

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

**Implicação da GTPase Rap2a na imunidade inata: expressão,  
ativação e seu papel em macrófagos ativados por receptores  
do tipo Toll (TLRs)**

**Brener Cunha Carvalho**  
**Orientador: Aristóbolo Mendes da Silva**

Belo Horizonte – MG  
Setembro/2018

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

**Implicação da GTPase Rap2a na imunidade inata: expressão, ativação e seu papel em macrófagos ativado por receptores do tipo Toll (TLRs)**

Tese 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 Doutor em Biologia Celular.

Belo Horizonte – MG  
Setembro/2018

*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 ao Prof. Aristóbolo, pela orientação e confiança no presente trabalho, pela paciência e doação, e por contribuir com a minha formação acadêmica em todos esses anos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, aos seus professores e em especial às atuais coordenadoras, professoras Erika Cristina Jorge e Vanessa Pinho da Silva, e também às professoras Cristina Guatimosim, Luciana Oliveira e Fernanda Radicchi, que estiveram na coordenação do Programa durante grande parte da realização deste trabalho. Agradeço aos membros e ex-membros da secretaria, Paula, Rhuanna e Kender, obrigado pela presteza e simpatia.

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

Aos membros da banca, Dr. Daniel Mansur, Dra. Jaqueline Germano, Dra. Maria de Fátima, Dr. André Klein, e também aos suplentes Dr. Marco Campos e Dr. Gregory Kitten, obrigado por cederem seu tempo e por contribuírem com o trabalho e com o meu aprendizado.

Aos membros e ex-membros do LGI, Heliana, Felipe, Jôsy, Fernanda, Igor, Isadora, Kathleen, Rhaylla, Grazielle, Mariana, Thaís, Kátia, Thalita, Paula, Solange, Carolina pela ajuda em vários momentos, pela dedicação e pelos diversos aprendizados. Alguns mais do que colegas considero hoje como amigos e nutro grande carinho.

Lili, meu bem querer, o que cultivamos ao longo desse tempo se tornou algo infinitamente precioso para mim. Obrigado pelo apoio de todas as formas, pela amizade e por ser minha companheira. Quero seguir meu caminho de mãos dadas com você, te amo!

Aos colegas de pós-graduação e de ICB, muitos dos quais não me esquecerei nunca.

Igor Almeida, apesar da distância, ter consciência de nossa amizade já é por si só um apoio e uma felicidade. Cynthia, obrigado pela amizade e pelo apoio durante tanto tempo nessa trajetória.

Agradeço especialmente à minha família, pelo amor e carinho, pelos ensinamentos, e pela simples oportunidade de estar com vocês nessa vida. Obrigado Mãe, por me ensinar a força da inocência e da humildade, pelo amor infinito, pelas preces, pelo apoio incondicional e pela paciência. Um simples abraço seu tem um valor inestimável! Obrigado Pai, por me ensinar a valorizar o conhecimento, por me possibilitar a minha formação, pelo desprendimento em se doar tanto pelos filhos mesmo que muitas vezes em detrimento de si mesmo, a sua perseverança no dia-a-dia é uma inspiração. Agradeço a minha irmã por desafiar as minhas noções de verdade e ampliar os meus conceitos, saiba que é muito importante na minha vida. Amo vocês!

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

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

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sistema imune inato e receptores do tipo Toll .....	1
1.2 Vias de sinalização disparadas por TLRs .....	3
1.3 Fatores de transcrição NF-kappaB .....	5
1.4 Vias de ativação de NF-κB.....	7
1.5 Regulação da atividade de NF-κB.....	9
1.6 Proteínas Ras GTPases .....	11
1.7 Proteínas Rap GTPases e Rap2a.....	13
1.8 Ras e Rap GTPases na imunidade .....	15
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Cultura de células .....	19
4.2 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea.....	21
4.3 Estímulos .....	22
4.4 Extração de RNA total .....	23
4.5 Síntese da fita de cDNA.....	24
4.6 Análises de expressão gênica por RT-qPCR.....	24
4.7 Iniciadores (Primers) e condições de PCR .....	25
4.8 Ensaio de Western Blot (WB) .....	26
4.8.1 Obtenção de extratos celulares.....	26
4.8.2 Quantificação dos extratos celulares .....	26

4.8.3 Fracionamento eletroforético e transferência.....	27
4.8.4Imunoblot e revelação.....	27
4.8.5 Anticorpos.....	28
4.9 Geração de domínios GST-RalGDS RBD e ensaios de pull-down.....	28
4.10 Transfecções estáveis.....	29
4.11 Tranfecções transientes.....	29
4.12 Plasmídeos.....	30
4.13 Transformação bacteriana.....	31
4.14 Obtenção de DNA plasmidiano em média escala (Midiprep).....	32
4.15 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano livre de endotoxinas (Endo-free).....	33
4.16 Análise da atividade luciferase.....	34
4.17 Dosagem de citocinas por ELISA.....	34
4.18 Análises estatísticas.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 estimulados com agonistas de TLRs.....	36
5.2 Alteração nos níveis do mRNA de Rap2b e Rap2c em células RAW264.7 estimuladas com agonistas de TLRs.....	38
5.3 Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos primários obtidos de medula óssea (BMDMs) estimulados com agonistas de TLRs.....	40
5.4 Alteração nos níveis do mRNA de Rap2a em monócitos humanos (THP-1) estimulados com LPS.....	42
5.5 Análise de similaridade entre proteínas Rap.....	43
5.6 Afinidade do anticorpo para detecção de Rap2a.....	45
5.7 Ausência de correlação direta do perfil proteico de Rap2a com os níveis de mRNA observados em macrófagos estimulados com agonistas de TLRs.....	47
5.8 Ativação de Rap2a em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS.....	49
5.9 RasGEF1b é suficiente para induzir diretamente a ativação de Rap2a em células HEK293.....	53
5.10 RasGEF1b contribui parcialmente para a ativação de Rap2a em BMDMs estimulados com LPS.....	55

5.11 Ativação de AKT e ERK após estímulos com LPS e PMA em BMDMs desprovidos de RasGEF1b.....	57
5.12 Os níveis do mRNA de mediadores inflamatórios não sofrem alterações em MEFs transfectadas com siRNA-Rap2a.....	59
5.13 A ativação de NF-κB induzida por LPS é reduzida em macrófagos RAW264.7 transfectados com siRNA-Rap2a .....	62
5.14 A produção de mediadores inflamatórios é alterada em células RAW264.7-κB-luc transfectadas com siRNA-Rap2a .....	64
5.15 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por agonistas de TLRs em células HEK293 .....	67
5.16 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por LPS em macrófagos RAW264.7.....	69
5.17 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por moléculas da via de TLRs em células HEK293.....	70
6. DISCUSSÃO .....	75
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs..	2
Figura 2: NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição crucial para várias funções de diversos tipos celulares.....	6
Figura 3: Fosforilação e degradação de I $\kappa$ B e consequente translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo.....	7
Figura 4: Vias de sinalização mediadas por TLR2, 3 e 4.....	8
Figura 5: Alternância na ativação de GTPases. ....	12
Figura 6: Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs. ....	37
Figura 7: Análise dos níveis de mRNA de Rap2b e Rap2c em macrófagos murinos RAW264.7 estimulados com agonistas de TLRs.. ....	39
Figura 8: Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos murinos de medula óssea (BMDMs) após estímulos com agonistas de TLRs. ....	41
Figura 9: Alteração nos níveis do mRNA de Rap2a em monócitos humanos (THP-1) estimulados com LPS. ....	42
Figura 10: Análise de similaridade entre proteínas Rap. ....	44
Figura 11: Análise do anticorpo para detecção de Rap2a. ....	46
Figura 12: Os níveis proteicos de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs. ....	48
Figura 13: Obtenção de sondas GST-RalGDS-RBD para captura de Rap ligado a GTP..	50
Figura 14: Rap2a é ativado em macrófagos RAW264.7 após estímulos com LPS.....	52
Figura 15: RasGEF1b induz a ativação de Rap2a após superexpressão em células HEK293.....	54
Figura 16: RasGEF1b contribui parcialmente para a ativação de Rap2a em BMDMs estimulados com LPS. ....	56
Figura 17: Ativação de AKT e ERK após estímulos com LPS e PMA em BMDMs desprovidos de RasGEF1b.....	58
Figura 18: Alinhamento das sequências nucleotídicas de Rap2 com o siRNA utilizado no presente estudo. ....	59
Figura 19: Níveis de mRNA dos membros do grupo Rap2 em fibroblastos transfectados com siRNA-Rap2a.....	60
Figura 20: Níveis do mRNA de mediadores inflamatórios em fibroblastos transfectados com siRNA-Rap2a.....	61

<b>Figura 21:A ativação de NF-<math>\kappa</math>B induzida por LPS é reduzida em macrófagos RAW264.7 transfectados com siRNA-Rap2a. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 22: Níveis de expressão dos mRNAs de Rap2 em células RAW264.7-<math>\kappa</math>B-Luc transfectadas com siRNA-Rap2a.. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 23: A produção de mediadores inflamatórios é alterada em células RAW264.7-<math>\kappa</math>B-luc transfectadas com siRNA-Rap2a. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 24: Os níveis do mRNA de mediadores inflamatórios são alterados em células RAW264.7-<math>\kappa</math>B-luc transfectadas com siRNA-Rap2a.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 25: A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-<math>\kappa</math>B induzida por agonistas de TLR4 e TLR2 em células HEK293.. ....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 26: A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-<math>\kappa</math>B induzida por LPS em macrófagos RAW264.7. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 27: A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-<math>\kappa</math>B induzida por moléculas da via de TLRs em células HEK293.. ....</b>	<b>73</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1: TLRs e seus ligantes.....</b>	<b>4</b>
<b>Tabela 2: Membros da superfamília Ras, subfamílias e principais funções.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, suas sequências, condições termocíclicas e genes alvos.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 4: especificações dos anticorpos e as respectivas diluições utilizadas no presente trabalho.....</b>	<b>28</b>

## ABREVIATURAS

API	Proteína ativadora 1 ( <i>Activator Protein 1</i> )
BMDMs	Macófagos derivados de medula óssea ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> )
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif ligand 1 chemokine</i>
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco Modified Eagle's Media</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethylsulphoxide</i> )
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato ( <i>Deoxynucleotides Triphosphate</i> )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid</i> )
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
GAP	Proteína ativadora de GTPase ( <i>GTPase Activator Protein</i> )
GDP	Guanosina difosfato ( <i>Guanosine Diphosphate</i> )
GEF	Fator de troca de nucleotídeo guanina ( <i>Guanine Exchange Factor</i> )
GST	Glutathiona s-transferase ( <i>Glutathione S Transferase</i> )
GTP	Guanosina trifosfato ( <i>Guanosine Triphosphate</i> )
HEK	Célula embrionária de rim humano ( <i>Human Embryonic Kidney 293 cell</i> )
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IL-1R	Receptor de Interleucina-1 ( <i>Interleukin-1 receptor</i> )
IL-6	Interleucina-6 ( <i>Interleukin-6 cytokine</i> )
I $\kappa$ B	Inibidor de NF- $\kappa$ B ( <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i> )
IKK	Cinase de I $\kappa$ B ( <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> )
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível ( <i>inducible Nitric oxide synthase</i> )
IRAK	Cinase associada ao IL-1R ( <i>IL-1R-associated kinase</i> )
IRF	Fator regulador de Interferon ( <i>Interferon regulatory factor</i> )
KO	Nocaute ( <i>Knockout</i> )
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein</i>

	<i>kinases)</i>
Mal/TIRAP	Adaptador tipo MyD88/Proteína adaptadora contendo o domínio TIR ( <i>TIR domain-containing adapter protein/MyD88-adaptor-like</i> )
MEF	Fibroblasto embrionário de camundongo ( <i>Mouse embryonic fibroblast</i> )
mRNA	RNA mensageiro ( <i>messenger RNA</i> )
MyD88	Proteína de resposta primária de diferenciação mieloide ( <i>Myeloid differentiation factor 88</i> )
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear KappaB ( <i>Nuclear factor kappaB</i> )
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	Salina tamponada em fosfato ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase ( <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> )
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão ( <i>Pattern recognition receptors</i> )
PVDF	Fluoreto de polivinilideno ( <i>Polyvinylidene fluoride</i> )
RalGDS-RBD	<i>Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator-Rap-binding domain</i>
Rap	<i>Ras-related protein</i> ou <i>Ras proximate</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute culture medium</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
TAK	Cinase ativada por TGF- $\beta$ ( <i>TGF-<math>\beta</math> activated kinase</i> )
TIR	Domínio intracelular de <i>Toll</i> , homólogo ao receptor de interleucina-1 ( <i>Intracellular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor</i> )
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i> ( <i>Toll-like receptors</i> )
TNF	Fator de necrose tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
TRAF6	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral ( <i>TNFR-associated factor 6</i> )
TRAM	Molécula adaptadora relacionada à TRIF ( <i>TRIF-related adapter molecule</i> )
TRIF	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon- $\beta$ ( <i>TIR</i>

*domain containing adaptor protein inducing interferon)*

WT

Selvagem (*Wild type*)

## RESUMO

Uma das funções essenciais do sistema imune inato é o reconhecimento de patógenos, realizado por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presente em diversas células como macrófagos e neutrófilos. Os PRRs mais estudados são os receptores do tipo toll (TLRs). A sinalização celular disparada por TLRs leva à ativação de vários fatores de transcrição, que por sua vez regulam diversos genes relacionados à resposta inflamatória. Um fator de transcrição central nesse contexto é o NF- $\kappa$ B, cuja ativação precisa ser devidamente modulada, pois a sua desregulação desempenha um papel fundamental em diversas patologias. São poucos os estudos que relacionam Ras GTPases, proteínas envolvidas principalmente na migração e proliferação celular, às vias de TLRs e à ativação de NF- $\kappa$ B. Entretanto, já foi demonstrado que Rap1 é uma GTPase ativada na via de TLR4 e que a ativação de NF- $\kappa$ B é atenuada em macrófagos com perda de função de Rap1. As proteínas Rap1 e Rap2 possuem uma alta similaridade e embora já tenha sido demonstrado o envolvimento de Rap1 na ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLRs, não existem dados sobre as proteínas Rap2 no mesmo contexto. Ainda, abordagens bioquímicas já haviam demonstrado que Rap2a é ativado por RasGEF1b, um gene induzido por agonistas de TLRs. Portanto, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar o envolvimento de Rap2a na resposta imune inata mediada por receptores do tipo Toll (TLRs). Primeiramente, determinamos por RT-qPCR que os níveis do mRNA de Rap2a são reduzidos em resposta à estimulação com agonistas de TLRs em macrófagos murinos imortalizados (RAW264.7) e macrófagos murinos de medula óssea (BMDMs). Por ensaios de Western Blot, verificamos que a expressão proteica de Rap2a também é alterada em células RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs. De forma intrigante, observamos que não há correlação direta entre o perfil de expressão do mRNA e da proteína de Rap2a após os tratamentos com agonistas de TLRs. Ademais, demonstramos por ensaios de pull-down que Rap2a é ativado após estímulos com LPS em células RAW264.7 e BMDMs. Ainda, demonstramos em BMDMs desprovidos de RasGEF1b que a ativação de Rap2a é reduzida em comparação às células selvagens. Os resultados sugeriram uma implicação de Rap2a em vias disparadas por TLRs. Assim, realizamos experimentos a fim de obter dados funcionais para Rap2a nesse contexto. Inicialmente, realizamos transfecções com siRNA para o silenciamento de Rap2a em macrófagos RAW264.7. A partir de ensaios de gene repórter, observamos que a ativação de NF- $\kappa$ B após estímulos com LPS é

reduzida nas células RAW264.7 transfectadas com siRNA-Rap2a quando comparadas às transfectadas com siRNA-controle. Ademais, análises por RT-qPCR e ELISA mostraram que há diminuição na produção de CXCL1 e IL-6 nos macrófagos murinos transfectados com siRNA-Rap2a. Ainda, avaliamos o efeito da superexpressão de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por diversas moléculas como agonistas de TLRs e proteínas a jusante da via de sinalização iniciada nos TLRs. De maneira interessante, os resultados mostraram que a superexpressão de Rap2a também reduz a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por essas moléculas, exceto pelo agonista de TLR3. Em conjunto, nossos resultados demonstram de maneira inédita que Rap2a é uma GTPase implicada na resposta imune inata em vias desencadeadas por TLRs em macrófagos.

