células foram transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) e pCMV-FLAG-TLR2 em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição, ou não, do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem estimulação ou foram estimuladas com Pam3CSK4 (100ng/ml) por 18 horas. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade de luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. O gráfico apresentado é representativo de dois experimentos independentes e as transfecções foram realizadas em triplicata para cada experimento. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. *P < 0.05, em relação à pFLAG-CMV4, tratado.

5.5 Efeito de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida por componentes à jusante da via de sinalização dos TLRs

No presente trabalho, induzimos em células HEK293 cascatas de sinalização que levam a ativação de NF-κB pelo estímulo de importantes receptores no reconhecimento de PAMPs e, interessantemente, verificamos um efeito regulatório negativo de RAP2A sobre essa ativação, iniciada pelos receptores TLRs 2 e 4. De modo a definir potenciais moléculas alvo sobre a(s) qual(is) RAP2A exerce tal efeito na ativação de NF-κB na via de sinalização dos TLRs, conduzimos estudos de ganho de função de várias moléculas em células HEK293.

Iniciamos nossa investigação a partir de uma importante molécula adaptadora (Mal/TIRAP) comum às vias de TLR2 e TLR4. As proteínas Mal/TIRAP e MyD88 são recrutadas para o domínio TIR dos TLRs logo após o reconhecimento de moléculas associadas a patógenos por estes receptores, iniciando assim a cascata de sinalização. Portanto, para investigar o efeito de RAP2A sobre a ativação de NF-κB induzida a partir dessas moléculas adaptadoras, células HEK293 foram transfectadas com os genes repórteres e com o plasmídeo pFLAG-Mal/TIRAP na presença de quantidades crescentes de RAP2A. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição do plasmídeo pFLAG-CMV4.

Os resultados desse experimento estão representados pelo gráfico da figura 15 e, como esperado, mostra que em todos os grupos de células que foram transfectadas com Mal/TIRAP a ativação de NF-κB ocorre de maneira significativa. No entanto, é possível constatar que nos grupos de células transfectadas com RAP2A, essa ativação também ocorre, porém de modo atenuado, sendo observada uma redução da ativação de NF-κB. A maior diferença pode ser visualizada no grupo de células transfectadas com Mal/TIRAP e com 2μg de RAP2A, onde se observa uma redução em mais de 70% na atividade de luciferase em relação ao grupo de células controle que foram transfectadas com a molécula adaptadora apenas. Ainda, a diminuição da atividade de NF-κB causada pela superexpressão de RAP2A parece ser dose-dependente, pelo que se observa no perfil apresentado no mesmo gráfico (figura 15).

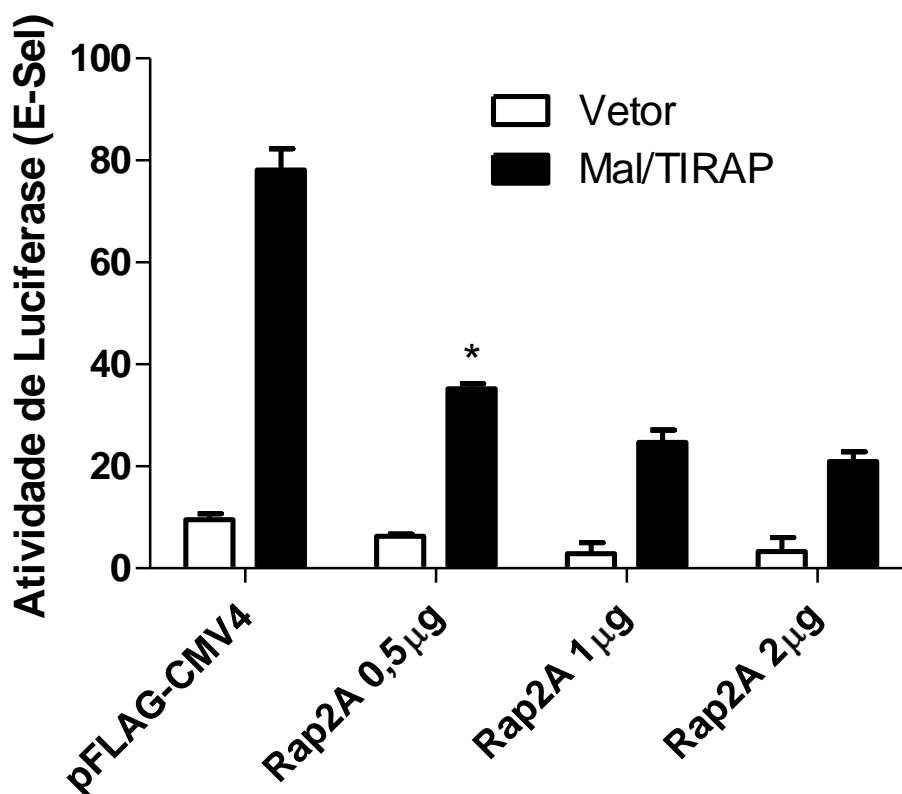


Figura 15: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por Mal/TIRAP. As células foram transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. À exceção das células transfectadas com o vetor (NT) foi co-transfectado também o plasmídeo pFLAG-Mal/TIRAP. A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. O gráfico apresentado é representativo de dois experimentos independentes e as transfecções foram realizadas em triplicata para cada experimento. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. *P < 0.05, em relação à pFLAG-CMV4/Mal/TIRAP.