## **ABSTRACT**

Pathogen recognition is one of the essential functions of the innate immune system, performed by pattern recognition receptors (PRRs) in several cells, such as macrophages and neutrophils. The most studied PRRs are Toll-like receptors (TLRs). The cellular signaling triggered by TLRs leads to the activation of several transcription factors, which in turn regulate several genes related to the inflammatory response. The cellular signaling triggered by TLRs leads to the activation of several transcription factors, which in turn regulate several genes related to the inflammatory response. An important transcription factor in this context is NF- $\kappa$ B, which activation needs to be properly modulated, since its deregulation plays a fundamental role in several pathologies. There are few studies that relate Ras GTPases, proteins involved mainly in cell migration and proliferation, to TLR pathways and NF- $\kappa$ B activation. However, it has been demonstrated that Rap1 is a GTPase activated in the TLR4 pathway and that NF- $\kappa$ B activation is attenuated in macrophages with loss of Rap1 function. Rap1 and Rap2 proteins have a high similarity and although the involvement of Rap1 in TLR-mediated NF- $\kappa$ B activation has already been demonstrated, there are no data on Rap2 proteins in the same context. Furthermore, biochemical approaches have already shown that Rap2a is activated by RasGEF1b, a gene induced by TLR agonists. Thus, the main objective of the present study was to investigate the involvement of Rap2a in innate immune response mediated by Toll-like receptors (TLRs). First, we determined by RT-qPCR that Rap2a mRNA levels are altered in response to stimulation with TLR agonists in immortalized murine macrophages (RAW264.7) and murine bone marrow macrophages (BMDMs). By using western blot assays, we have found that the protein expression of Rap2a is also altered in RAW264.7 cells after stimulation with TLRs agonists. In an intriguing way, we observed that there is no direct correlation between the expression profile of the mRNA and the Rap2a protein after the TLRs agonists treatments. Next, we demonstrated by pull-down assays that Rap2a is activated after stimulation with LPS in RAW264.7 cells and BMDMs. Furthermore, we obtained results from BMDMs devoid of RasGEF1b, in which the activation of Rap2a is reduced compared to wild-type cells. The results described above suggest the implication of Rap2a in TLR triggered pathways. Thus, we performed experiments to obtain functional data for Rap2a in this context. Initially, we performed siRNA transfections in order to silence Rap2a in RAW264.7 macrophages. By reporter gene assays, we observed that

NF- $\kappa$ B activation is reduced in RAW264.7 cells transfected with siRNA-Rap2a when compared to those transfected with siRNA-control. In addition, RT-qPCR and ELISA analyzes showed that there is a decrease in CXCL1 and IL-6 production in murine macrophages transfected with siRNA-Rap2a. Furthermore, we evaluated the effect of Rap2a overexpression on the activation of NF- $\kappa$ B induced by several molecules such as agonists of TLRs and proteins downstream of the signaling pathway initiated in TLRs. Interestingly, the results show that when overexpressed, Rap2a also reduces the NF- $\kappa$ B activation induced by these molecules, except for the TLR3 agonist. Taken together, our results demonstrate that Rap2a is a GTPase implicated in the innate immune system in pathways triggered by TLRs in macrophages.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema imune inato e receptores do tipo Toll

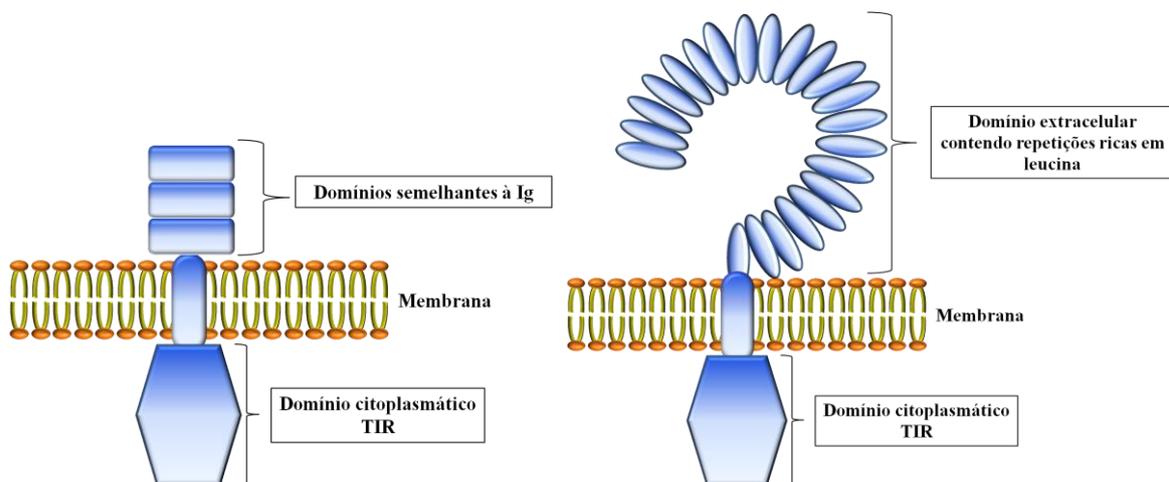
O sistema imune de mamíferos é composto pela imunidade inata e pelo sistema de imunidade adquirida. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e é mediado por fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos. A imunidade adquirida está envolvida na eliminação de patógenos 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, *pattern recognition receptors*) que reconhecem estruturas moleculares amplamente compartilhadas por patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Os PRRs são ainda capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *Damage-associated molecular patterns*), como moléculas endógenas provenientes de células necróticas ou de matriz extracelular (Janeway, 1989; Lucas e Maes, 2013).

Os receptores do tipo Toll (TLRs, *Toll like receptors*) são os PRRs mais bem caracterizados, sendo altamente conservados em vertebrados e invertebrados (Medzhitov, 2007; Wang *et al.*, 2013). 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 caracterizados por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR, *Leucine rich repeats*), uma única hélice transmembrana e um domínio intracelular que é homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, *Interleukin-1 receptor*), conhecido como domínio TIR (Toll/IL-1R), o qual é requerido para a transdução de sinal (figura 1). 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 e 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 e Akira, 2011b; Wang *et al.*, 2013). Os receptores TLRs são expressos tanto na superfície da célula quanto associados a vesículas intracelulares (Kawai e 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 e 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).

## 1.2 Vias de sinalização disparadas por TLRs

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, *Mitogen-activated protein kinases*) e também vários fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) e IRF3/7 (*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, *Myeloid differentiation factor 88*); a proteína adaptadora indutora de IFN-beta que contém o domínio TIR (TRIF, *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, *TIR domain-containing adapter protein/MyD88-adaptor-like*) e a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM, *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		Adaptador
	PAMPs	DAMPs	
<b>TLR1/2</b>	Lipoproteínas; Triacil Lipoproteínas (Pam3CSK4).	Não determinado	Mal/MyD88
<b>TLR2/6</b>	Lipoproteínas Diaciladas; Ácido Lpoteicoico (LTA); Zymosan	HSP60, HSP70, Gp96; HMGB1; Fragmentos de Matriz Extracelular	Mal/MyD88
<b>TLR3</b>	dsRNA (poly I:C)	mRNA	TRIF
<b>TLR4</b>	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
<b>TLR5</b>	Flagelina	Não determinado	MyD88
<b>TLR6/4</b>	Não determinado	Amiloide-â; Lipoproteína oxidada de baixa densidade	MyD88 TRIF
<b>TLR7</b>	ssRNA; Imidazoquinolinas (R848); Análogos de guanosina (loxoribina)	ssRNA do complexo imune	MyD88
<b>TLR8</b>	ssRNA; Imidazoquinolinas (R848)	ssRNA do complexo imune	MyD88
<b>TLR9</b>	CpG DNA não metilado ; Oligodinucleotídeos CpG; Hemozoína	Complexos IgG - cromatina	MyD88
<b>TLR10</b>	Molécula tipo profilina	Não determinado	MyD88
<b>TLR11</b>	Molécula tipo profilina; Bactérias uropatogênicas	Não determinado	MyD88
<b>TLR13</b>	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-κB. 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-κB 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 (Li *et al.*, 2009; Anwar *et al.*, 2013). Vários estudos utilizam moléculas agonistas de TLRs como potenciais agentes profiláticos e/ou terapêuticos contra doenças infecciosas (Mifsud *et al.*, 2014). Entretanto, exposições subseqüentes dos TLRs aos seus ligantes levam a uma insensibilidade ou hiporresponsividade dos mesmos, o que é conhecido como tolerância (Larue e McCall, 1994). Além disso, os receptores do tipo Toll desempenham um importante papel na tolerância à microbiota comensal do intestino (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, doenças inflamatórias intestinais e choque séptico (Yan *et al.*, 2012; Lucas e Maes, 2013; Lu *et al.*, 2018).

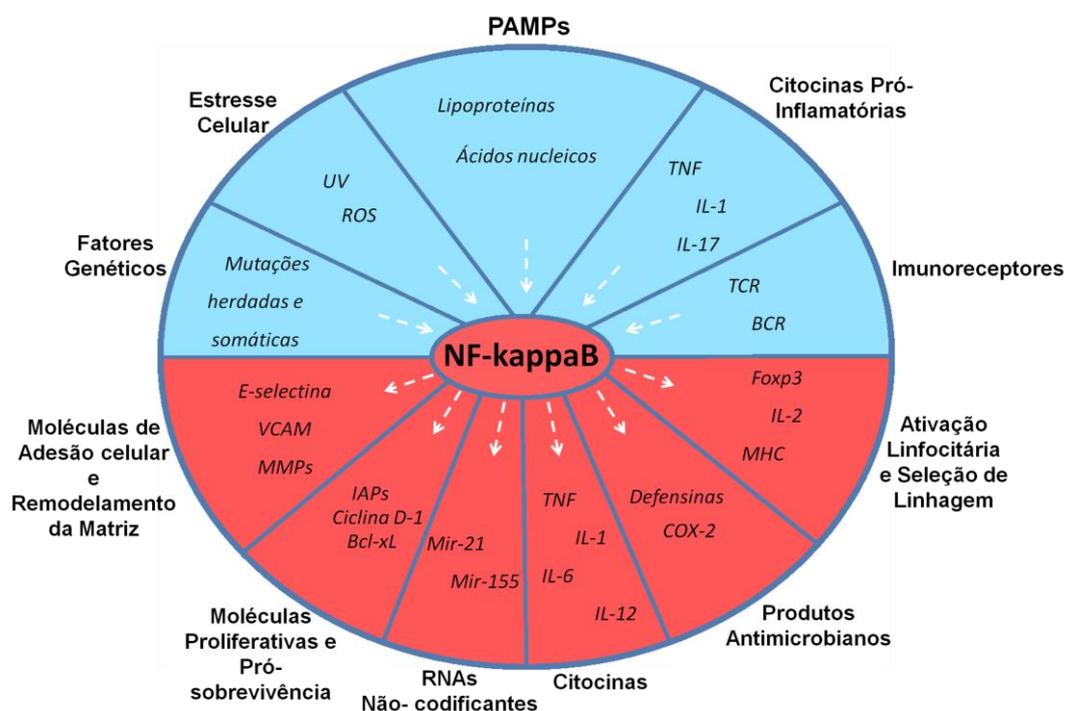
Portanto, o melhor conhecimento sobre a modulação das vias inflamatórias e dos mecanismos complexos das vias iniciadas por TLRs, pode levar a um melhor entendimento sobre diversas doenças e possibilitar novas abordagens terapêuticas.

### **1.3 Fatores de transcrição NF-kappaB**

A molécula de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B (Sen e Baltimore, 1986).

Desde o seu descobrimento, a família de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B foi objeto de pesquisas intensas em várias áreas da ciência biomédica, e hoje se sabe que a via de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B a patologias como o câncer e doenças metabólicas (Doyle e O'Neill, 2006; Baker *et al.*, 2011; Ghosh e Hayden, 2012).

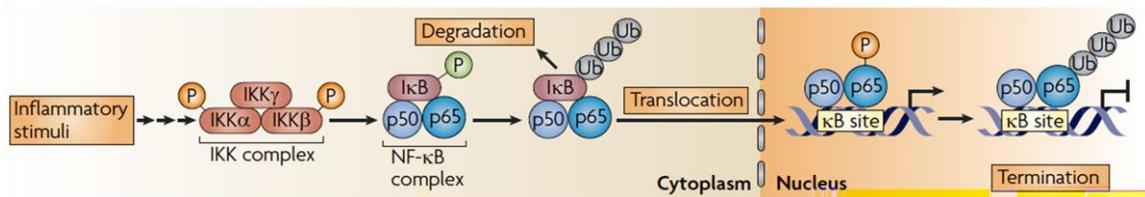


**Figura 2: NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição crucial para várias funções de diversos tipos celulares.** Sinais que variam de citocinas pró-inflamatórias a estresses incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e a luz ultravioleta (UV) levam à ativação de NF- $\kappa$ B. Por sua vez, NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B em mamíferos: RelA (p65), RelB, c-Rel e as proteínas precursoras NF- $\kappa$ B1 (p105) e NF- $\kappa$ B2 (p100), que são processadas em p50 e p52, respectivamente. Essas proteínas formam dímeros que se ligam a regiões  $\kappa$ B em sequências regulatórias de vários genes causando a indução ou repressão da transcrição dos mesmos (Pahl, 1999; Hayden e Ghosh, 2004).

No citoplasma, os dímeros de NF- $\kappa$ B estão associados a proteínas inibitórias denominadas I $\kappa$ B, o que os deixa em condição inativa. Quando há estímulo para a

ativação de NF- $\kappa$ B, as proteínas I $\kappa$ B são fosforiladas e assim marcadas para ubiquitinação e conseguinte degradação por proteassomas, liberando os dímeros de NF- $\kappa$ B que então são translocados para o núcleo (figura 3). A fosforilação de I $\kappa$ B ocorre por meio do complexo IKK (I $\kappa$ B cinases), que é composto por duas cinases cataliticamente ativas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , e uma subunidade regulatória denominada IKK $\gamma$  (NEMO, *Nuclear factor $\kappa$ B essencial modulator*) (Oeckinghaus *et al.*, 2011).



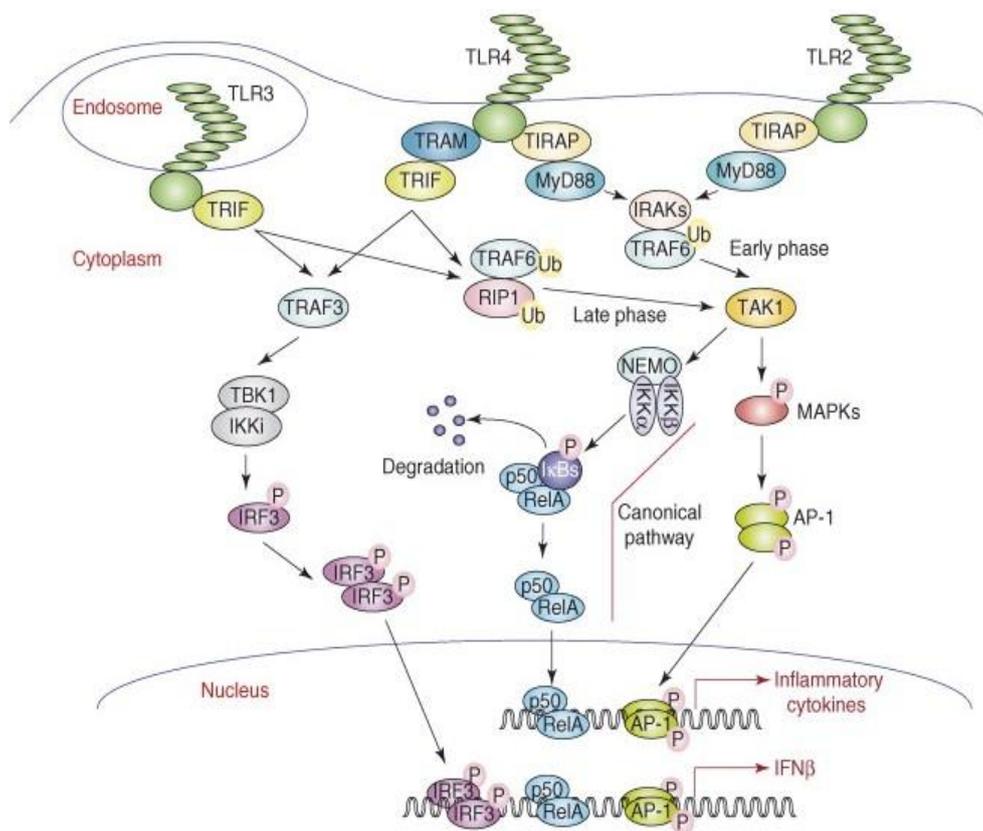
**Figura 3: Fosforilação e degradação de I $\kappa$ B e consequente translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo.** Ao final da cascata de sinalização para ativação de NF- $\kappa$ B após um estímulo inflamatório, as proteínas I $\kappa$ B são fosforiladas pelo complexo IKK e degradadas, liberando os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

Os cinco polipeptídeos do grupo de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B, incluindo a associação com os inibidores I $\kappa$ 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).

#### 1.4 Vias de ativação de NF- $\kappa$ B

As vias de sinalização que culminam na ativação de NF- $\kappa$ 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 e Ghosh, 2012).

A ativação clássica de NF- $\kappa$ 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- $\beta$  activated kinase*) e IKK, levando à ativação de NF- $\kappa$ B (figura 4). A via TRIF de TLR4 ativa predominantemente IRF3 que induz a produção de interferons do tipo I, mas também ativa NF- $\kappa$ B ao recrutar RIP1 (*Receptor interacting protein 1*) que por sua vez recruta e ativa TRAF6, TAK1 e IKK (Hayden e Ghosh, 2012).



**Figura 4: Vias de sinalização mediadas por TLR2, 3 e 4.** TLR4 pode recrutar os dois tipos de moléculas adaptadoras de domínio TIR. Já TLR3 recruta apenas TRIF e TLR2 é MyD88 dependente. Após o recrutamento das moléculas adaptadoras são disparadas vias de TLR4 pode recrutar os dois tipos de moléculas adaptadoras de domínio TIR. Já TLR3 recruta apenas TRIF e TLR2 é MyD88 dependente. Após o recrutamento das moléculas adaptadoras são disparadas vias de ativação para os fatores de transcrição IRF3, NF- $\kappa$ B e AP-1. IRF-3 é ativado apenas via TRIF dependente. Para a ativação canônica de NF- $\kappa$ B, todas as vias utilizam TRAF6, TAK1 e o

complexo IKK, que por sua vez fosforila I $\kappa$ B que é então degradado provocando a liberação do dímero de NF- $\kappa$ B que se transloca para o núcleo. *Retirado de (Kawai e Akira, 2007).*

Outro modo de ocorrer a ativação da via de sinalização canônica de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B (Hayden e Ghosh, 2012; Oeckinghaus *et al.*, 2011).

### **1.5 Regulação da atividade de NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ 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 ativação de NF- $\kappa$ B deve ser finamente regulada, pois sua modulação inadequada pode resultar em condições patológicas como inflamações crônicas, choque séptico, autoimunidade e câncer (Harhaj e Dixit, 2012; Aksentijevich e Zhou, 2017).

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

A ativação de IKK é promovida por mudanças conformacionais em IKK $\gamma$  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 da sinalização canônica de NF- $\kappa$ B, e a DUB mais bem estudada que modula NF- $\kappa$ B é denominada A20 (Harhaj e Dixit, 2011; Ruland, 2011).

A proteína A20, também conhecida como TNFAIP3 (*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 (Opiari *et al.*, 1990). Em 1996, vários grupos mostraram que a super expressão de A20 inibe a ativação de NF- $\kappa$ 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, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) deficientes de A20 exibem uma indução persistente da via de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  e IL-1, caracterizada por uma ativação prolongada de IKK e consequente degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  (Lee *et al.*, 2000). 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- $\kappa$ B disparadas por PRRs e receptores de antígeno. É importante ressaltar que a expressão de A20 é diretamente induzida pela atividade de NF- $\kappa$ 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 de NF- $\kappa$ B é CYLD (*Cylindromatosis*), que é capaz de deubiquitinar moléculas como TRAF2, TRAF6, TAK1 e IKK $\gamma$ . Diferentemente de A20, a expressão de CYLD não é diretamente induzida por NF- $\kappa$ 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 de NF- $\kappa$ B descritos na literatura. Estudos sobre proteínas da família Ras que cumpram este papel também já foram descritos. Um exemplo, é o da proteína  $\kappa$ B-Ras, que em um trabalho publicado por Tago e colaboradores, foi relacionada à regulação negativa da via de NF- $\kappa$ B (Tago *et al.*, 2010).