Após o início da cascata de sinalização, MyD88 é responsável pelo recrutamento de proteínas que levarão à fosforilação do complexo IKK. Duas importantes moléculas para esse evento são a proteína TRAF6 e o complexo TAK1/TAB1. Assim, foram realizados dois ensaios de luciferase independentes com a superexpressão de TRAF6 ou TAK1:TAB1 em células HEK293 (figura 16). De forma bastante semelhante ao que foi visto no experimento com tratamento de Mal/TIRAP (figura 15), ao superexpressarmos proteínas intermediárias na via de sinalização dos TLRs, observamos clara ativação de NF- κ B em todos os grupos, mas com uma diminuição dose-dependente na ativação de NF- κ B nos grupos transfectados com quantidades crescentes de RAP2A. Para o experimento em que TRAF6 é superexpresso (figura 16-A), a diferença entre as células transfectadas com o vetor e aquelas com menor quantidade de RAP2A transfectada, é de aproximadamente 55%, e chega a cerca de 80% quando comparamos com as células transfectadas com 2 μ g de RAP2A.

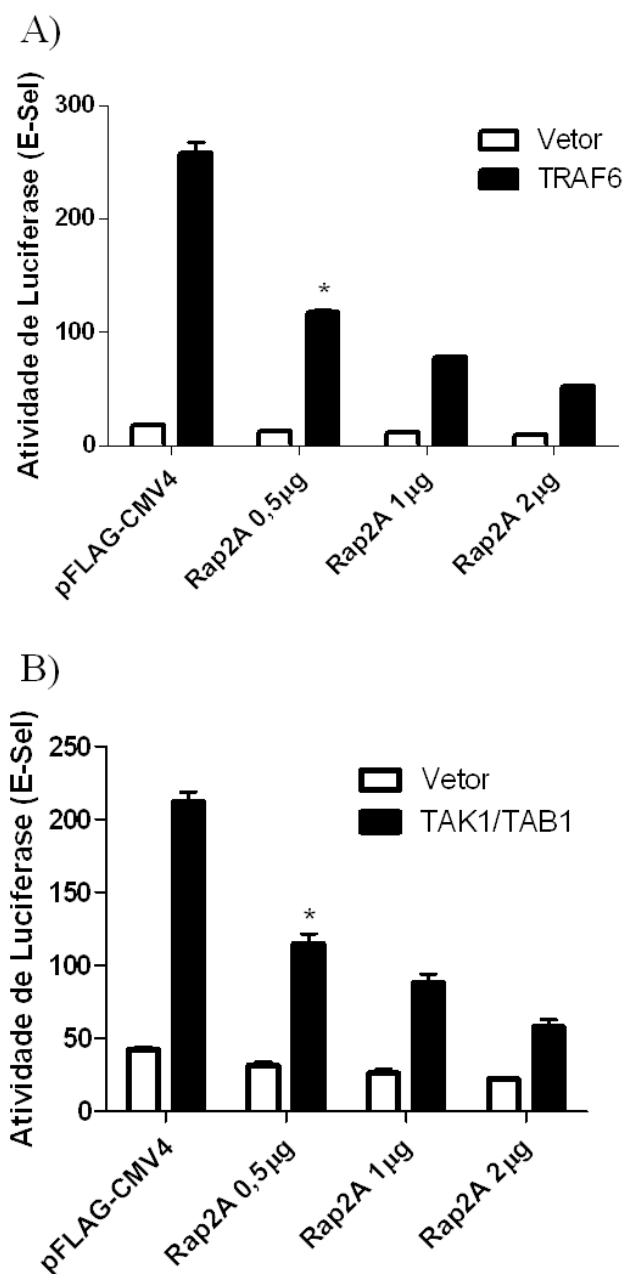


Figura 16: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por TRAF6 (A) ou TAK1/TAB1 (B). As células foram transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng), pcDNA3.1-TRAF6 (painel A) ou pcDNA3.1-TAB1 e pCMV-FLAG-TAK1 (painel B) em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. À exceção das células transfectadas com o vetor foi co-transfectado também o plasmídeo pFLAG-TRAF6 (A) ou os plasmídeos pFLAG-TAK1 e pcDNA-TAB1 (B). A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. As transfecções foram realizadas em triplicata. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. * $P < 0.05$, em relação à pFLAG-CMV4/TRAF6 (A) ou pFLAG-CMV4/TAK1:TAB1 (B).

O mesmo perfil é observado quando induzimos a superexpressão de proteínas do complexo IKK (IKK- α ou IKK- β , figura 17-A e figura 17-B, respectivamente), com uma redução de aproximadamente 70% em relação às células transfectadas com o vetor para aquelas com maior quantidade de proteína RAP2A.