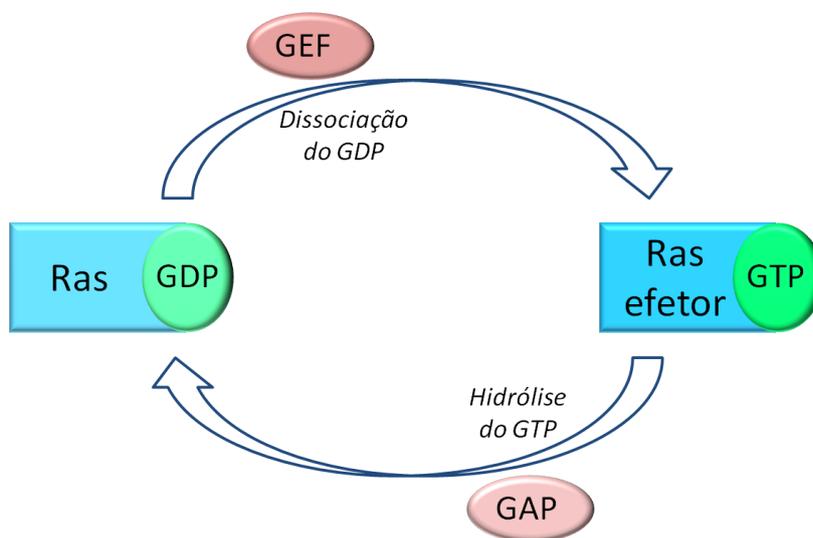
## 1.6 Proteínas Ras GTPases

A superfamília Ras de pequenas proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina (*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 (tabela 2). São proteínas com peso molecular que varia de 20 a 30 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; Goitre *et al.*, 2014).

Tabela 2: Membros da superfamília Ras, subfamílias e principais funções. *Modificado de Goitre, 2014* \*Parte dos membros não foram citados para fins de simplificação.

Família	Subfamília	Principais funções	Principais membros
Ras	Ras*	Proliferação e diferenciação celular, sobrevivência, apoptose, expressão gênica	E-Ras; N-Ras; H-Ras; K-Ras; M-Ras; R-Ras R-Ras2; Di-Ras1; Di-Ras2; Di-Ras3
	Ral	Exocitose dependente de GTP	RalA, RalB
	Rap	Adesão célula-célula e célula-matriz	Rap1A; Rap1B; Rap2A; Rap2B; Rap2C
	Rad	Remodelamento do formato celular, <i>checkpoint</i> do ciclo celular	Rad, Gem, Kir, Rem1, Rem2
	Rheb	Via de mTOR, crescimento celular e progressão do ciclo celular	Rheb; RhebL1
	Rit	Diferenciação e sobrevivência neuronal	Rit1; Rit2; Rin; Ric
Rho*	Dinâmica de citoesqueleto; formato polaridade, adesão e movimento celular; progressão do ciclo celular; expressão gênica	RhoA; RhoB; RhoBTB1; RhoBTB2; RhoBTB3; RhoC; RhoD; RhoF; RhoG;	
Rab*	Tráfego de proteínas e membranas em vias endocíticas e secretórias	Rab1A; Rab1B; Rab2; Rab3A; Rab3B; Rab3C; Rab3D; Rab4A; Rab4B; Rab5A;	
Arf*	Tráfego de vesículas, endocitose e exocitose	Arf1; Arf3; Arf4; Arf5; Arf6; Arl1; Arl2; Arl3; Arl4; Arl5; Arl5C; Arl6; Arl7; Arl8;	
Ran	Transporte nucleoplasmático; organização do fuso mitótico	Ran	

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 (Figura 5). Já as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs, *GTPase-activating proteins*), induzem a hidrólise do GTP pelas pequenas GTPases e assim levam as proteínas Ras ao seu estado inativo. 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; Van Dam *et al.*, 2011; Cherfils e Zeghouf, 2013).



**Figura 5: Alternância na ativação de GTPases.** Os GEFs ativam as proteínas Ras ao catalizar a troca de GDP por GTP, já os GAPs participam da inativação das proteínas Ras ao induzirem a hidrólise do GTP. *Modificado de Cherfils e Zeghouf, 2013*

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 de RalGDS, que ativa RalA e RalB, as duas isoformas do grupo Ral (Colicelli, 2004; Friday e Adjei, 2008; Johnson e Chen, 2012). A localização específica em membranas celulares das proteínas Ras em geral é determinante na ativação de seus efetores. Por sua vez, esta localização subcelular é

determinada principalmente por modificações lipídicas como prenilação e palmitoilação nas regiões C-terminais das GTPases (Simanshu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

A família Ras compreende 36 membros em mamíferos e é dividida em três grupos principais: Ras, Ral e Rap (Cherfils e 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 e 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 e Santos, 2011). De fato, diversas proteínas Ras são reguladores críticos da proliferação celular, mutações nessas proteínas são encontradas com alta frequência em uma ampla diversidade de tipos de câncer, incluindo alguns dos tipos mais prevalentes e letais em todo mundo, como os tumores de pulmão, colon e mama (Cox e Der, 2010; Wright *et al.*, 2015). Logo, até os dias atuais, a maior parte dos estudos envolvendo proteínas Ras envolve este contexto. É interessante observar que diferentes trabalhos já relacionaram a formação de tumores no pâncreas e endométrio a alterações na função da proteína K-Ras e uma consequente desregulação na atividade de NF-κB (Mizumoto *et al.*, 2011; Döppler *et al.*, 2016; Liou *et al.*, 2016). Ainda, vários estudos recentes têm relacionado alterações nas funções de Ras-GTPases a distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Stornetta e Zhu, 2011; Simanshu *et al.*, 2017). 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 e Chen, 2012).

### **1.7 Proteínas Rap GTPases e Rap2a**

O grupo de proteínas Rap 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 (Paganini *et al.*, 2006; Johnson e Chen, 2012). As proteínas Rap2 em particular, possuem 90% de homologia entre si e diferem principalmente na região C-terminal chamada de região hipervariável (HVR, *Hypervariable Region*). Dentro da região hipervariável se encontra o domínio CAAX (C, cisteína; A, alifático, X, qualquer aminoácido) dessas proteínas, onde podem ocorrer modificações pós-traducionais de prenilação e palmitoilação. Logo, a região CAAX influencia na associação às membranas e no endereçamento das proteínas Rap2,

o que é importante para as diferenças de função entre essas proteínas (Uechi *et al.*, 2009; Bruurs e Bos, 2014). 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 proteínas Rap1a e Rap2a foram descobertas conjuntamente em uma triagem feita a partir de uma biblioteca de linfoma humano (Pizon *et al.*, 1988). A proteína Rap1 ganhou foco ao ser descrita como uma antagonista funcional de proteínas Ras (Kitayama *et al.*, 1989). Entretanto, as moléculas Rap têm diversas funções independentes, no estabelecimento da polaridade de células, na apoptose, na carcinogênese e em diversos outros contextos (Guo *et al.*, 2016). Rap1 é uma proteína que se encontra com a expressão elevada em diversos tipos de câncer. Recentemente foi demonstrado que maiores níveis de expressão de Rap1 elevam o risco de câncer cervical e que a inibição de Rap1 diminui a progressão de tumor endometrial (Pascoal-Xavier *et al.*, 2015; Tamate *et al.*, 2017). Ainda, foi demonstrada a importância de Rap1 na produção de plaquetas por megacariócitos nos quais a deleção de Rap1a ou Rap1b prejudica a produção e adesão das plaquetas após injúria provocada mecanicamente, revelando uma função redundante para as proteínas Rap1 nesse contexto (Stefanini *et al.*, 2018). É interessante observar que Pannekoek e colaboradores demonstraram que Rap1 e Rap2 possuem funções antagônicas na regulação de barreira endotelial em células HUVEC. Enquanto Rap2 parece atuar para uma maior permeabilização da barreira, Rap1 contribui para o aumento na resistência da barreira endotelial (Pannekoek *et al.*, 2013).

As proteínas Rap2 (Rap2a, Rap2b e Rap2c) possuem uma massa molecular aproximada de 21KDa e tem 183 aminoácidos, podendo sofrer processamento pós-traducional e consequente adição de grupamentos farnesil e palmitoil em seus domínios CAAX (Ahearn *et al.*, 2011; Bruurs e Bos, 2014). Enquanto Rap2c, a Rap2 mais recentemente descoberta, ainda é menos estudada, vários trabalhos já demonstraram o envolvimento de Rap2a e Rap2b na migração e invasão de células cancerígenas. Ainda, estudos apontam que Rap2a e Rap2b são alvos de p53, uma proteína frequentemente mutada em diversos tipos de tumor (Zhang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

Rap2a tem sido relacionada principalmente ao estabelecimento de polaridade em alguns tipos celulares e migração celular em alguns tipos de câncer. Foi demonstrado

que Rap2a está envolvida na polarização de células intestinais que leva à formação da borda em escova (Gloerich *et al.*, 2012). Além disso, outros trabalhos mostraram que Rap2a está relacionado ao desenvolvimento de neuritos em neurônios e à ramificação de células dendríticas (Kawabe *et al.*, 2010). Em 2015, Wu e colaboradores demonstraram que Rap2a regula positivamente a migração e habilidade invasiva em linhagem de células de osteosarcoma (Wu *et al.*, 2015). Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que a superexpressão de Rap2c provoca efeitos semelhantes aos de Rap2a em células de osteosarcoma (Wu *et al.*, 2018). Em contraste, Rap2a inibe a migração e capacidade invasiva de células de glioma (Wang, L. *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). É interessante notar que em alguns dos trabalhos citados acima, é mostrado que Rap2a cumpre suas funções por meio da regulação de uma mesma cinase, a proteína AKT. Ademais, Uechi e colaboradores demonstraram que Rap2a participa na ativação da cinase TNIK ao se associar à membrana celular, evento para o qual é necessária a palmitoilação de Rap2a (Uechi *et al.*, 2009). Diferentes trabalhos apontaram ainda o envolvimento tanto de Rap2a como de Rap2b no câncer de próstata e no carcinoma renal (Bigler *et al.*, 2007; Di *et al.*, 2016; Di *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017).

### **1.8 Ras e Rap GTPases na imunidade**

Como mencionado anteriormente, grande parte dos estudos relacionados às GTPases estão relacionados ao papel dessas proteínas no desenvolvimento de tumores. Entretanto, diversos grupos têm investigado as funções de proteínas Ras não apenas na relação entre inflamação e câncer, mas também na imunidade de uma forma geral.

A diferenciação e produção de mediadores inflamatórios por linfócitos depende da ativação de receptores como TCRs (*T cell receptor*) e BCRs (*B cell receptor*) e, em alguns casos, da ativação das vias de ERK ou PI3K, cinases que são fosforiladas após a ativação de GTPases (Samstag e Nebl, 2005; Johnson e Chen, 2012). Já foi demonstrado, que a ativação e diferenciação de células T após o estímulo de TCR depende da ativação de Rap1 por meio do fator de troca de nucleotídeos guanina denominado SLAT (*SWAP-70-like adaptor of T cells*) (Côte *et al.*, 2015). Ainda, foi publicado recentemente um trabalho mostrando que a polarização do receptor BCR realizada por microtúbulos é prejudicada em linfócitos B depletados de Rap2c (Wang *et al.*, 2018).

Um número crescente de trabalhos tem demonstrado o papel de proteínas Ras em células da imunidade inata. A família da GTPase Rho possui um papel já bastante estudado na motilidade e capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos (Bokoch, 2005). Trabalhos de revisão recentemente publicados evidenciam o envolvimento não apenas de Rho mas também de Rap1, na barreira endotelial em contextos inflamatórios e na interação entre leucócitos e células endoteliais (Ramos e Antonetti, 2017; Chu *et al.*, 2018). Ainda, Kim e colaboradores demonstraram que Rho e Rap1 induzem de forma conjunta a fagocitose de partículas fúngicas em macrófagos ao regular a formação de filamentos de actina (Kim *et al.*, 2012). De forma interessante, Rap1 é capaz de restaurar a habilidade fagocítica de neutrófilos disfuncionais de forma independente de Rho e por meio do fator de troca EPAC (Scott *et al.*, 2016).

O envolvimento de proteínas Ras na produção de citocinas e quimiocinas também já foi reportado. Yu e colaboradores mostraram que camundongos com pancreatite aguda tratados com inibidor de proteínas Ras apresentam menores quantidades de IL-6 no plasma e diminuição na produção de CXCL1 e CXCL2 no tecido pancreático, levando a uma redução no infiltrado inflamatório deste tecido (Yu *et al.*, 2015). Ainda, já foi demonstrado que MEFs primários deficientes da GTPase  $\kappa$ B-Ras possuem níveis maiores de ativação de NF- $\kappa$ B e conseqüentemente produzem mais TNF- $\alpha$  após estímulos com LPS em comparação com células selvagens (Oeckinghaus *et al.*, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Trabalhos anteriores demonstraram o envolvimento de proteínas Ras na imunidade inata, principalmente relacionado à adesão e motilidade de neutrófilos e macrófagos. Entretanto, ainda são poucos os estudos que relacionem GTPases às vias de TLRs e à ativação de NF- $\kappa$ B por essas vias. O exemplo mais evidente é o das proteínas  $\kappa$ B-Ras1 e  $\kappa$ B-Ras2, que foram assim nomeadas por terem sido originalmente descritas devido à sua interação com I $\kappa$ B e consequente participação na regulação da atividade de NF- $\kappa$ B (Fenwick *et al.*, 2000). De fato, outros trabalhos não só confirmaram o papel inibitório de  $\kappa$ B-Ras sobre a atividade de NF- $\kappa$ B por meio da interação com I $\kappa$ B como foi demonstrado que esta molécula pode suprimir a fosforilação uma das subunidades (p65) do próprio NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Tago *et al.*, 2010). Outra proteína Ras implicada na ativação de NF- $\kappa$ B é Rap1. Moon e colaboradores demonstraram que esta é uma Rap ativada após estímulos com LPS em macrófagos e que a ativação de NF- $\kappa$ B nessas células é atenuada após transfecção com o dominante negativo de Rap1 (Moon e Pyo, 2007). Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que a expressão do fator de ativação de linfócitos B (BAFF) via TLR4 em macrófagos RAW264.7 é dependente da ativação de NF- $\kappa$ B envolvendo Rap1 (Moon *et al.*, 2011).

As proteínas Rap1 são mais bem estudadas que as isoformas Rap2. Embora já tenha sido demonstrado o envolvimento de Rap1 na ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLRs e apesar de as proteínas Rap1 e Rap2 possuírem uma sequência de aminoácidos muito semelhante, há uma carência de dados que relacionem as proteínas Rap2 à ativação de NF- $\kappa$ B por vias de TLRs. Ainda, Yaman e colaboradores demonstraram por abordagens bioquímicas que Rap2a é um efetor do fator de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1b (Yaman *et al.*, 2009). Já foi evidenciado que RasGEF1b é um gene induzido por agonistas de TLR3 e TLR4 (Andrade *et al.*, 2010). Ainda, estudos conduzidos em nosso laboratório sugerem que Rasgef1b pode interferir na expressão de Cxcl1 mediada por TLRs e que, o próprio *Rasgef1b* tenha a sua região promotora regulada por NF- $\kappa$ B (Silva *et al.*, 2018; Leão *et al.*, 2018).

**A partir dos argumentos descritos acima, hipotetizamos que Rap2a esteja implicado em vias disparadas por TLRs e na ativação de NF- $\kappa$ B.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o envolvimento de Rap2a na resposta imune inata mediada por receptores do tipo Toll (TLRs).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1) Investigar os níveis do mRNA de membros da Rap2, destacadamente Rap2a, em macrófagos murinos RAW264.7 e macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) estimulados com agonistas de TLRs.
- 2) Avaliar a ativação de Rap2a em macrófagos murinos estimulados com LPS.
- 3) Avaliar o efeito de RasGEF1b sobre a ativação de Rap2a em macrófagos murinos estimulados com LPS e PMA.
- 4) Analisar o efeito de RasGEF1b sobre a ativação de AKT e ERK1/2 jusante a Rap1/2 em macrófagos ativados após a estimulação com LPS e PMA.
- 5) Avaliar o efeito do silenciamento de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por LPS
- 6) Averiguar o efeito do silenciamento de Rap2a sobre a expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos ativados por LPS
- 7) Investigar o efeito da expressão forçada de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por agonistas de TLRs e moléculas a jusante na via de sinalização dos TLRs.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de células

No presente trabalho, foram utilizadas cinco linhagens de células imortalizadas: RAW264.7; RAW264.7-Luc; MEF-SV40; HEK293 e THP-1; além de uma cultura de células primárias (BMDMs), a qual será abordada em tópico específico (4.2).

As células RAW264.7 são uma linhagem de macrófagos murinos imortalizada por indução de leucemia em camundongos e é amplamente utilizada em estudos relacionados com a resposta inflamatória (Olsson e Sundler, 2006; Ramana *et al.*, 2006). Essa linhagem expressa diversos receptores de reconhecimento da imunidade inata incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs) (Applequist *et al.*, 2002), além de possuírem outros elementos característicos de células mononucleares fagocíticas. As células RAW264.7-κB-luc têm as mesmas características, com a diferença que possuem o repórter de NF-κB de maneira estável. As RAW264.7-κB-luc foram gentilmente cedidas pelo professor Sankar Ghosh (*Columbia University*). Todos os procedimentos de cultura descritos para as células RAW264.7 são válidos também para a cultura das células RAW264.7-κB-Luc. Para o seu cultivo, as células RAW264.7 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 (NUNC<sup>®</sup>, Delta Surface<sup>®</sup>; ou Sarsted<sup>®</sup>, sem tratamento; 25cm<sup>2</sup>) contendo 5mL de meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's, LGC<sup>®</sup>), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab<sup>®</sup>). As células eram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Quatro horas após o descongelamento, o meio era desprezado com a finalidade de eliminar debris celulares e DMSO (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 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 (mesmas marcas citadas acima, 75 cm<sup>2</sup>) 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; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM; KCl 2mM) (LGC<sup>®</sup>). Em seguida, eram adicionados 2-3mL de Tripsina 0,4%-EDTA (Gibco-Invitrogen<sup>®</sup>) por frasco, que era incubado a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, eram adicionados 4-6 mL de meio

completo fresco. Parte do volume total era desprezado dependendo da quantidade de células e o restante era ressuspensionado totalizando um volume de 15-20mL.

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 ressuspensionadas em meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Hybri-Max, Sigma®). Um mililitro dessa suspensão era colocado em criotubo (SPL®), e transferido para um freezer a -70°C. Após 24-48 horas, os tubos eram transferidos para cilindro contendo nitrogênio líquido a -196°C.

HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) é uma linhagem imortalizada de células epiteliais de rim de embrião humano contendo o antígeno tipo 5 de adenovírus. MEFs-SV40 (*Mouse Embryonic Fibroblasts-Simian Virus 40*) é uma linhagem de fibroblastos murinos imortalizados por meio de antígeno T do vírus SV40. Os procedimentos para o descongelamento, cultivo, passagens e congelamento dessas duas linhagens eram semelhantes aos já descritos para as células RAW264.7, exceto que o soro fetal bovino utilizado era proveniente da Gibco-Invitrogen®, e as garrafas estéreis para cultura de células de 25 e 75 cm<sup>2</sup> utilizadas eram provenientes dos fabricantes JetBiofil® ou Kasvi®. O meio de cultura também era o mesmo utilizado para as células RAW264.7, exceto que para as células HEK293 e MEF-SV40 o cultivo era feito com adição de antibióticos (100µg/mL estreptomicina e 100 U/mL penicilina, Gibco®). Ainda, ao serem tripsinizadas estas células eram incubadas por um período menor de tempo (1 minuto).

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 (JetBiofil® ou Kasvi®, 25 cm<sup>2</sup>) contendo meio RPMI-1640 (LGC®) suplementado com 10% SFB (Gibco®), 2mM L-glutamina (Gibco) e antibióticos penicilina (100U/mL, Gibco®) e estreptomicina (100µg/mL, Gibco®). As células eram incubadas em estufa a 37°C com uma atmosfera

de 5% CO<sub>2</sub>. 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 75cm<sup>2</sup> (mesmas marcas citadas anteriormente) 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<sup>®</sup>).

Todas as culturas de células utilizadas neste trabalho foram monitoradas quanto à contaminação por bactérias do gênero *Mycoplasma* por meio de PCR (Timenetsky *et al.*, 2006).

#### **4.2 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea**

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs, *Bone Marrow Derived Macrophages*) foram obtidos de camundongos C57/BL6 selvagens (WT, *Wild Type*) ou nocautes para RasGEF1b (RasGEF1b-KO, *-Knockouts*) (Marim *et al.*, 2010).

Os camundongos selvagens foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, UFMG). Os animais RasGEF1b-KO foram gerados pelo cruzamento de camundongos *Rasgef1b<sup>fl/fl</sup>* com camundongos transgênicos CMV-Cre (Silva *et al.*, manuscrito em submissão). Os camundongos MyD88-KO foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli (Laboratório de Imunoparasitologia, ICB-UFMG). Foram utilizados animais com idade de 8 a 12 semanas, machos ou fêmeas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CEUA, UFMG N° 69/2014).

Os camundongos eram previamente anestesiados e sedados com uma solução de quetamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), administrada via intraperitoneal e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos e colocados em um tubo de polipropileno contendo etanol 70% por 1 minuto e então transportados para capela de fluxo laminar em ambiente estéril. Os ossos eram transferidos e mantidos em PBS estéril enquanto a remoção do

excesso de tecido muscular era feita com auxílio de gaze estéril, embebida em álcool 70%. Com o auxílio de uma seringa com agulha era feito o *flush* das células precursoras da medula óssea diretamente para um tubo de polipropileno estéril. As células eram então centrifugadas a 200 x g por 10 minutos 4°C e depois ressuspensas em meio R20/30, i.e., meio RPMI 1640 contendo 20% SFB, 30% de sobrenadante de células L929 (fonte de M-CSF), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50µM de 2-mercaptoetanol. Após a contagem das células por método de exclusão com azul de trypan (Gibco®), 10 mL de uma suspensão de 7 x 10<sup>6</sup> células foram transferidos para placas de Petri de poliestireno (JProLab®). O tempo de diferenciação das células a macrófagos ocorria por 7 dias, a 37°C, em incubadora com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, sendo o meio substituído a cada dois dias. Ao final, o sobrenadante era aspirado e a cultura de células lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, eram adicionados cerca de 3 mL de PBS/EDTA 10 mM gelado à cultura, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. As células aderidas na placa, já diferenciadas em macrófagos, eram removidas por ressuspensão e transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs eram centrifugados a 200 x g por 5 minutos, a 4 °C e ressuspensos em meio R5/10 (RPMI 1640 com 10% SBF, 5% de sobrenadante de células L929, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50µM de 2-mercaptoetanol. Essas células eram então contadas e plaqueadas para a realização dos experimentos.

### 4.3 Estímulos

Onde identificado nos respectivos resultados: os estímulos com agonista de TLR4 foram feitos com LPS O55:B5 com concentração de 1000ng/mL (para os ensaios de Pull-down; experimento com THP-1; e gene repórter em HEK293 ) ou 100ng/mL (demais experimentos). Os estímulos com agonista de TLR2 foram realizados com Pam3CSK4 na concentração de 100ng/mL. Os estímulos com agonista de TLR3 foram feitos com Poly:IC na concentração de 100µg/mL. Todos os agonistas de TLRs foram fornecidos pela Sigma®. Os estímulos com PMA (Sigma, *Phorbol Myristate Acetate*) foram realizados com concentração de 100nM. Concentrações de estímulo diferentes do indicado aqui (experimentos de concentração-resposta) estão indicadas na figura do respectivo resultado. Todos os tempos de estímulo estão indicados nas figuras e legendas dos respectivos resultados.

#### 4.4 Extração de RNA total

Para as células RAW264.7, MEFs e BMDMs, que são aderentes às placas, o meio de cultura foi retirado, e 500µL do reagente TRIzol (Invitrogen®) foi imediatamente adicionado por poço (placas de 24 poços). A placa de cultura de células foi deixada por 15 minutos em shaker orbital e após este tempo o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de microcentrífuga (Axygen Scientific) e as amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente.

Para as células THP-1, ao término das estimulações com os agonistas TLRs, as suspensões celulares foram transferidas para tubos cônicos de 15mL (BD-Falcon®). 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.

Após estes procedimentos, para a extração do RNA total em todos os tipos celulares citados acima foi seguido o protocolo do reagente TRIzol segundo recomendado pelo fabricante. Eram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Vetec) por mL de TRIzol ao homogenato, seguida de agitação vigorosa por inversão por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente durante 3 minutos. Em seguida, a amostra era centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos, obtendo-se, ao final, uma fase aquosa (superior) e uma fase orgânica (inferior). A fase aquosa era transferida para outro tubo de microcentrífuga de 1.5mL (Axygen Scientific) estéril, ao qual eram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (Sigma) por mL de TRIzol para a precipitação do RNA. A amostra era incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 75% por agitação suave, seguida de centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e o RNA totalmente solubilizado em

água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) com auxílio de uma micropipeta. Em seguida a amostra era incubada a 55°C durante 10 minutos. Uma alíquota de 1-2 uL era usada para quantificação em espectrofotômetro NanoDrop ou NanoDrop lite (Thermo Scientific), os quais determinam a concentração de RNA total em ng/μL e a razão ácido nucléico:proteína, calculada com base nas absorbâncias de 260 nm e 280 nm medidas. Todos os procedimentos foram realizados com material autoclavado, plásticos e reagentes livres de RNase.

#### **4.5 Síntese da fita de cDNA**

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi adicionado a uma solução contendo: 0,5μg de oligo-dT<sub>18</sub>, 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 Análises de expressão gênica por RT-qPCR**

Os critérios para os estudos de RT-qPCR se basearam em conformidade com as instruções do MIQE *guidelines* (Bustin *et al.*, 2009). As RT-qPCR foram conduzidas utilizando-se os cDNAs diluídos em água milli-Q na proporção de 1:10. Dois microlitros da amostra diluída eram adicionados a uma mistura contendo 5 μL de iTaq SYBR Green Supermix (iTa<sup>q</sup>™ Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad), 2 μL de água milli-Q e 0,5 μL de cada iniciador a 10 mM (Tabela 3). Os procedimentos eram realizados em placas de 96 ou 48 poços (Axygen), que eram seladas, vortexadas e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos antes de serem transferidas para termociclador de tempo real (CFX96 Touch, Bio-Rad). Os dados eram analisados no CFX Manager Software (Bio-Rad) e salvos em formato Microsoft Excel para realização dos cálculos. Análises de abundância relativa de mRNA foram feitas conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct, *cycle threshold*), de acordo com a equação  $2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct =$

Ct(gene alvo) – Ct(gene normalizador). O cálculo de *fold change* foi feito de acordo com o método de Livak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tratado}) - \Delta Ct(\text{controle})$  (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores obtidos eram transferidos para o programa GraphPadPrism5 para plotagem gráfica e análises estatísticas.

#### 4.7 Iniciadores (Primers) e condições de PCR

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

**Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, suas sequências, condições termocíclicas e genes alvos.**

Alvo	Iniciadores	Sequência 5' → 3'	Condições termocíclicas
CXCL1	qRT-mCxcl1 FWD	ACTGCACCCAAACCGAAGTC	95°C/30 seg. 95°C/5 seg. 60°C/30seg. 65°C/31seg. 65°C/5seg. +0,5°C/ciclo +0,5°C/1seg.
	qRT-mCxcl1 REV	TGGGGACACCTTTTAGCATCTT	
GAPDH	qRT-HuGAPDH FWD	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	
	qRT-HuGAPDH REV	ACGACCAAATCCGTTGACTC	
IL-6	qRT-il16 FWD	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC	
	qRT-il16 REV	ACGACCAAATCCGTTGACTC	
iNOS	qRT-mNos2 FWD	GCTTGCCCAACAGGAGAAG	
	qRT-mNos2 REV	GCTGCCCGGAAGTTTGATC	
Rap2a	qRT-mRap2a FWD	AATACGACCCACCATCGAG	
	qRT-mRap2a REV	ACCTTCTCATACCGCTTCACG	
RAP2A	qRT-HuRap2a FWD	ATGCGCGAGTACAAAGTGGT	
	qRT-HuRap2a REV	GCGACGAATCCACCTCGAT	
Rap2b	qRT-mRap2b FWD	GCTCACCGTGCAGTTCGTAA	
	qRT-mRap2b REV	GCTGTAGACGAGAATGAAGCC	
Rap2c	qRT-mRap2c FWD	ATGAGGGAATACAAGGTAGTGGT	
	qRT-mRap2c REV	ACTTCGATCTCTTTCGGGTAGA	
Rpl32	qRT-mRpl32 FWD	GCTGCCATCTGTTTACGG	
	qRT-mRpl32 REV	TGACTGGTGCCTGATGAACT	
Tnf-α	qRT-mTnf FWD	ACAGAAAGCATGATCCGCG	
	qRT-mTnf REV	GCCCCCATCTTTTGGG	

## **4.8 Ensaio de Western Blot (WB)**

### **4.8.1 Obtenção de extratos celulares**

O sobrenadante das células era retirado e a monocamada era lavada com PBS 1X gelado. Em seguida as células eram ressuspensas em tampão de lise (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NaF 50mM; b-Glicerofosfato 10mM; EDTA 0,1 mM pH 8,0; Glicerol 10%; Triton X-100 1%) contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM; Ortovanadato de sódio 2 mM; Pepstatina 1µg/ml; Aprotinina 2 µg/mL; Leupeptina 1µg/ml). A quantidade do tampão de lise contendo inibidores de proteases que era usada dependia da área de superfície da placa e da quantidade de células ao final do experimento. Posteriormente, as amostras eram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. Para os WBs realizados a partir de amostras provenientes de ensaios de Pull-down, eram realizados os mesmos procedimentos descritos acima, com a exceção de que a lise das células era realizada com um tampão de composição diferente (Tris HCl 50 mM pH 7.4; NaCl 200mM; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM NaF; 10% v/v glicerol; 1% v/v nonideto P-40).

Todas as amostras destinadas ao Western blot eram quantificadas por ensaio de Bradford.

### **4.8.2 Quantificação dos extratos celulares**

Uma alíquota dos extratos era transferida para placas de microtitulação de 96 poços e diluídas em duas concentrações diferentes (1:5 e 1:10) em água Milli-Q, permanecendo em cada poço um volume final de 10 µL. Logo após eram adicionados 190 µL do reagente Bradford 1X (Biorad) por poço e a placa era incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância das amostras era obtida em comprimento de onda a 595 nm em leitor de ELISA (Multiskan FC, ThermoScientific). A curva padrão do BSA e a concentração proteica (µg/µL) das amostras eram calculadas por meio do programa SkanIt (ThermoScientific).

### **4.8.3 Fracionamento eletroforético e transferência**

O tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 0,4%; Glicerol 30%; SDS 10%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 6%; Azul de bromofenol 1,2%) era adicionado às alíquotas dos extratos celulares. Após fervura por 5 minutos, os extratos eram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, e corrida em tampão Tris-Glicina (Tris base 25mM pH 8.3; Glicina 250mM; SDS 0,1%), numa tensão de 100-140 V. Ao final da corrida, o gel era lavado brevemente em tampão de transferência (Tris base 25mM pH 8.0; Glicina 250mM; Metanol 20%) e as proteínas fracionadas no gel eram transferidas para uma membrana PVDF (Merck-Millipore), previamente equilibrada em tampão de transferência. Ao gel e membrana fixos em cassete de transferência (BioRad), era aplicada uma tensão de 100 V, a 4°C, por uma hora. Ao final da transferência, a membrana era utilizada nos procedimentos de imunoblot.

### **4.8.4 Imunoblot e revelação**

Após a transferência a membrana era incubada em solução de bloqueio [TBS-T (Tris-HCl 20mM pH 7.6; NaCl 137mM; Tween 0,1%) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado] à temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Após o bloqueio, a membrana era lavada com TBS-T em *shaker* orbital por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e então incubada sob agitação a 4°C por 16 horas com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio. Após este tempo, a membrana era novamente lavada em TBS-T (como descrito acima) e incubada à temperatura ambiente sob agitação por mais 1 hora com o anticorpo secundário correspondente, diluído em solução de bloqueio. Após novas lavagens (como descrito acima), era adicionado à membrana 1 mL de solução substrato (Clarity Western ECL Blotting Substrate, BioRad) para reação com a enzima HRP conjugada ao anticorpo secundário. Após 5 minutos o excesso de substrato era retirado e a membrana transferida para um cassete onde era exposta a filmes de raio-X (Carestream) por diferentes tempos (20 segundos a 2 minutos) . Em seguida, o cassete era aberto e o filme era revelado e fixado utilizando-se as soluções adequadas (Carestream). Todos os processos de exposição da membrana aos filmes e as revelações foram realizados em câmara escura no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas (CAPI-ICB/UFMG)

#### 4.8.5 Anticorpos

**Tabela 4: especificações dos anticorpos e as respectivas diluições utilizadas no presente trabalho.**

Alvo*	Tipo	Diluição em $\mu\text{L}$ (anticorpo:sol. bloqueio)	Empresa
Rap2a	Primário	1:500 a 1:2000**	Thermo Scientific
Myc	Primário	1:3500	Cell-signaling
Flag	Primário	1:1000	Cell-signaling
Fosfo-AKT (S473)	Primário	1:2000	Cell-signaling
Fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Primário	1:2000	Cell-signaling
AKT total	Primário	1:1000	Cell-signaling
ERK1/2 total	Primário	1:1000	Cell-signaling
$\beta$ -actina	Primário	1:5000	Santa Cruz
Camundongo	Secundário (conjugado a HRP)	1:3000	Sigma
Coelho	Secundário (conjugado a HRP)	1:3000	Cell-signaling

\*Todos os anticorpos primários são reativos a proteínas de camundongo

\*\*Concentrações maiores foram utilizadas em amostras provenientes de ensaio de Pull-down

#### 4.9 Geração de domínios GST-RalGDS RBD e ensaios de pull-down

O protocolo com os reagentes e procedimentos utilizados neste trabalho para a geração das sondas ativas e pulldown de Rap-GTP já foi descrito anteriormente (Van Triest *et al.*, 2001). Brevemente, a sequência de domínio RalGDS RBD foi amplificada a partir de MEFs e clonada em plasmídeos pGEX6p1. Foram então geradas sondas

ativas de GST-RalGDS RBD a partir da transformação de plasmídeos pGEX6p1-RalGDS RBD em bactérias BL21 induzidas com IPTG. As sondas previamente incubadas com *beads* cobertas por glutathiona sefarose foram utilizadas no isolamento das proteínas Rap-GTP do extrato proteico gerado. Após diversas lavagens com tampão de lise, o extrato purificado era fracionado para a realização de imunoblotting (como descrito anteriormente) com anticorpo específico para detecção de Rap2a.

#### **4.10 Transfecções estáveis**

A transfecção foi realizada com os plasmídeos pLKO.1-shRNA-GFP ou pLKO.1-shRNA-Rap2a (sequência GCCACTGTTGTGTAAACTAAA) utilizando-se Lipofectamina (ThermoFisher). Após 48h as células tiveram o meio trocado e foram incubadas com meio de seleção contendo DMEM com 10% SFB e 4µg/mL de puromicina (Sigma). O meio era substituído a cada 4 dias e a seleção foi realizada por 10 dias. Para a realização do experimento as células selecionadas foram cultivadas ainda em meio contendo puromicina.

#### **4.11 Transfecções transientes**

As células HEK293 eram plaqueadas 24h antes da transfecção como descrito anteriormente. As transfecções foram realizadas com os plasmídeos repórter PGL3-E-selectina e pRL-TK (Promega) nas quantidades de 400ng e 100ng por poço respectivamente utilizando-se o reagente de transfecção polietilenoimina (PEI-Max, Polysciences). Quando indicado, pGL3-E-selectina foi substituído por pGL3-promoter na quantidade de 400ng. Os demais plasmídeos para superexpressão foram conjuntamente transfectados com os plasmídeos repórter quando indicado nas figuras. Os plasmídeos para superexpressão das moléculas Mal/TIRAP; TRAF-6; IKK- $\alpha$ ; IKK- $\beta$ ; e p65 foram transfectados na quantidade de 500ng por poço. TAK1 e TAB1 foram transfectados na quantidade de 250ng cada por poço. TLR2 e TLR3 foram transfectados nas quantidades de 50ng por poço e TLR4, CD14 e MD2 nas quantidades de 30ng, 30ng e 5ng respectivamente por poço. Os plasmídeos de Rap2a foram transfectados em diferentes quantidades por poço como indicado nas figuras.

As células RAW264.7 eram plaqueadas 24h antes da transfecção como descrito anteriormente. As transfecções foram realizadas com os plasmídeos repórter PGL3-E-selectina e pRL-TK (Promega) nas quantidades de 400ng e 100ng por poço

respectivamente utilizando-se o reagente de transfecção Lipofectamina (ThermoFisher). Juntamente, foi transfectado siRNA-controle universal (Invitrogen) ou siRNA-Rap2a (Ambiom, sequência CCTTCATTGAGAAATACGT) na concentração de 100 nM/por poço. Os estímulos foram realizados 48h após a transfecção. Nos experimentos realizados com células RAW264.7-Luc foi seguido o mesmo protocolo apenas para a transfecção dos siRNAs, sem a necessidade de transfecção dos plasmídeos. Para as células MEF-SV40 também foram transfectados apenas os siRNAs, já que não foram realizados experimentos de gene repórter nessas células.