Ao final da cascata de sinalização, o complexo IKK fosforila I κ B para que NF- κ B seja ativado. O dímero de NF- κ B mais abundante nas células é p50/p65 (Chen et al, 1998). Por isso, realizamos um experimento de gene repórter onde superexpressamos a proteína p65(RelA). O perfil mostrado no resultado desse ensaio (Figura 17-C) não é diferente do que foi observado para os demais experimentos onde superexpressamos componentes das vias de TLRs, mas, a atenuação na atividade de NF- κ B por efeito de RAP2A é mais discreta nesse caso.

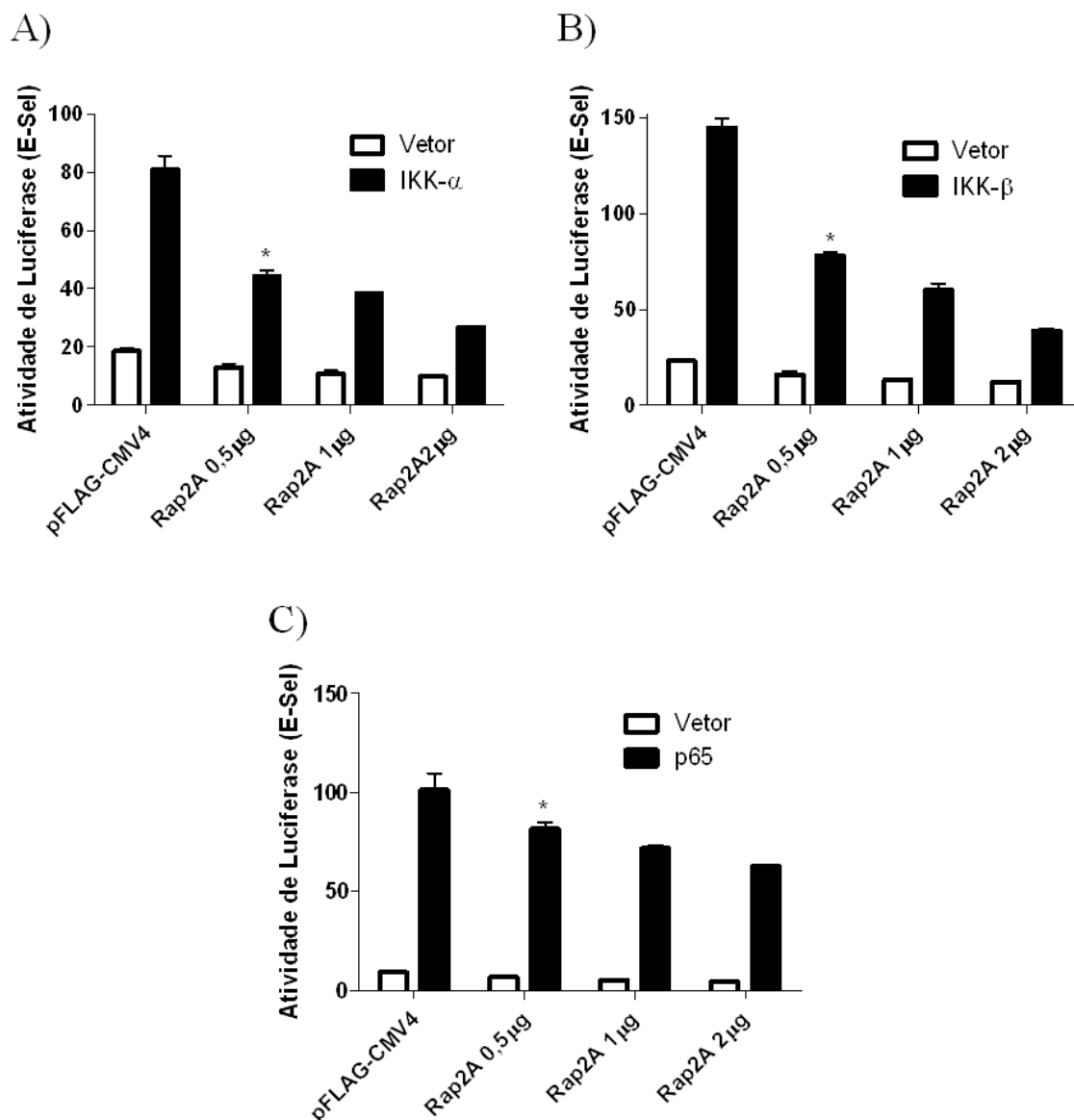


Figura 17: Análise por ensaio de gene repórter do efeito da superexpressão de RAP2A sobre a ativação de NF- κ B induzida pelo complexo IKK (A e B) ou p65(RelA) (C). As células foram cotransfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng), IKK-alfa, IKK-beta ou p65 em combinação com o plasmídeo vetor pFLAG-CMV4 e/ou pCIneo-Myc-RAP2A. À exceção das células transfectadas com o vetor foram co-transfectados também os plasmídeos pFLAG-IKK- α (A) ou pHA-IKK- β (B) ou o plasmídeo pFLAG-p65 (C). A quantidade de DNA por transfecção foi mantida constante pela adição do plasmídeo pFLAG-CMV4. Vinte e quatro horas após a transfecção, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. As transfecções foram realizadas em triplicata. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. *P < 0.05, em relação à pFLAG-CMV4/IKK- α (A), ou pFLAG-CMV4/IKK- β (B) ou pFLAG-CMV4/p65 (C).