#### 4.12 Plasmídeos

- **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 (Universidade de Ryukyus, Japão)
- **pcDNA3.1-Flag-RasGEF1b**, contém sequência codificadora de RasGEF1B murino fusionado ao epítipo Flag clonada no vetor pcDNA3.1 (GeneScript).
- **pLKO.1-shRNA-GFP**, contém a sequência de shRNA para silenciamento de GFP clonada no vetor pLKO.1, gentilmente cedido por Sankar Ghosh (Columbia University, USA)
- **pLKO.1-shRNA-Rap2a**, contém a sequência de shRNA para silenciamento de Rap2a clonada no vetor pLKO.1 (Sigma)
- **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- $\kappa$ B, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic, USA).
- **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).
- **pGL3-promoter**, contém a sequência codificadora da luciferase de vaga-lume sob controle transcricional do promotor de SV-40 (Promega).
- **pFLAG-IKK $\alpha$** , contém sequência codificadora de IKK $\alpha$  com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).

- **pHA-IKK $\beta$** , contém sequência codificadora IKK $\beta$  com epítipo HA, gentilmente cedido por Daniel Mansur (UFSC).
- **pFLAG-Mal/TIRAP**, contém sequência codificadora de Mal/TIRAP com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic Foundation, USA).
- **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, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic Foundation, USA)
- **pFLAG-TAK1**, contém sequência codificadora de TAK1 com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic Foundation, USA)
- **pFLAG-TLR2, -TLR3 e -TLR4**, contém a sequência codificadora de TLRs humanos com epítipo FLAG, gentilmente cedido por Bryan Williams (Cleveland Clinic Foundation, USA)
- **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).

#### 4.13 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 $\mu$ g/ $\mu$ l - eram adicionados a 100 $\mu$ 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) (Tryptona 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 ressuspense 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.

#### **4.14 Obtenção de DNA plasmidiano em média escala (Midiprep)**

A partir de uma colônia coletada da placa da transformação (item X), 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.

#### **4.15 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 em células HEK293 ou macrófagos RAW264.7. 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  $\mu$ L 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.

#### **4.16 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, 5-20 $\mu$ L 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 40 $\mu$ L do reagente LARII (Promega), seguido da leitura das amostras em luminômetro (LumiCount<sup>™</sup>, Packard Instruments). Logo após a leitura da luciferase de vagalume a placa era retirada do aparelho e então eram adicionados 40 $\mu$ L 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). 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).

#### **4.17 Dosagem de citocinas por ELISA**

Ao fim dos respectivos experimentos o sobrenadante das células RAW264.7 foi coletado para a dosagem de citocinas por método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para tal, foram utilizados os kits da empresa R&D Systems, a saber: DuoSet mouse CXCL1/KC (Nº catálogo DY453); DuoSet mouse TNF- $\alpha$  (Nº catálogo DY410) e DuoSet mouse IL-6 (Nº catálogo DY406) . Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, com algumas modificações: primeiramente, foram colocados 50 $\mu$ L/poço do anticorpo de captura (R&D Systems, concentração recomendada pelo fabricante para cada kit) em placa apropriada (Maxisorp®, Nunc). Em seguida, a placa foi selada e incubada por 16 horas. Após este tempo, o anticorpo de captura foi descartado e os poços da placa foram

lavados por 3 vezes com tampão adequado (PBS1X contendo 0,5% de Tween 20). Após as lavagens, 300µL de tampão de bloqueio (PBS1X contendo 1% de BSA) foram adicionados por poço seguido de incubação por um período mínimo de 1 hora. Após o descarte do tampão de bloqueio, os poços eram novamente lavados (todas as lavagens subsequentes eram feitas como descrito acima) e então era acrescentada uma alíquota de 50µL/poço de cada sobrenadante coletado. Após 2h de incubação os sobrenadantes eram retirados e a placa submetida a novas lavagens. Cinquenta microlitros do anticorpo de detecção eram adicionados e a placa incubada por mais 2 horas. Após descarte e novas lavagens 50µL de estreptavidina-HRP eram colocados em cada poço e a placa incubada durante 20 minutos ao abrigo da luz. Após descarte e novas lavagens, eram adicionados 50µL da solução substrato (TMB) a cada poço e a placa incubada durante 20-30 minutos. Finalmente, 50µL de solução de parada (ácido sulfúrico 2N) eram adicionadas a cada poço e em seguida realizada a leitura (450nm) em leitor de microplacas (Multiskan FC, ThermoScientific).

#### **4.18 Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Nas análises comparativas de grupos isolados foi utilizado Teste T. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Foi utilizada análise de variância one-way ANOVA e pós-teste Bonferroni nas análises agrupadas. A plotagem dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPrism5.0*.

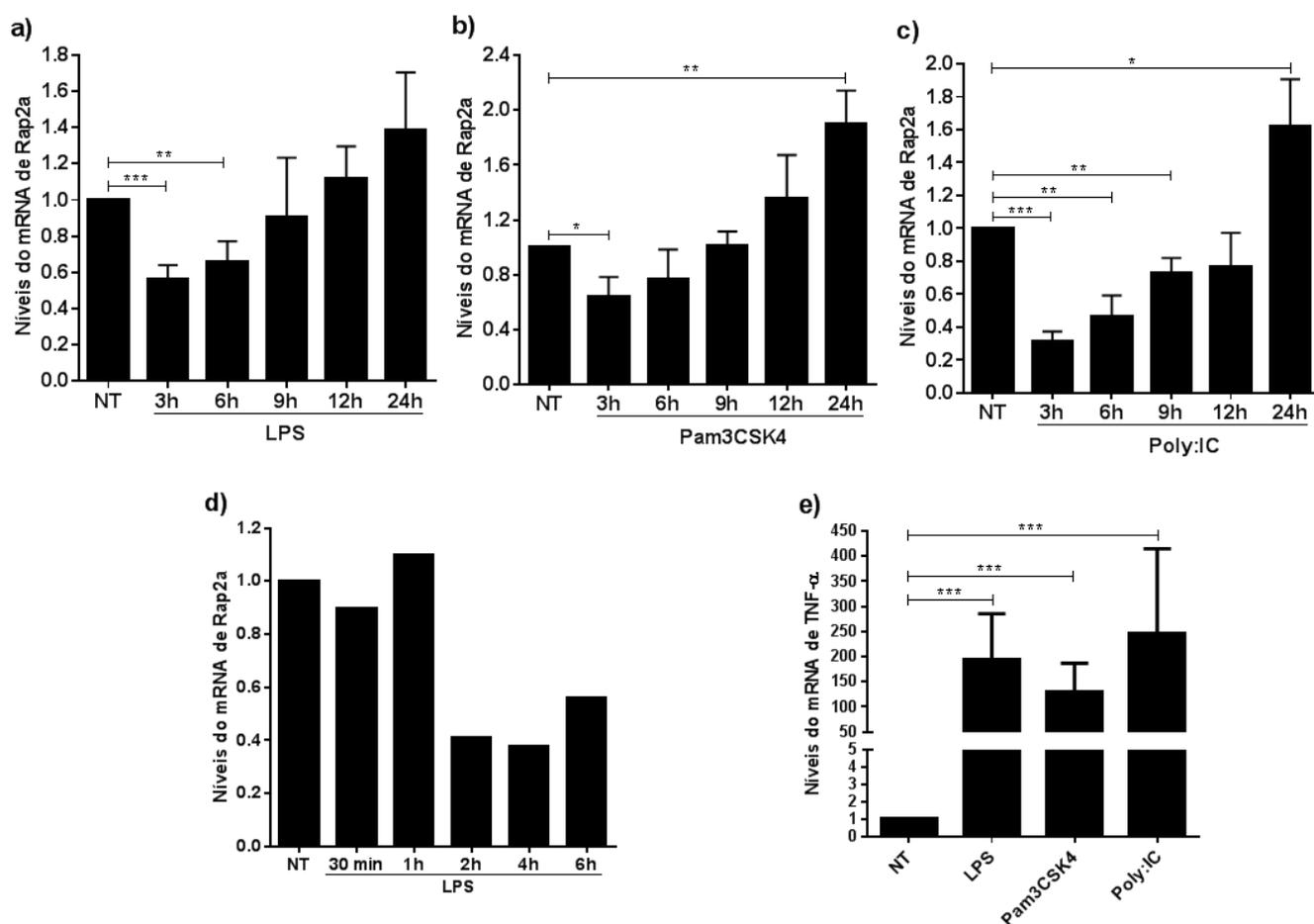
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 estimulados com agonistas de TLRs

De modo geral, genes envolvidos na resposta imune têm seus níveis de expressão alterados após estímulos inflamatórios. Uma vez que não existem dados na literatura sobre a expressão de Rap2a nesse contexto, nós decidimos estimular macrófagos murinos RAW264.7 com agonistas de TLR4, TLR3 e TLR2 (LPS, Poly:IC e Pam3CSK4 respectivamente) e realizar análises de expressão por RT-qPCR. Constatamos que os níveis do mRNA de Rap2a são alterados após os três tratamentos (figuras 6a-c). Ainda, vimos que o perfil dos níveis de mRNA após os estímulos por diversos tempos (3h, 6h, 9h, 12h e 24h) é muito semelhante para os três agonistas. Os níveis do mRNA de Rap2a são significativamente reduzidos logo após 3h de estímulo para todos os agonistas, retomam níveis próximos aos da células não tratadas (NT) em tempos intermediários de estímulo (9 e 12h) e são expressivamente induzidos 24h depois da adição dos agonistas.

Uma vez que a redução mais significativa na expressão de Rap2a ocorreu logo após o menor tempo de estimulação testado (3h), nos perguntamos o quão precoce ocorreria a queda nos níveis do mRNA de Rap2a. Logo, as células RAW264.7 foram novamente tratadas com LPS por 30 min., 1h, 2h, 4h e 6h, e os RNAs totais obtidos para nova análise por RT-qPCR. Como pode ser observado no resultado apresentado na figura 6d, com 30 minutos e 1h após o estímulo com LPS não existem diferenças expressivas em relação ao controle de células não tratadas (NT). No entanto, o início da queda na expressão de Rap2a parece ocorrer entre 1h e 2h após o tratamento com LPS. Além disso, confirmamos que a redução máxima na expressão de Rap2a ocorre entre 2h e 4h após o estímulo.

Ainda, na figura 6e é apresentado um resultado de RT-qPCR para TNF realizada a partir das mesmas amostras empregadas nos resultados das figuras 6a, 6b e 6c e que foram estimuladas por 3h. Como esperado, verificamos uma abundante expressão dessa citocina pró inflamatória, atestando assim, a eficiência do agonista utilizado na indução de resposta via TLRs.

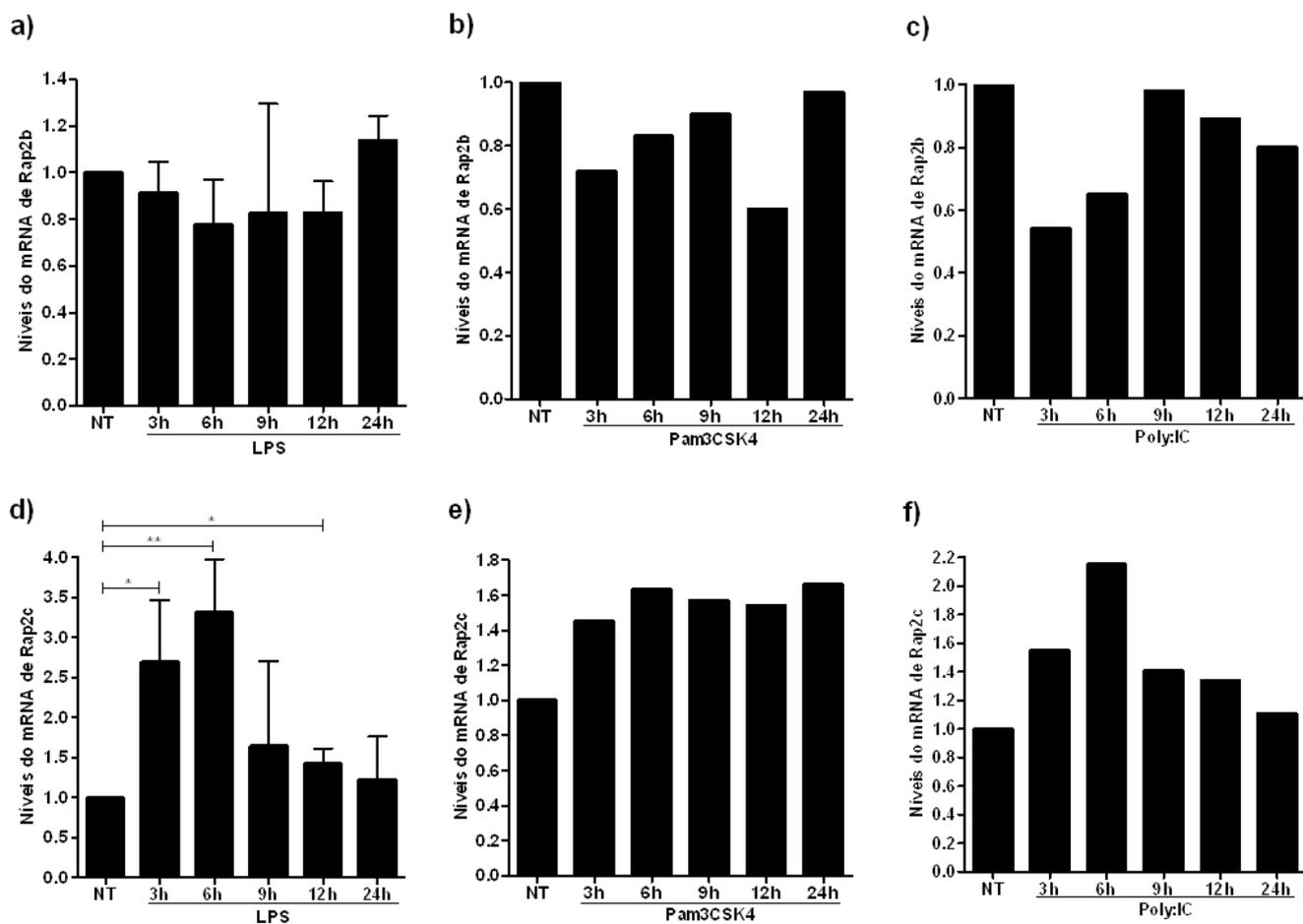


**Figura 6: Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs.** Células RAW264.7 foram estimuladas com LPS (100ng/mL) ou Pam3CSK4(100ng/mL) ou Poly:IC (100µg/mL) por diferentes tempos como indicado na figura. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2a (a-d) ou TNF (e). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (exceto em d, no qual foi realizado apenas um experimento). \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; em relação ao não tratado (NT).

## **5.2 Alteração nos níveis do mRNA de Rap2b e Rap2c em células RAW264.7 estimuladas com agonistas de TLRs**

Os três membros do grupo de Rap2 possuem sequências bastante similares e frequentemente as proteínas Ras-GTPases de uma mesma família apresentam funções redundantes. Assim, nós decidimos verificar também os níveis do mRNA de Rap2b e Rap2c em células RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs por diferentes tempos. Observamos que os níveis dos mRNAs de Rap2b e também de Rap2c são alterados após os tratamentos com os agonistas (figura 7), embora as alterações nos níveis de Rap2b sejam modestas (figuras 7a-c). Ainda, os perfis de expressão são diferentes dos observados para Rap2a. De modo geral, os dados sugerem que os níveis do mRNA de Rap2b apresentam tendência a ser reduzidos após os estímulos, ainda que de forma pouco expressiva (figuras 7a- c). Já no que se refere a Rap2c (figuras 7d-f), os resultados sugerem que a expressão desse gene é induzida nos tempos iniciais de estímulo e então volta a níveis próximos do basal nos tempos mais tardios.

Em conjunto, as alterações nos níveis do mRNA de membros da família Rap2 – sobretudo Rap2a e Rap2c – que ocorrem nos macrófagos estimulados com agonistas de TLRs sugerem que essas moléculas possam estar envolvidas em vias ativadas por TLRs. Como o papel de proteínas codificadas por genes de expressão reprimida e transiente durante a resposta imune não é muito explorado, nós decidimos caracterizar melhor a expressão de Rap2a.

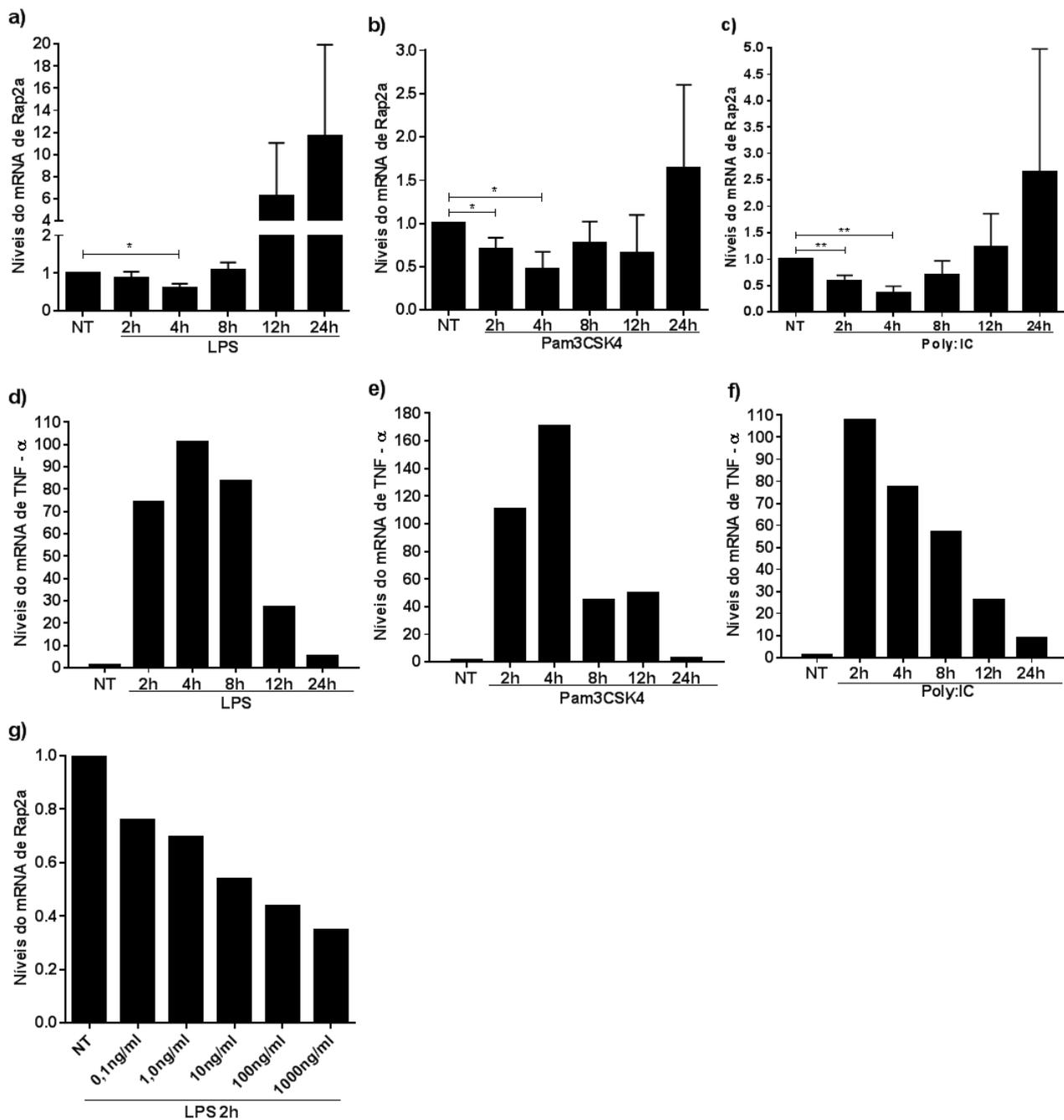


**Figura 7: Análise dos níveis de mRNA de Rap2b e Rap2c em macrófagos murinos RAW264.7 estimulados com agonistas de TLRs.** Células RAW264.7 foram estimuladas com LPS (100ng/mL) ou Pam3CSK4(100ng/mL) ou Poly:IC (100µg/mL) por diferentes tempos como indicado na figura. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2b (a-c) ou Rap2c (d-f). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (apenas para a,d; foi realizado experimento único para os demais gráficos). \*P<0.05; \*\*P<0.01; em relação ao não tratado (NT). NT = não tratado.