6. Discussão

Uma ativação eficiente de NF- κ B é necessária para uma resposta imune bem sucedida, mas esta resposta não pode ser permanente e precisa ser adequadamente controlada para evitar danos aos tecidos e até mesmo morte devido a choque e falência de órgãos. Vários mecanismos distintos estão envolvidos na regulação do NF- κ B, e exercem seus efeitos em diferentes níveis (Vallabhapurapu & Karin, 2009).

Em nosso estudo, identificamos RAP2A como uma nova molécula que exerce efeitos de regulação negativa sobre a ativação de NF- κ B induzida na resposta imune mediada por TLRs.

Um dos reguladores negativos de NF- κ B mais bem estudados é a proteína A20, e sabe-se que na maioria das células sua expressão é rapidamente induzida após ativação de NF- κ B. Mas, a expressão de A20 em linfócitos encontra semelhanças com a expressão de RAP2A observada no presente trabalho, pois linfócitos expressam altos níveis de A20, e após estímulos nos receptores de antígeno dessas células, ocorre rápida diminuição e subsequente reaparecimento de A20, o que sugere que a remoção de A20 seja necessária para a ativação de NF- κ B nesse caso (Duwel et al, 2009). Ainda, Kong e colaboradores mostraram que SIRP α , uma proteína reguladora negativa endógena da ativação do sistema imune inato em macrófagos após a exposição à LPS, tem seus níveis proteicos expressivamente diminuídos após o tratamento com o agonista TLR4 em células RAW264.7 (Kong et al, 2007).

Várias moléculas que regulam a ativação de NF- κ B geralmente tem a sua expressão induzida e regulada por esse fator de transcrição como um mecanismo de retroalimentação negativa (Ruland, 2011). A fim de comparar a expressão de Rap2A com a de um gene conhecido e fortemente induzido após estímulos com PAMPs, e de confirmar a reação das células RAW264.7 aos estímulos realizados, fizemos análises não apenas da expressão de Rap2A, mas também da expressão da citocina pró-inflamatória TNF. Comparativamente à expressão de TNF, e à expressão de Rap2A nos grupos estimulados com agonistas de TLRs, podemos observar que o gene de Rap2A possui uma expressão já elevada em células não estimuladas, o que também pode ser percebido pelos resultados com RT-PCR. Além disso, é importante notar a correlação

inversa da expressão do gene de TNF em relação à expressão de Rap2A nas células estimuladas.

Ainda, nos resultados de expressão de Rap2A em células RAW264.7 é interessante lembrar que a redução mais discreta após estímulos com agonistas de TLRs foi vista após o tratamento com poly-IC. Ao correlacionarmos este dado com os resultados de estudos funcionais, percebemos que Rap2A também apresenta um perfil diferente para o tratamento com poly-IC nos ensaios de gene repórter, pois nesses experimentos observamos pouca diferença na ativação de NF- κ B entre as células com e sem superexpressão de Rap2A. No entanto, pudemos demonstrar que Rap2A exerce um efeito significativo de diminuição na atividade de NF- κ B nas vias de TLRs 2 e 4, além de desempenhar este mesmo papel, de forma mais discreta, via TNF. A surpresa diante dos resultados de gene repórter, que mostraram um papel para Rap2A como regulador negativo da ativação de NF- κ B, foi em alguns aspectos sobrepujada pelo fato de não vermos o mesmo efeito na via de TLR3.

Ao considerar tais observações, podemos sugerir que há especificidade na atuação de Rap2A sobre as vias inflamatórias dos TLRs 2 e 4 nos casos estudados. Ou seja, Rap2A parece desempenhar efeito na atividade de NF- κ B após o reconhecimento de moléculas oriundas de bactérias, mas não de dsRNAs virais nos resultados apresentados. É importante lembrar, que tanto TLR2 e TLR4 possuem vias MyD88 dependente, enquanto que TLR3 é exclusivamente TRIF dependente.

Ao transfectarmos as células HEK293 com plasmídeos para a superexpressão das moléculas Mal/TIRAP, TRAF-6, TAK1/TAB1, IKK- α , IKK- β e p65/RelA, pudemos investigar, indiretamente, a atuação de Rap2A dentro da via que leva à ativação de NF- κ B. Além disso, confirmamos os resultados vistos anteriormente, pois para grande maioria dos experimentos em que proteínas das vias de TLRs foram superexpressas neste estudo, observamos significativa redução na ativação de NF- κ B por efeito do ganho de Rap2A.

É interessante perceber que em vários dos experimentos de gene repórter, vemos também uma diminuição na atividade de luciferase nas células não tratadas e transfectadas apenas com o vetor e RAP2A, sendo que essa redução acompanha as quantidades crescentes de RAP2A transfectado. Tal fato pode ter ocorrido devido à

influência de RAP2A sobre uma atividade pré-existente de NF- κ B nas células HEK293. É importante lembrar que essas são células tumorigênicas e que NF- κ B está envolvido na proliferação e sobrevivência celular (Ghosh & Hayden, 2012).