### **5.3 Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos primários obtidos de medula óssea (BMDMs) estimulados com agonistas de TLRs**

Em seguida, nós decidimos avaliar os níveis de Rap2a em macrófagos primários. Para isso, macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDMs) foram estimulados com agonistas de TLRs e em seguida os níveis de expressão gênica analisados por RT-qPCR. Como pode ser observado nas figuras 8a-c, os perfis de expressão de Rap2a encontrados para os BMDMs após os estímulos com agonistas de TLRs são muito semelhantes àqueles apresentados para as células RAW264.7 (figura 6a-d). De forma semelhante aos resultados obtidos em macrófagos RAW264.7, nós observamos uma redução significativa nos níveis do mRNA de Rap2a após tempos iniciais de estimulação, seguida de uma elevação nesses níveis após tempos mais tardios. Esses resultados corroboram a natureza transiente da expressão de Rap2a em macrófagos ativados. Assim, o perfil de expressão encontrado para Rap2a é consistente não apenas entre os diferentes agonistas testados, mas também entre as duas linhagens de macrófagos. É interessante observar que o perfil de expressão de TNF é inversamente correlacionado ao perfil observado para Rap2a (figuras 8d-f).

Em seguida, nós investigamos os níveis do mRNA de Rap2a após estímulos com quantidades crescentes de LPS. O resultado apresentado na figura 8g, indica que a redução nos níveis do mRNA de Rap2a em BMDMs após 2h de estímulo é mais proeminente nos grupos com maior concentração de LPS, fornecendo evidências adicionais que Rap2a é codificado por um gene de expressão reduzida após estímulos com agonistas de TLRs. É interessante ressaltar que mesmo a concentração mínima de LPS testada (0,1ng/mL) já é suficiente para reduzir os níveis do mRNA de Rap2a .

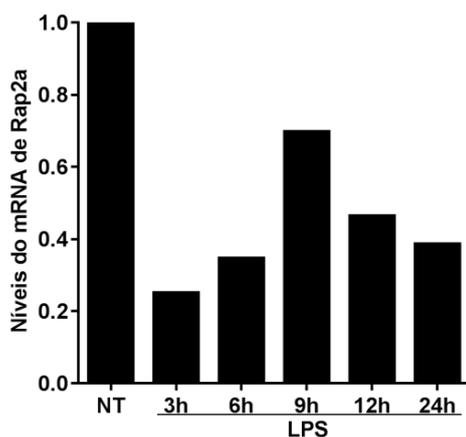


**Figura 8:** Os níveis do mRNA de Rap2a são alterados em macrófagos murinos de medula óssea (BMDMs) após estímulos com agonistas de TLRs. BMDMs foram estimulados com LPS (**a, d**; 100ng/mL), Pam3CSK4 (**b, e**; 100ng/mL) ou Poly:IC (**c, f**; 100µg/mL) por diferentes tempos como indicado na figura ou apenas com LPS por 2h em diferentes concentrações (**g**). Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2a (**a-c,g**), ou TNF-α (**d-f**). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (**a-c**). \*P<0.05; \*\*P<0.01; em relação ao não tratado (NT).

#### 5.4 Alteração nos níveis do mRNA de Rap2a em monócitos humanos (THP-1) estimulados com LPS

Nós também avaliamos os níveis do mRNA de Rap2a em células humanas ativadas por TLR. Para isso, células THP-1 foram estimuladas com LPS por diferentes intervalos de tempo. Os resultados sugerem que ocorre alteração na expressão de Rap2a nesta linhagem monocítica humana após o estímulo com LPS. Embora de natureza também transitente, o perfil diferiu do encontrado para células murinas, sobretudo nos intervalos de tempos tardios (figura 9). Logo após a estimulação em intervalos de 3h e 6h, observa-se que há expressiva redução nos níveis do mRNA de Rap2a, atingindo aproximadamente 80% de diminuição após 3h de tratamento. Após 9h de estímulo com LPS a expressão de Rap2a aumenta, embora ainda permaneça menor quando comparada às células não tratadas. Nos tempos de 12h e 24h, a expressão de Rap2a volta a sofrer redução.

Em conjunto, as alterações nos níveis do mRNA de Rap2a em diferentes células monocíticas indicam um possível envolvimento dessa molécula na função imunológica a partir de vias disparadas por TLRs.



**Figura 9: Alteração nos níveis do mRNA de Rap2a em monócitos humanos (THP-1) estimulados com LPS.** Monócitos humanos THP-1 foram estimuladas com LPS (100ng/mL) por diferentes tempos como indicado na figura. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2a. Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em

formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). NT = não tratado.

## 5.5 Análise de similaridade entre proteínas Rap

Antes de prosseguirmos com análises experimentais em macrófagos murinos, decidimos realizar análises *in silico* a fim de obter informações sobre o nível exato de identidade entre as proteínas Rap murinas (*Mus musculus*). Ainda, realizamos o alinhamento entre as proteínas Rap2a de origem humana e murina, e verificamos que existe alto nível de conservação entre as duas moléculas, apresentando 99,5% de identidade (figura 10a). De fato, há apenas um aminoácido de diferença entre as sequências humana e murina, em um ponto distante 50 aminoácidos da região CAAX de Rap2a.

Ao compararmos o alinhamento entre Rap2a, Rap1a e Rap1b, observamos que há 95,1% de sobreposição entre as proteínas Rap1 e cerca de 60% de alinhamento entre Rap2a e as proteínas Rap1 (figura 10b). No resultado da figura 10c, demonstramos que as proteínas Rap2b e Rap2c apresentam cerca de 90% de identidade com Rap2a, enquanto Rap2b e Rap2c apresentam sobreposição de 85,8% entre si. Além disso, geramos um cladograma por similaridade de sequências das Rap murinas. O cladograma resume graficamente os dados e demonstra menor proximidade evolutiva entre Rap2b e as demais Rap2 (figura 10d).

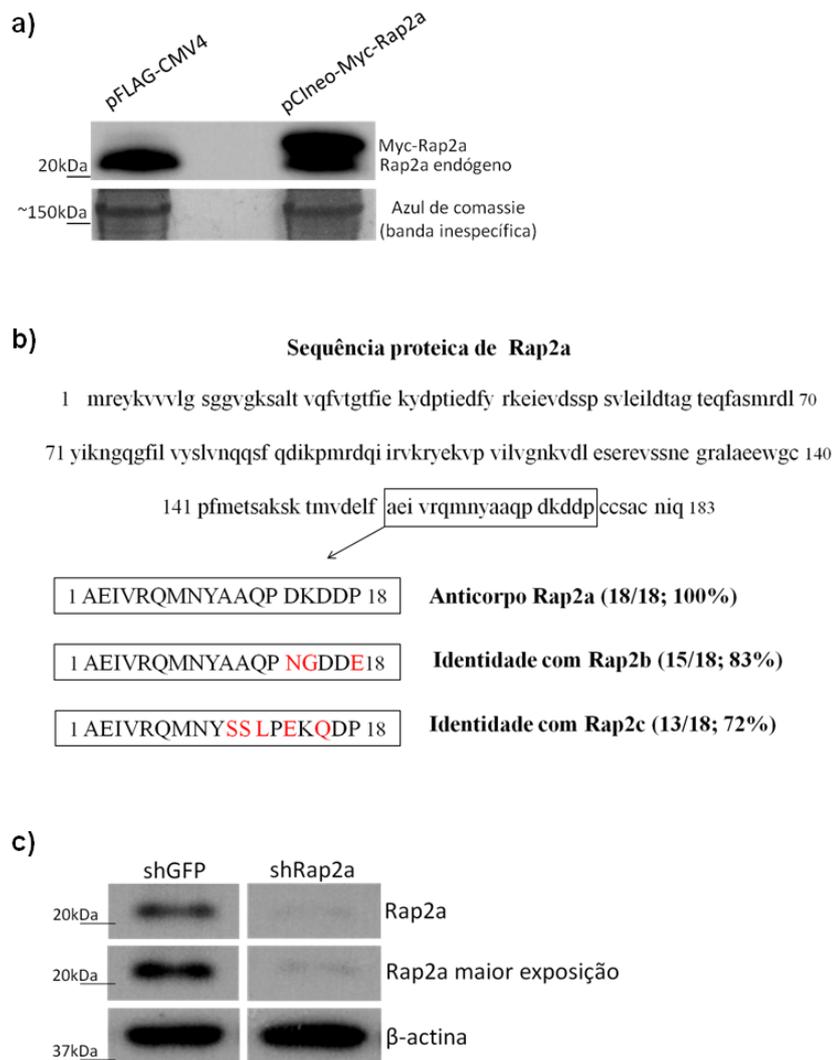


mais de duas proteínas (**b,c**), a sequência da linha mais inferior é a de menor similaridade com as demais.

## **5.6 Afinidade do anticorpo para detecção de Rap2a**

Dada a alta identidade de Rap2a e os outros membros Rap2, e para examinar as alterações em nível proteico de Rap2a em estudos subsequentes, nós examinamos a qualidade e especificidade do anticorpo anti-Rap2a, mesmo se tratando de um anticorpo comercial validado (tabela 4). Para tanto, foi realizado um ensaio de western blot (WB) a partir de dois extratos provenientes de células HEK293, sendo um deles relativo a células onde Rap2a fusionado a Myc foi superexpresso. Ao analisarmos a figura 11a, observamos a detecção de bandas na altura aproximada para Rap2a, que possui massa molecular de aproximadamente 21 kDa. Também é possível observar, para a respectiva amostra, uma banda de migração mais lenta e maior intensidade correspondente a Rap2a superexpresso, o que indica a afinidade do anticorpo por Rap2a. Ainda, realizamos o alinhamento da sequência imunogênica de 18 aminoácidos de Rap2a com as sequências dos demais membros da família Rap2 (Rap2b e Rap2c), devido ao fato de que a sequência de aminoácidos entre essas moléculas é bastante similar (como mostrado anteriormente). O alinhamento (figura 11b) mostra que, para esta região, há uma identidade de 83% para Rap2b, e 72% para Rap2c.

Para obter indícios sobre especificidade do anticorpo, nós obtivemos extratos celulares de macrófagos RAW264.7 que foram transfectados com shRNA de Rap2a. Ainda, shRNA GFP foi usado como controle negativo nas transfecções. O resultado de WB apresentado na figura 11c indica que nas células transfectadas com shRNA de GFP, mas não nas transfectadas com shRNA Rap2a, é detectada uma banda correspondente a 21 kDa relativo a Rap2a, sugerindo que o anticorpo não reconhece outros polipeptídeos de massa equivalente em macrófagos RAW264.7.



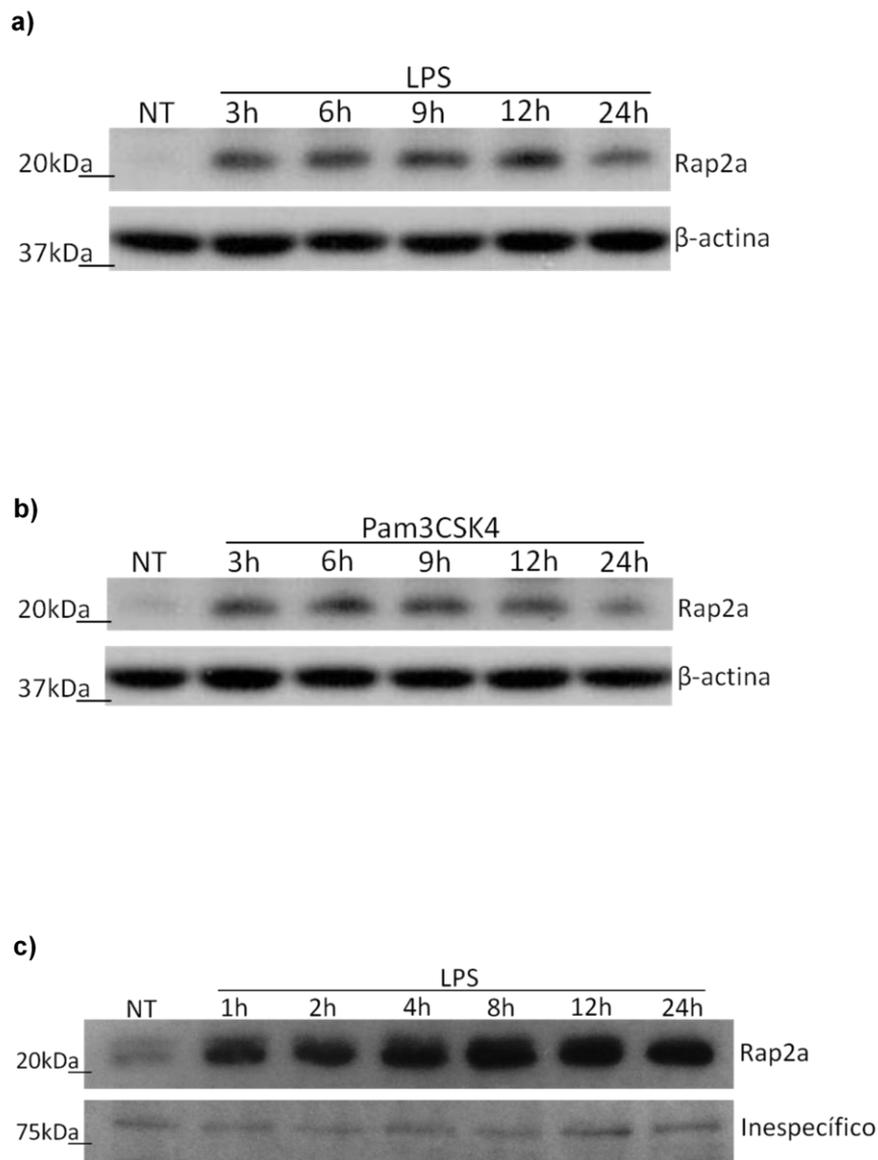
**Figura 11: Análise do anticorpo para detecção de Rap2a.** (a) Células HEK293 foram transfectadas com pFLAG-CMV4 ou plasmídeo para superexpressão de Rap2a (pCIneo-Myc-Rap2a) por 48h. As células foram lisadas e alíquotas de cada extrato foram submetidos a western-blot e analisados após exposição com anticorpo anti-Rap2a ou anti- $\beta$ -actina. (b) As sequências proteicas de Rap2a, Rap2b e Rap2c foram alinhadas com a sequência do anticorpo utilizado no presente estudo. A sequência referência de cada proteína foi obtida do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – EUA) e o alinhamento de sequências feito por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI. (c) Células RAW264.7 foram transfectadas com shRNA-GFP ou shRNA-Rap2a e 48h depois incubadas com meio de seleção contendo Puromicina (4 $\mu$ g/mL) por 10 dias. As células foram lisadas e uma alíquota de cada extrato foram submetidos a western-blot e analisados após exposição com anticorpo anti-Rap2a ou anti- $\beta$ -actina.

## **5.7 Ausência de correlação direta do perfil proteico de Rap2a com os níveis de mRNA observados em macrófagos estimulados com agonistas de TLRs**

Após constatarmos as diferenças nos níveis do mRNA de Rap2a em resposta aos tratamentos com agonistas de TLRs em macrófagos, nos perguntamos como estariam os níveis proteicos de Rap2a após estímulos com LPS. Para tanto, células RAW264.7 foram novamente estimuladas por diferentes intervalos de tempo e os extratos celulares submetidos a ensaio de western blot com anticorpo para detecção de Rap2a. O resultado demonstra que nos extratos provenientes de células não tratadas, os níveis de Rap2a encontram-se bastante reduzidos (figura 12a-c). De modo surpreendente, observamos que os níveis de Rap2a são elevados logo após o tratamento com LPS por 3 horas (figura 12a) e assim são mantidos em todos os tempos de estimulação quando comparado às células não tratadas, embora esses níveis pareçam diminuir após 24h de tratamento. O perfil de expressão proteica observado não apresenta uma correlação direta com os níveis de mRNA encontrados após os estímulos com LPS nos experimentos anteriores. Assim, decidimos averiguar também o perfil dos níveis proteicos de Rap2a em células RAW264.7 após estímulos com Pam3CSK4. De maneira semelhante ao encontrado para os estímulos com LPS, observamos um aumento nos níveis proteicos após os tratamentos com Pam3CSK4 (figura 12b).

Decidimos então reexaminar em um novo experimento os níveis de proteicos de Rap2a, porém investigando adicionalmente intervalos de tempo mais precoces após a estimulação com LPS, a saber 60 minutos e duas horas. O resultado (figura 12c) mostra que tão precoce quanto uma hora já se observa o acúmulo de Rap2a que se mantém elevado nos intervalos de tempo subsequentes, estendendo-se até 24 horas pós-estimulação, o que corrobora os resultados anteriores.

Embora não estejam diretamente correlacionados com os dados de RT-qPCR, os resultados de western blot demonstram alterações nos níveis proteicos de Rap2a após estímulos com agonistas de TLRs. Portanto, essas alterações reforçam a ideia que Rap2a esteja implicado na resposta celular de macrófagos disparada por TLRs.