Ao observarmos os resultados apresentados nos gráficos para os experimentos com o objetivo de analisar os efeitos de Rap2A sobre a ativação de NF- κ B induzida por proteínas das vias iniciadas em TLRs, percebemos uma tendência de gradativa diminuição do efeito regulador negativo de Rap2A à medida que a via se aproxima da ativação de NF- κ B. Tal fato pode ser um indício de que a regulação exercida por Rap2A sobre a ativação de NF- κ B ocorra mais próxima ao início da via. Ressalta-se que, nesses mesmos resultados, as maiores reduções na ativação de NF- κ B entre as células com e sem expressão de Rap2A, foi vista nos experimentos com tratamento de Mal/TIRAP e TRAF6, as proteínas mais a montante da via de TLRs dentre aquelas utilizadas neste estudo.

Estes dados coincidem com a especificidade dos efeitos de Rap2A para as cascatas iniciadas em TLR2 e TLR4, pois estas compartilham as mesmas proteínas em suas vias de sinalização para ativação de NF- κ B, enquanto que TLR3 recruta as mesmas proteínas apenas a partir de TAK1 à jusante da via. Não obstante disso, além de necessitar de TRAM para recrutar TRIF para o domínio TIR, mesmo a via TRIF dependente de TLR4 utiliza TRAF6.

Embora os resultados apresentados aqui revelem uma nova molécula que reduz a atividade de NF- κ B nas vias inflamatórias de TLR2 e 4, mais estudos serão necessários para confirmar e mensurar a partir de outras técnicas o efeito de RAP2A observado no presente estudo. Obtivemos aqui, resultados de estudos a partir da expressão forçada de RAP2A, o que nos leva a crer que um desdobramento normal deste trabalho, seria fazer novos testes a partir da perda de função do gene de *RAP2A*. Na verdade, estudos utilizando-se siRNAs para Rap2A foram realizados nesse trabalho de dissertação, mas o resultados são ainda inconclusivos.

Trabalhos futuros poderão elucidar também de que maneira a expressão de RAP2A é regulada após os estímulos com agonistas de TLR. Recentemente Hu e colaboradores mostraram que o fator de transcrição HNF1b parece estar conjuntamente associado a *RAP2A* e o risco de câncer de próstata (Hu et al, 2013). Estudos *in silico*,

poderão indicar possíveis sequências de ligação de outros fatores de transcrição à região promotora de *RAP2A*. Outras possíveis moléculas reguladoras para *RAP2A* incluem os micro-RNAs. Recentemente, foi mostrada uma relação entre miR-376a não-editado e *Rap2a* na migração e invasão de células de glioma (Choudhury et al, 2012). Ainda, estudos sobre os níveis proteicos de Rap2a após o estímulo de macrófagos murinos com agonistas de TLRs e análises por Western Blot estão em andamento no nosso laboratório.

Outras linhas de investigação, podem ainda apontar os mecanismos pelos quais *RAP2A* exerce sua função após o estímulo por agonistas de TLRs. Em outra iniciativa em nosso laboratório, já trabalhamos com experimentos de co-Imunoprecipitação para averiguar possíveis alvos de *RAP2A*, tendo como candidatos iniciais as moléculas de TRAF6 e Mal/TIRAP.

Experimentos de co-Imunoprecipitação poderão também confirmar ou refutar a afinidade entre *RAP2A* e RASGEF1B, um GEF ativador de Rap2a (Yaman et al., 2009), como já foi mencionado. Na verdade, em um trabalho mais recente que mostra o envolvimento de Rap2A na polarização de células do intestino, foi descrito outro GEF que participa da ativação de Rap2A, o PDZGEF (Gloerich et al, 2012).

A descoberta de novas moléculas reguladoras de NF- κ B, e o desvendar de seus mecanismos de ação, podem ser de grande importância para a área biomédica, já que a atividade inapropriada de NF- κ B está relacionada a várias doenças, inclusive o câncer. Interessantemente, dados recentes mostraram que tecidos com tumor em células gliais tem baixa expressão e baixa atividade de Rap2A, e que, diferentemente de outras proteínas da família Ras, Rap2A parece atuar como supressor na patogênese de gliomas. Aparentemente, a superexpressão de Rap2 inibe a migração e invasão de gliomas ao regular negativamente a proteína AKT (Wang et al, 2013).

Mostramos que Rap2A exibe um efeito regulatório negativo na ativação de NF- κ B induzida por vias inflamatórias iniciadas por TNF, e, principalmente por receptores do tipo *Toll*. Portanto, mais estudos que indiquem de forma específica os alvos e o mecanismo de ação de Rap2A, além de sua possível atuação em diferentes tipos celulares do sistema imune e outros sistemas do organismo, podem levar ao

estabelecimento de medidas preventivas ou intervenções terapêuticas para doenças relacionadas a inflamações crônicas, autoimunidade, choque séptico e câncer.