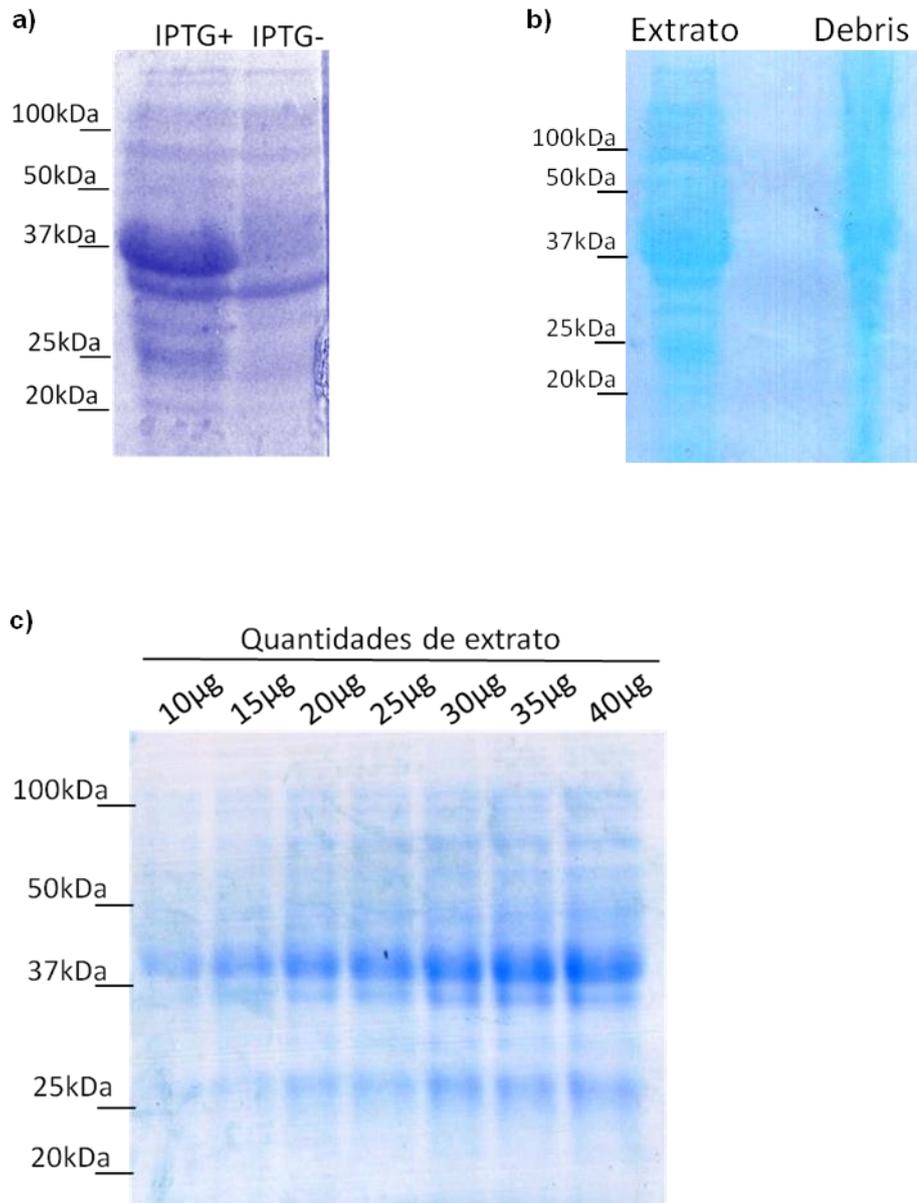


**Figura 12: Os níveis proteicos de Rap2a são alterados em macrófagos RAW264.7 após estímulos com agonistas de TLRs.** Células RAW264.7 foram estimuladas com LPS a 100ng/ml (**a**, **c**) ou Pam3CSK4 a 100ng/mL (**b**) por diferentes tempos como indicado na figura. As células foram lisadas e uma alíquota de cada extrato foi submetido a western-blot e analisado após exposição com anticorpo anti-Rap2a ou anti- $\beta$ -actina. Em (**a**) a figura é representativa de dois experimentos independentes. NT = não tratado.

## 5.8 Ativação de Rap2a em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS

Proteínas Ras-GTPases funcionam como interruptores moleculares e exercem suas funções após a dissociação de GDP e ligação à GTP, evento a partir do qual a molécula passa a ser considerada como ativa ou “ligada” (Goitre *et al.*, 2014). Logo, se Rap2a exerce um papel em vias de TLRs, precisa ser ativado para que cumpra suas funções nesse contexto. Uma maneira de investigar a ativação de Rap2a (assim como outras proteínas Rap) é explorar a interação seletiva dos domínios de ligação de uma molécula efetora com a conformação ativa da respectiva GTPase ligada ao GTP. Para determinar a atividade de Rap, o domínio RBD (*Ras Binding Domain*) de RalGDS fusionado a GST é adicionado aos extratos celulares para "capturar" o Rap-GTP, que é consequentemente detectado por Western blotting com anticorpo específico. Assim, em nosso trabalho, nós expressamos e purificamos o GST-RalGDS-RBD para os estudos de pull-down. Num primeiro momento, durante o crescimento das bactérias após a adição de IPTG, uma alíquota da cultura foi separada e lisada. Essa alíquota foi fracionada em gel de poliacrilamida juntamente com uma amostra referente a um lisado de bactérias não estimuladas com IPTG. Posteriormente, o gel foi corado com azul de comassie para marcação das proteínas. O resultado (figura 13a) mostra uma banda robusta de forma destacada em relação às demais marcações no gel na posição correspondente ao peso molecular de RalGDS-RBD fusionado a GST (cerca de 37kDa). Além disso, não há uma banda de mesma intensidade no controle não estimulado com IPTG. Sendo assim, o resultado mostra que a indução da expressão de GST-RalGDS-RBD ocorreu de modo eficaz nas bactérias.

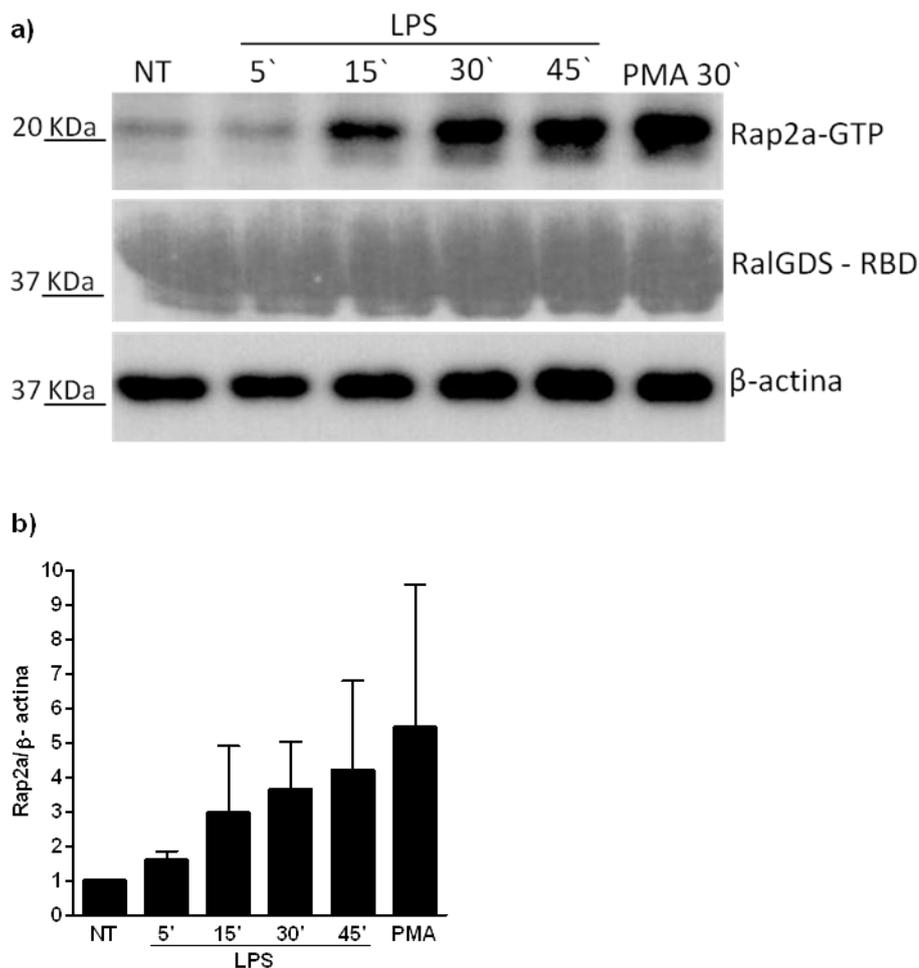
Ao final da obtenção, após a lise de toda a cultura e retirada dos debrís celulares, uma alíquota do lisado clarificado foi fracionada em gel de poliacrilamida juntamente com outra amostra correspondente aos debrís ressuspensos em tampão de lise (figura 13b). Ainda, o lisado clarificado foi quantificado por ensaio de Bradford e quantidades crescentes do mesmo foram fracionadas em um segundo gel (figura 13c). Novamente, após a coloração com azul de comassie, a presença de uma banda robusta na posição correspondente à proteína GST-RalGDS-RBD pode ser observada para o lisado clarificado nos dois géis (figura 13b,c). O resultado atesta a presença de GST-RalGDS-RBD no lisado e portanto o sucesso na obtenção da sonda utilizada nos ensaios de Pull-down.



**Figura 13: Obtenção de sondas GST-RalGDS-RBD para captura de Rap ligado a GTP.** (a) Foi realizada a transformação de plasmídeos pGEX6p1- RalGDS RBD em bactérias BL21 induzidas com IPTG (IPTG+). Durante o crescimento das bactérias uma alíquota foi lisada e fracionada em gel de acrilamida juntamente com outro lisado de bactérias não induzidas com IPTG (IPTG-). (b) Ao final de todos os procedimentos uma alíquota do lisado total clarificado foi fracionado em gel de poliácridamida juntamente com os debris ressuspensos em água para confirmar a presença da sonda GST-RalGDS-RBD. (c) Outra alíquota do lisado total clarificado foi quantificada e então diferentes quantidades foram fracionadas em gel de poliácridamida. Após os fracionamentos os géis (a,b,c) foram incubados com azul de comassie para detecção das proteínas e digitalizados.

Assim, para examinar a ativação de Rap2a na resposta imune, células RAW264.7 foram estimuladas com LPS e posteriormente lisadas para obtenção do extrato proteico, que foi utilizado para ensaio de pull-down e detecção de Rap2a por immunoblot com anticorpo específico anti-Rap2a. É bem estabelecido que a ativação de proteínas Ras de uma forma geral ocorre em períodos de minutos após os estímulos adequados. Após tempos precoces de estimulação com LPS (5 e 15 minutos), já é possível observar maiores quantidades de Rap2a ligado a GTP, sendo que a ativação é ainda mais evidente após 30 e 45 minutos de tratamento (figura 14a). Trabalhos anteriores (Franke *et al.*, 2000; Eppler *et al.*, 2017) demonstraram que Rap1, uma proteína similar a Rap2a, é ativada por PMA. Não é de nosso conhecimento a existência de registros na literatura que demonstrem ativação de Rap2a no mesmo contexto, logo, também foi realizado estímulo por 30 minutos com o mitógeno. O resultado mostra que Rap2a também é robustamente ativado por PMA (figura 14a).

Foi realizado também o fracionamento eletroforético do extrato total das amostras, a partir do qual fizemos um immunoblot para  $\beta$ -actina utilizado na normalização dos resultados de densitometria, que confirmam o perfil de ativação após os estímulos (figura 14b). Ainda, demonstramos na mesma figura, o controle das quantidades de RalGDS utilizadas no pull-down, atestando que as diferenças encontradas não têm a interferência de disparidades técnicas. Assim, demonstramos pela primeira vez, que Rap2a é uma molécula que sofre ativação durante a resposta imune inata disparada via TLR4 em macrófagos.

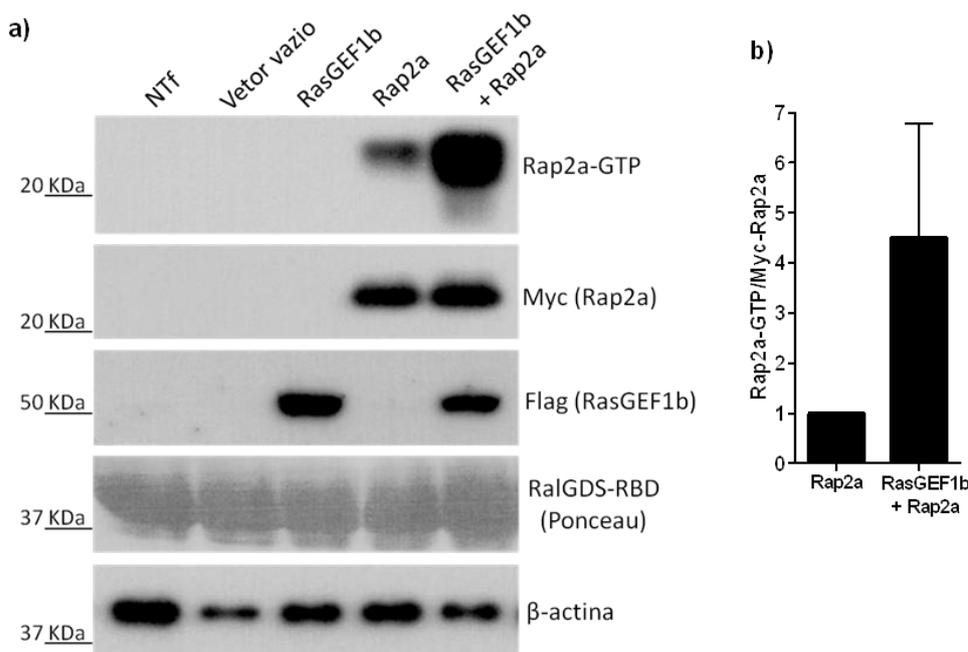


**Figura 14: Rap2a é ativado em macrófagos RAW264.7 após estímulos com LPS.** (a) Células RAW264.7 foram estimuladas com LPS (1µg/mL) ou PMA (100nM) pelos tempos indicados e posteriormente lisadas para obtenção do extrato proteico. O extrato foi então utilizado para ensaio de pull-down seguido de fracionamento em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de PVDF e detecção de Rap2a por *immunoblot*. A membrana foi corada com PonceauS para detecção de GST-RalGDS-RBD. Ainda, outro gel foi utilizado no fracionamento dos extratos totais para *immunoblot* de β-actina. (b) Foi realizada densitometria dos autorradiogramas por meio do programa ImageJ. Os valores obtidos para Rap2a foram normalizados pelas quantificações de β-actina e depois plotados em gráfico no *GraphPrism5.0*. Os valores são expressos como média ± desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes. NT = não tratado.

## **5.9 RasGEF1b é suficiente para induzir diretamente a ativação de Rap2a em células HEK293**

Abordagens bioquímicas anteriores demonstram que a troca de GDP por GTP para Rap2a ocorre por meio dos fatores de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1a e RasGEF1b (Yaman *et al.*, 2009). Ainda, demonstramos recentemente que a expressão de RasGEF1b em macrófagos é dominante sobre os membros RasGEF1 (Silva *et al.*, 2018). No entanto, é ainda desconhecido o papel celular de RasGEF1b na ativação de Rap2a. Assim, analisamos inicialmente a ativação direta de Rap2a por RasGEF1b ao conduzir estudos de superexpressão em células HEK293 (figura 15a-b). Observamos que a transfecção apenas com Myc-Rap2a resultou em estado ativado de Myc-Rap2a ligado a GTP capturado pelo ensaio de pull-down. Ademais, os níveis de Myc-Rap2a ativa ligada a GTP são mais elevados nos extratos de células co-transfectadas com Flag-RasGEF1b e Myc-Rap2a. Esse resultado sugere que RasGEF1b apresenta o atributo de induzir diretamente a ativação de Rap2a nas células testadas. Não foram detectados níveis de Rap2a ligada a GTP nos extratos de células transfectadas apenas com RasGEF1b, sugerindo baixos níveis de expressão de Rap2a em células HEK293.

Realizamos ainda análises dos níveis expressos de Myc-Rap2a e Flag-RasGEF1b a partir de western blot feito com os extratos totais e imunoblots para Flag e Myc. Pudemos então confirmar a superexpressão exógena de RasGEF1b e Rap2a repectivamente e ainda evidenciar as quantidades similares de superexpressão entre os grupos.

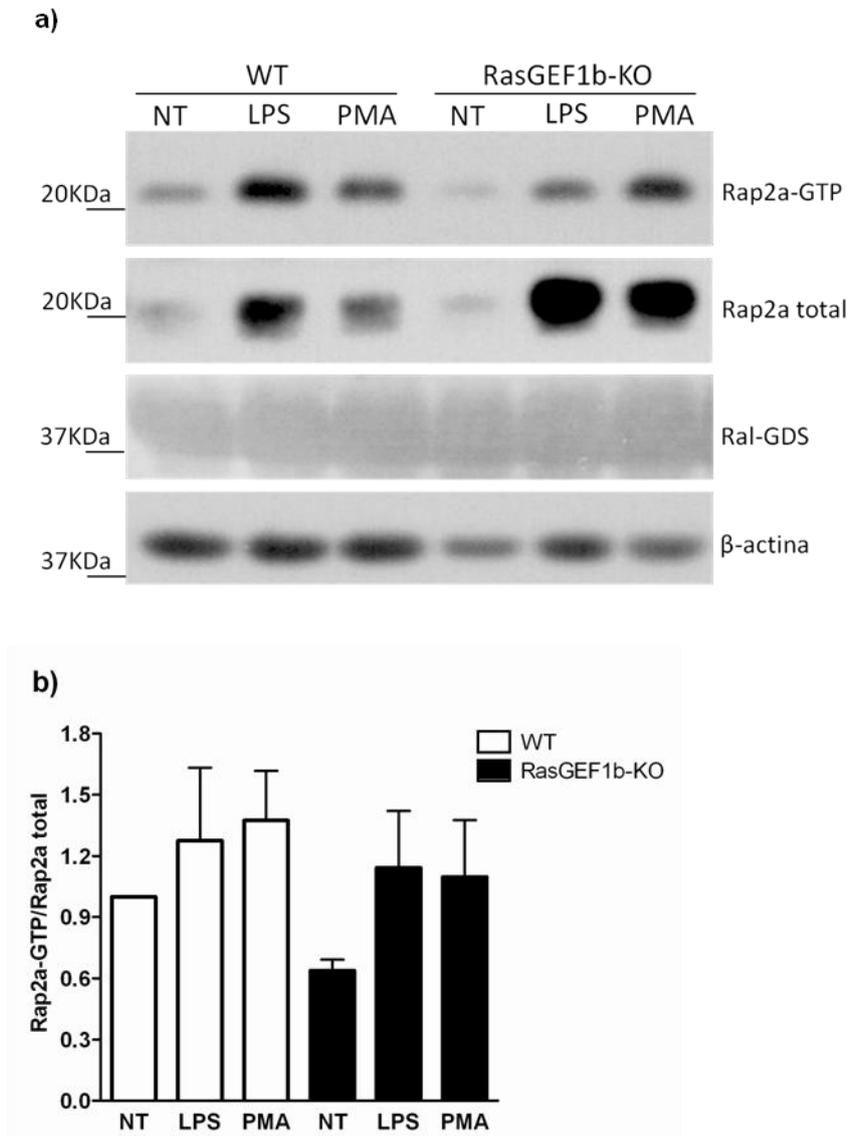


**Figura 15: RasGEF1b induz a ativação de Rap2a após superexpressão em células HEK293.** (a) Células HEK293 foram transfectadas com pFLAG-CMV4 (vetor vazio) ou com plasmídeo pcDNA3.1-Flag-RasGEF1b para superexpressão de RasGEF1b fusionado a Flag e/ou com plasmídeo pCIneo-Myc-Rap2a para superexpressão de Rap2a fusionado a Myc. Após 24h as células foram lisadas para obtenção do extrato proteico que foi utilizado para ensaio de pull-down seguido de fracionamento em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de PVDF e detecção de Rap2a por *immunoblot*. A membrana foi corada com PonceauS para detecção de GST-RalGDS-RBD. Ainda, outro gel foi utilizado no fracionamento dos extratos totais para *immunoblot* de Myc, Flag e β-actina. (b) Foi realizada densitometria dos autorradiogramas por meio do programa ImageJ. Após as correções pelas quantidades de β-actina foi realizada a normalização de Rap2a-GTP pelas quantidades de Myc-Rap2a. Os valores obtidos foram plotados em gráfico no *GraphPrism5.0* e são expressos como média ± desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes. NTf = não trasfectado.