7. Conclusões

- A expressão de Rap2A encontra-se elevada em macrófagos murinos, e é reprimida logo após a estimulação com agonistas TLRs, mas com recuperação e elevação de seus níveis em tempos tardios.
- O perfil de expressão de RAP2A em monócitos humanos logo após a estimulação com LPS obedece a um padrão semelhante ao observado em macrófagos murinos.
- A expressão forçada de RAP2A em células HEK293 é suficiente para atenuar a ativação de NF- κ B induzida por TNF, por agonistas de TLRs e por proteínas da via de sinalização dos TLRs.
- RAP2A parece não exercer efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B induzida através de TLR3.

Esses resultados, em conjunto, indicam que Rap2A é codificado por um gene de expressão transiente durante a resposta inflamatória, e que o produto codificado exerce o papel de uma molécula reguladora negativa da ativação de NF- κ B na via MyD88-dependente.

8. Referências

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783-801

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261(6): 511-528

Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42(3): 779-789

Andrade WA, Silva AM, Alves VS, Salgado AP, Melo MB, Andrade HM, Dall'Orto FV, Garcia SA, Silveira TN, Gazzinelli RT (2010) Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. *Genes Immun* 11(6): 447-457

Anwar MA, Basith S, Choi S (2013) Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 45: e11

Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG (2002) Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14(9): 1065-1074

Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 369-378

Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011) NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13(1): 11-22

Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS, Jr. (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6(10): 1899-1913

Bigler D, Gioeli D, Conaway MR, Weber MJ, Theodorescu D (2007) Rap2 regulates androgen sensitivity in human prostate cancer cells. *Prostate* 67(14): 1590-1599

Blasius AL, Beutler B (2010) Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32(3): 305-315

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129(5): 865-877

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622

Castellano E, Santos E (2011) Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2(3): 216-231

Chen, F. E.Huang, D. B.Chen, Y. Q.Ghosh, G (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 391(6665): 410-3

Cherfils J, Zeghouf M (2013) Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93(1): 269-309

Choudhury Y, Tay FC, Lam DH, Sandanaraj E, Tang C, Ang BT, Wang S (2012) Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells. *J Clin Invest* 122(11): 4059-4076

Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004(250): RE13

Cooper JT, Stroka DM, Brostjan C, Palmetshofer A, Bach FH, Ferran C (1996) A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271(30): 18068-18073

Dall'orto FVC (2007) Super-expressão e caracterização funcional do RasGEF1B em células de mamíferos, um fator de troca de nucleotídeos guanina de expressão induzida por agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs). *Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)* Universidade Federal de Minas Gerais

DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M (1996) Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 16(4): 1295-1304

Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(1): 11-22

Doyle SL, O'Neill LA (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72(9): 1102-1113

Duwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloo B, Ferch U, Darnay BG, Ruland J, Marynen P, Krappmann D (2009) A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF- κ B by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol* 182(12): 7718-7728

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413(6851): 78-83

Friday BB, Adjei AA (2008) Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14(2): 342-346

Ghosh G, Wang VY, Huang DB, Fusco A (2012) NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunol Rev* 246(1): 36-58

Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-848

Ghosh S, Hayden MS (2012) Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunol Rev* 246(1): 5-13

Gloerich M, ten Klooster JP, Vliem MJ, Koorman T, Zwartkruis FJ, Clevers H, Bos JL (2012) Rap2A links intestinal cell polarity to brush border formation. *Nat Cell Biol* 14(8): 793-801

Harhaj EW, Dixit VM (2011) Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21(1): 22-39

Harhaj EW, Dixit VM (2012) Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol Rev* 246(1): 107-124

Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18(18): 2195-2224

Hayden MS, Ghosh S (2011) NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 21(2): 223-244

Hayden MS, Ghosh S (2012) NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26(3): 203-234

Henkel T, Zabel U, van Zee K, Muller JM, Fanning E, Baeuerle PA (1992) Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* 68(6): 1121-1133

Heyninck K, Beyaert R (1999) The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* 442(2-3): 147-150

Heyninck K, De Valck D, Vanden Berghe W, Van Criekinge W, Contreras R, Fiers W, Haegeman G, Beyaert R (1999) The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. *J Cell Biol* 145(7): 1471-1482

Hu YL, Zhong D, Pang F, Ning QY, Zhang YY, Li G, Wu JZ, Mo ZN (2013) HNF1b is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes. *Genet Mol Res* 12(2): 1327-1335

Jaattela M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L (1996) A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J Immunol* 156(3): 1166-1173

Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13

Johnson DS, Chen YH (2012) Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 12(4): 458-463

Kamdar K, Nguyen V, DePaolo RW (2013) Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence* 4(3): 207-212

Kawabe H, Neeb A, Dimova K, Young SM, Jr., Takeda M, Katsurabayashi S, Mitkovski M, Malakhova OA, Zhang DE, Umikawa M, Kariya K, Goebbels S, Nave KA, Rosenmund C, Jahn O, Rhee J, Brose N (2010) Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron* 65(3): 358-372

Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1): 24-32

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373-384

Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34(5): 637-650

Kong XN, Yan HX, Chen L, Dong LW, Yang W, Liu Q, Yu LX, Huang DD, Liu SQ, Liu H, Wu MC, Wang HY (2007) LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* 204(11): 2719-2731

Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1): 16-34

LaRue KE, McCall CE (1994) A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* 180(6): 2269-2275

Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289(5488): 2350-2354

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6): 973-983

Li M, Zhou Y, Feng G, Su SB (2009) The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. *Curr Mol Med* 9(3): 365-374

Lima KM (2012) Análise dos níveis proteicos de RasGEF1b e do seu papel sobre a regulação da ativação de NF-kappaB em macrófagos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs). *Mestrado [Dissertação em Biologia Celular]*

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408

Lucas K, Maes M (2013) Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol Neurobiol* 48(1): 190-204

Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819-826

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640): 394-397

Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC (2014) TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol* 5: 79

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12(8): 695-708

Olsson S, Sundler R (2006) The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 43(6): 607-612

Opipari AW, Jr., Boguski MS, Dixit VM (1990) The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 265(25): 14705-14708

Paganini S, Guidetti GF, Catricala S, Trionfini P, Panelli S, Balduini C, Torti M (2006) Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins. *Biochimie* 88(3-4): 285-295

Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6853-6866

Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F (2011) UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 286(5): 3307-3314

Ramana KV, Fadl AA, Tammali R, Reddy AB, Chopra AK, Srivastava SK (2006) Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J Biol Chem* 281(44): 33019-33029

Rocha CD (2014) Análise dos efeitos de RasGEF1B sobre a regulação negativa de NF-kappaB. *Manuscrito em preparação* Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Ruland J (2011) Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. *Nat Immunol* 12(8): 709-714

Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T (1999) Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274(15): 10641-10648

Schindler U, Baichwal VR (1994) Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14(9): 5820-5831

Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5): 705-716

Song HY, Rothe M, Goeddel DV (1996) The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6721-6725

Tago K, Funakoshi-Tago M, Sakinawa M, Mizuno N, Itoh H (2010) KappaB-Ras is a nuclear-cytoplasmic small GTPase that inhibits NF-kappaB activation through the suppression of transcriptional activation of p65/RelA. *J Biol Chem* 285(40): 30622-30633

Takagi M (2011) Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Hematop* 51(2): 77-92

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26(2): 171-176

Uechi Y, Bayarjargal M, Umikawa M, Oshiro M, Takei K, Yamashiro Y, Asato T, Endo S, Misaki R, Taguchi T, Kariya K (2009) Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization. *Biochem Biophys Res Commun* 378(4): 732-737

Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693-733

Valverde TM (2011) RasGEF1b: localização celular de seus domínios e papel regulador negativo sobre ativação de NF-kappaB. *Mestrado [Dissertação em Biologia Celular]*

van Dam TJ, Bos JL, Snel B (2011) Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases* 2(1): 4-16

Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ (2010) Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10(12): 842-857

Wang L, Zhan W, Xie S, Hu J, Shi Q, Zhou X, Wu Y, Wang S, Fei Z, Yu R (2013) Over-expression of Rap2a inhibits glioma migration and invasion by down-regulating p-AKT. *Cell Biol Int* 38(3): 326-334

Yaman E, Gasper R, Koerner C, Wittinghofer A, Tazebay UH (2009) RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange. *FEBS J* 276(16): 4607-4616

Yan Q, Carmody RJ, Qu Z, Ruan Q, Jager J, Mullican SE, Lazar MA, Chen YH (2012) Nuclear factor-kappaB binding motifs specify Toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35): 14140-14145

9. Figuras Anexas

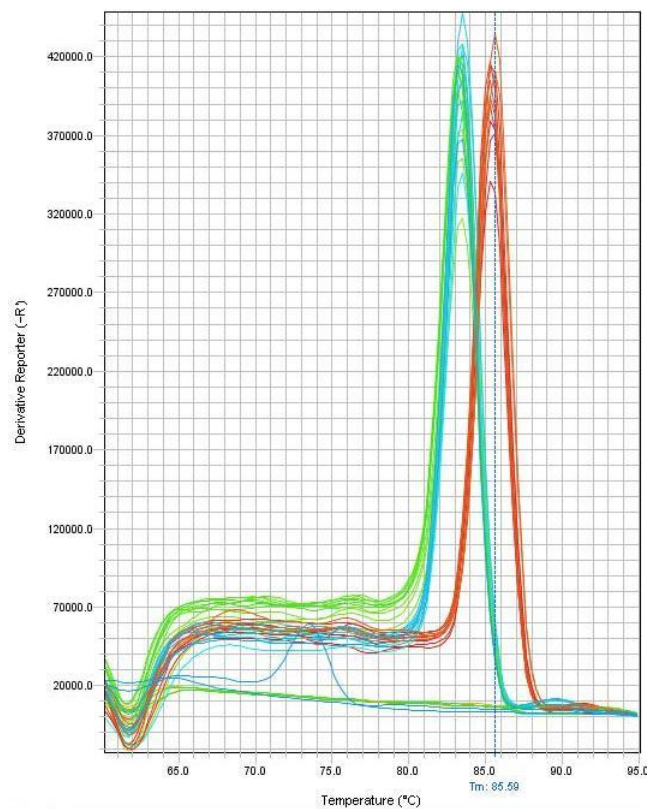


Figura 18: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de Rap2a murino (pico com curvas em vermelho) e Gapdh murino (pico com curvas em verde/azul). As linhas inferiores representam os controles negativos.

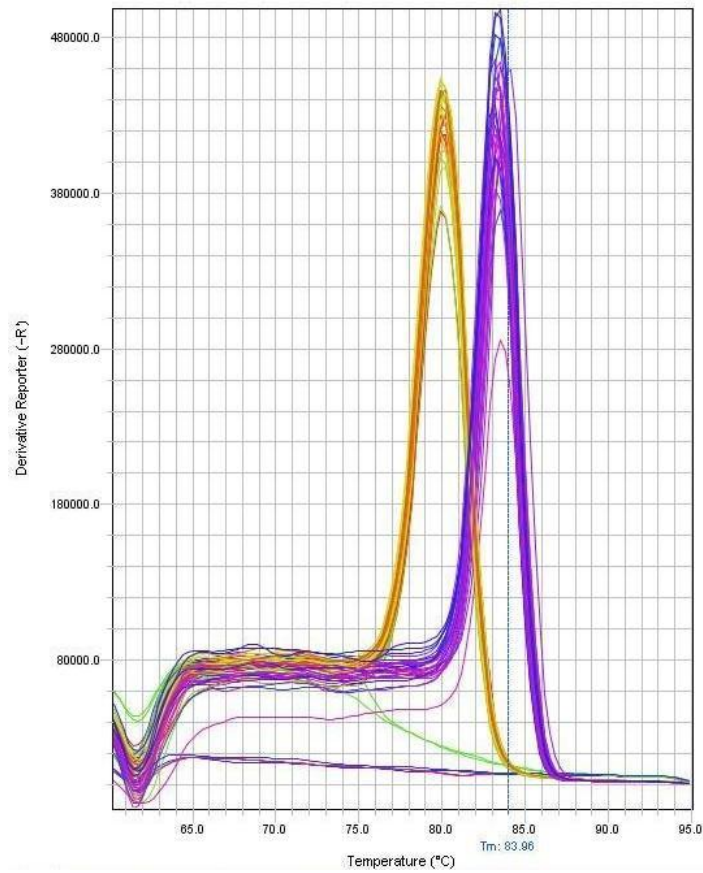


Figura 19: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de TNF murino (pico com curvas em vermelho/amarelo) e Gapdh murino (pico com curvas em roxo/rosa). As linhas inferiores representam os controles negativos.

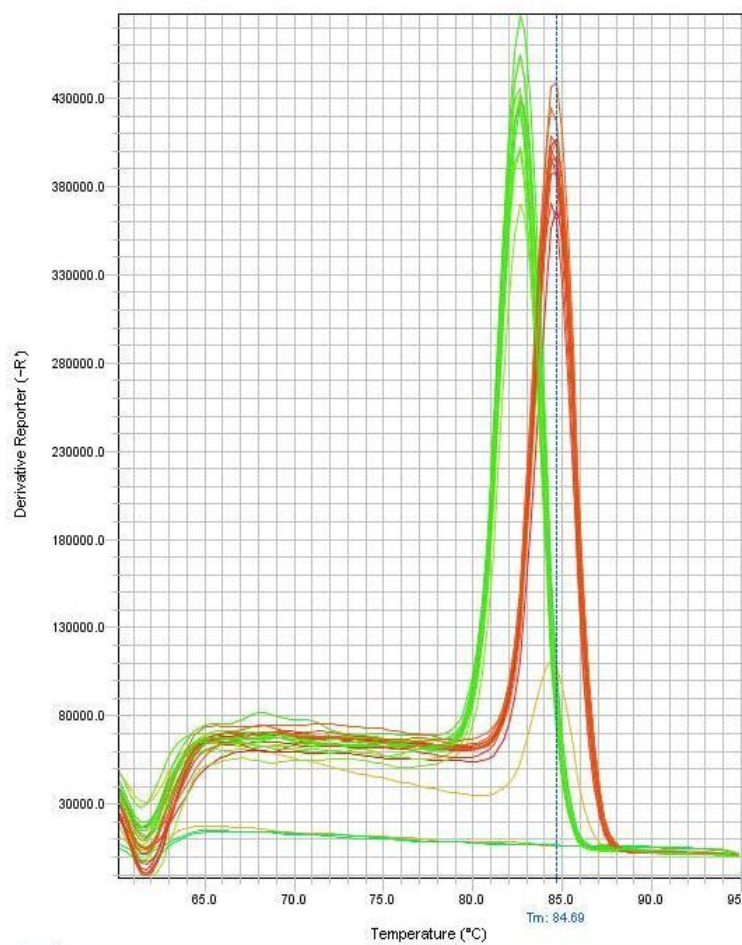


Figura 20: Curvas de dissociação para os primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR de RAP2A humano (pico com curvas em vermelho) e GAPDH humano (pico com curvas em verde). As linhas inferiores representam os controles negativos.