## 5.10 RasGEF1b contribui parcialmente para a ativação de Rap2a em BMDMs estimulados com LPS

Resultados de superexpressão obtidos no presente trabalho validaram em um modelo de cultura de células (HEK293) achados anteriores (Yaman *et al.*, 2009) que sugeriam RasGEF1b como um ativador de Rap2a. Ainda, demonstramos neste trabalho que Rap2a é uma molécula que é ativada em macrófagos RAW264.7 após estimulação com LPS ou PMA. Logo, decidimos investigar se a ativação de Rap2a é dependente de RasGEF1b nesse contexto. Com essa finalidade, BMDMs selvagens (WT, *Wild Type*) ou desprovidos de RasGEF1b (KO, *knockouts*) foram estimulados por 30 minutos com LPS ou PMA e a partir dos extratos proteicos foram realizados novos ensaios de pull-down e western blot a fim de apurar os níveis de ativação de Rap2a. Os resultados revelam que Rap2a é ativado após os estímulos nos BMDMs selvagens e que a ativação de Rap2a após o estímulo por LPS é apenas reduzida nos macrófagos nocautes de RasGEF1b (figura 16a). O resultado de densitometria após a correção pela  $\beta$ -actina e normalização pelas quantidades totais de Rap2a, confirmam esse perfil e sugerem que os níveis de ativação por PMA também diminuem nas células desprovidas de RasGEF1b (figura 16b).

Em conjunto, os resultados de superexpressão em células HEK293 e os resultados obtidos em BMDMs RasGEF1b-KO indicam que a ativação de Rap2a após o tratamento com LPS é parcialmente dependente de RasGEF1b.



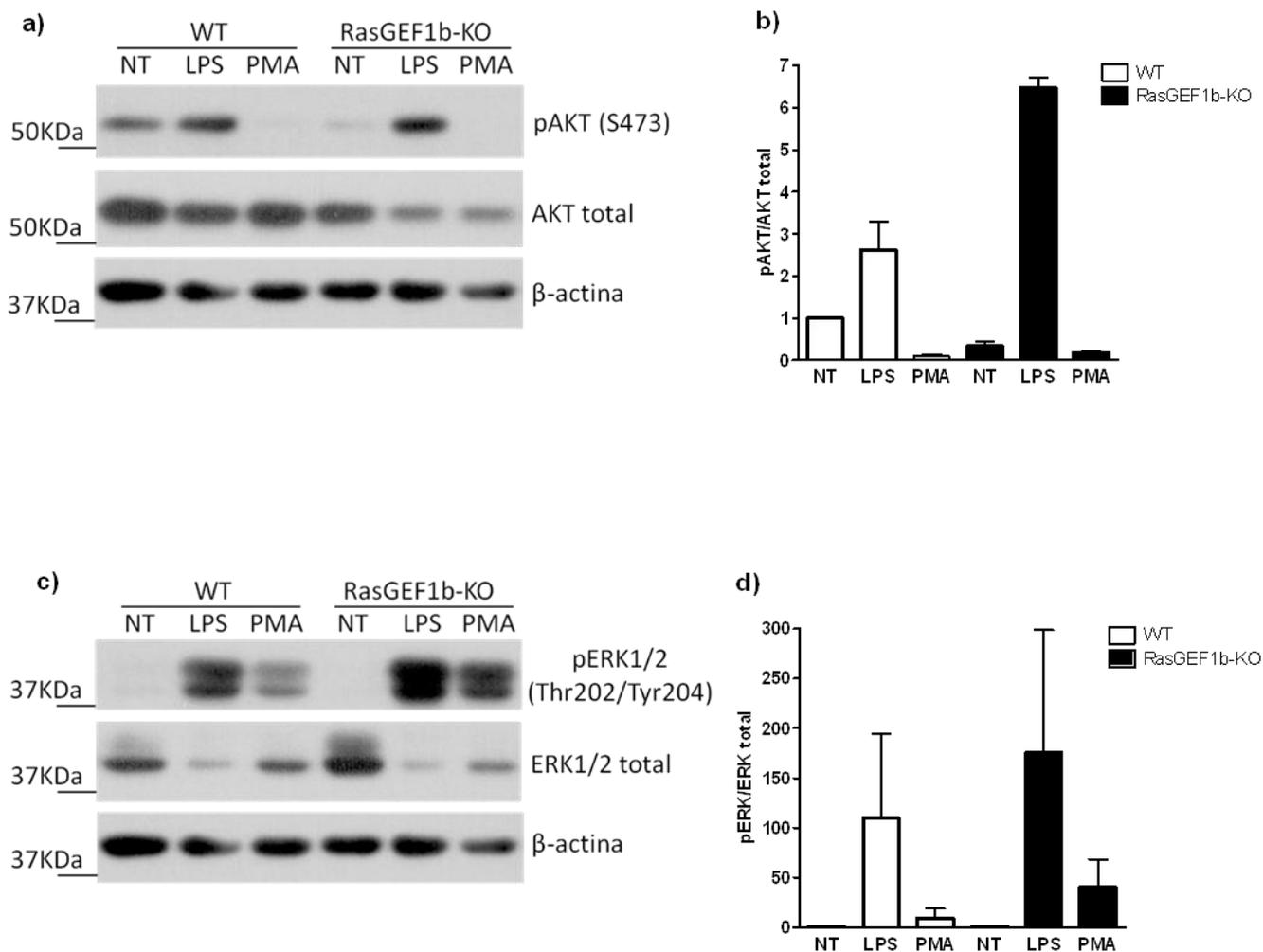
**Figura 16: RasGEF1b contribui parcialmente para a ativação de Rap2a em BMDMs estimulados com LPS.** (a) BMDMs selvagens (WT) ou nocautes de RasGEF1b (RasGEF1b-KO) foram estimulados com LPS (1 $\mu$ g/mL) ou PMA (100nM) por 30 minutos e posteriormente lisados para obtenção do extrato proteico. O extrato foi utilizado para ensaio de pull-down seguido de fracionamento em gel de poliacrilamida, transferência para membrana de PVDF e detecção de Rap2a por *immunoblot*. A membrana foi corada com PonceauS para detecção de GST-RalGDS-RBD. Ainda, outro gel foi utilizado no fracionamento dos extratos totais para *immunoblot* de Rap2a total e  $\beta$ -actina. (b) Foi realizada densitometria dos autorradiogramas por meio do programa ImageJ. Após as correções pelas quantidades de  $\beta$ -actina foi realizada a normalização de Rap2a-GTP pelas quantidades de Rap2a total. Os valores obtidos foram plotados em gráfico no *GraphPrism5.0* e são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes. NT = não tratado.

### **5.11 Ativação de AKT e ERK após estímulos com LPS e PMA em BMDMs desprovidos de RasGEF1b**

É extensamente documentado que após a ativação das proteínas Ras por seus respectivos GEFs, estas agem principalmente sobre as vias PI3K/AKT e Raf/MEK/ERK (Simanshu *et al.*, 2017). Assim, diante das evidências fornecidas até o momento implicando RasGEF1b na ativação de Rap2a, nós analisamos os níveis de fosforilação das cinases AKT e ERK em células desprovidas de RasGEF1b tratadas com LPS ou PMA.

A partir da imagem do autorradiograma (figura 17a), é possível notar uma diminuição nos níveis de AKT fosforilado (pAKT-S473) nas células RasGEF1b-KO não tratadas, enquanto um aumento discreto em sua intensidade é observado nos macrófagos RasGEF1b-KO tratados com LPS quando comparado com os macrófagos WT. Após a correção pela  $\beta$ -actina e normalização a partir das quantidades totais de AKT obtidas de réplicas biológicas, o resultado sugere níveis elevados de AKT fosforilado nas células RasGEF1b-KO estimuladas com LPS (figura 17b), relativamente às quantidades totais de AKT. Ainda, não foi observada fosforilação de AKT quando os macrófagos WT e RasGEF1b-KO foram tratados com PMA.

Nas figuras 17c e 17d, é possível observar um aumento nos níveis de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2 –Thr202/Tyr204) nas células RasGEF1b nocautes em relação às células selvagens para os dois estímulos testados (LPS e PMA). Os níveis totais de ERK1/2 encontram-se reduzidos de forma inversamente proporcional aos níveis de ERK1/2 ativado.

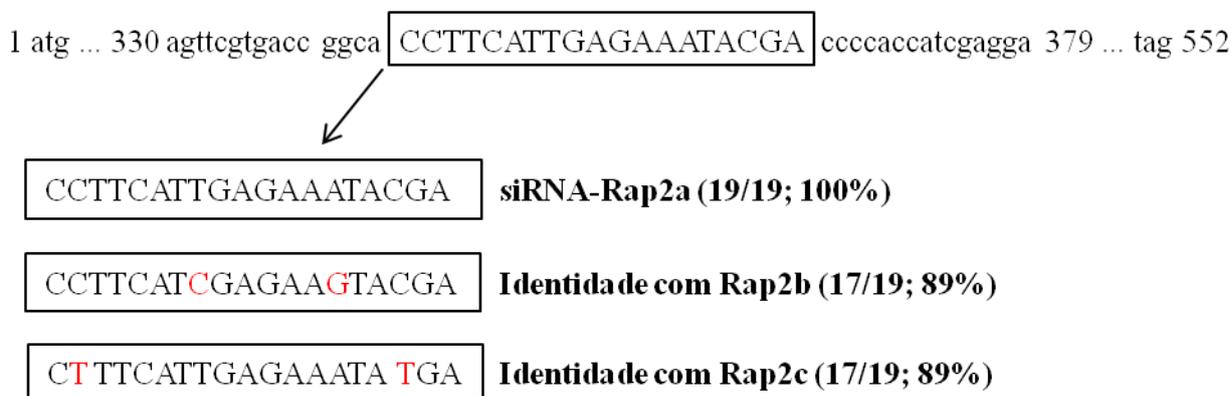


**Figura 17: Ativação de AKT e ERK após estímulos com LPS e PMA em BMDMs desprovidos de RasGEF1b.** BMDMs selvagens (WT) ou nocautes de RasGEF1b (RasGEF1b-KO) foram estimulados com LPS (1 $\mu$ g/mL) ou PMA (100nM) por 30 minutos. As células foram lisadas e uma alíquota de cada extrato foi submetido a fracionamento em gel de poliácridamida e transferência para membrana de PVDF. Em (a) foram realizadas exposições aos anticorpos anti-fosfo-AKT (pAKT) ou anti-AKT total ou anti- $\beta$ -actina. Em (c) foram realizadas exposições aos anticorpos anti-fosfo-ERK (pERK) ou anti-ERK total ou anti- $\beta$ -actina. Gráficos de densitometria em (b) e (d) foram gerados para os western blots realizados em (a) e (c) respectivamente. As densitometrias foram realizadas por meio do programa ImageJ. Após as correções pelas quantidades de  $\beta$ -actina foram realizadas as normalizações das proteínas fosforiladas (pAKT e pERK) pelas quantidades das proteínas totais (AKT e ERK, respectivamente). Os valores obtidos foram plotados em gráficos no *GraphPrism5.0* e são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes. NT = não tratado.

## 5.12 Os níveis do mRNA de mediadores inflamatórios não sofrem alterações em MEFs transfectadas com siRNA-Rap2a

As evidências verificadas até este ponto indicam que Rap2a esteja implicado em vias de sinalização de macrófagos iniciadas em TLRs. Logo, decidimos examinar a função de Rap2a nesse contexto por meio do silenciamento dessa molécula. Para tanto, realizamos transfecções transientes utilizando-se RNA de interferência (siRNA) com sequência específica para Rap2a (figura 18).

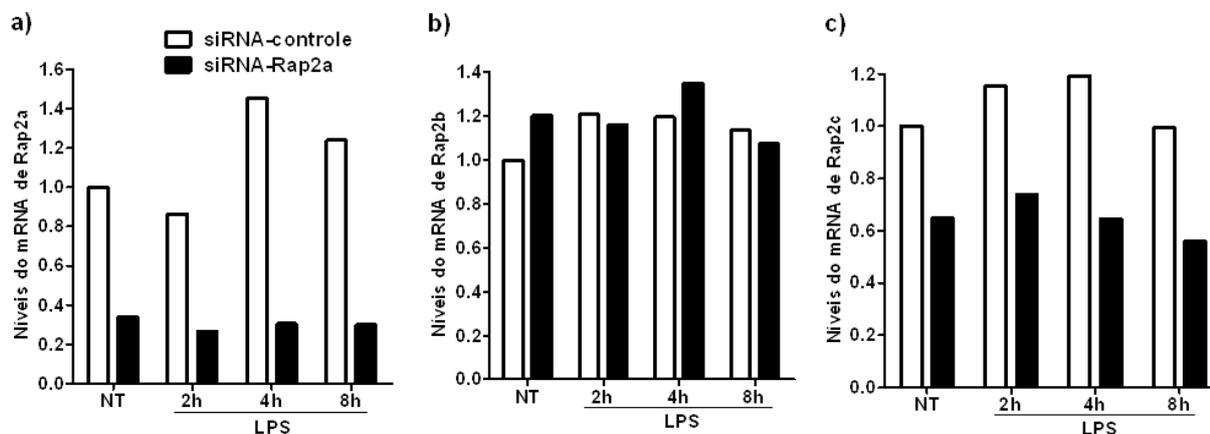
### Sequência parcial da região codificadora de Rap2a murino



**Figura 18: Alinhamento das sequências nucleotídicas de Rap2 com o siRNA utilizado no presente estudo.** As sequências nucleotídicas das regiões codificadoras de Rap2a, Rap2b e Rap2c foram alinhadas com a sequência do siRNA utilizado no presente estudo. A sequência referência de cada molécula foi obtida do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – EUA) e o alinhamento de sequências feito por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI.

Experimentos preliminares foram realizados em fibroblastos murinos (MEFs) transfectados com siRNA-Rap2a ou siRNA-controle e posteriormente estimulados com LPS por diferentes tempos. Em seguida, foram realizadas RT-qPCRs para os três membros da família Rap2. O gráfico apresentado na figura 19a mostra que o siRNA-Rap2a foi capaz de diminuir em cerca de 60% os níveis do mRNA de Rap2a em comparação com o siRNA-controle. Os níveis do mRNA de Rap2b não foram alterados

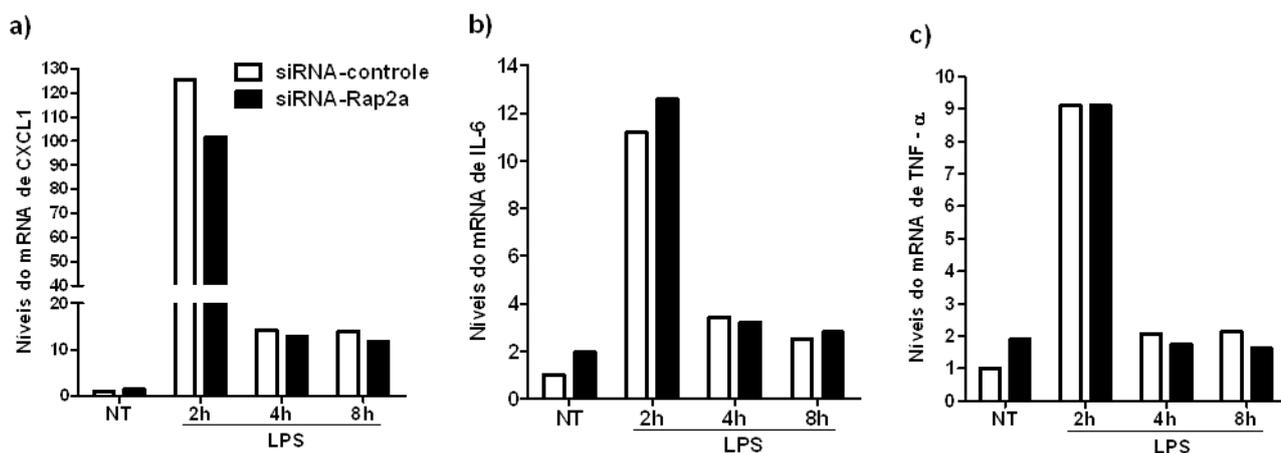
(figura 19b), enquanto os níveis do mRNA de Rap2c diminuíram cerca de 35% nas células silenciadas para Rap2a em comparação àquelas transfectadas com siRNA-controle (figura 19c).



**Figura 19: Níveis de mRNA dos membros do grupo Rap2 em fibroblastos transfectados com siRNA-Rap2a.** Células MEF-SV40 foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a a 100nM por 48h e após este tempo foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) pelos tempos indicados. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2a (a), Rap2b (b) ou Rap2c (c). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Em estudos conduzidos no nosso laboratório, temos observado que RasGEF1b pode estar implicado na expressão de CXCL1 em macrófagos murinos estimulados com agonistas de TLRs (Silva *et al.*, 2018). Evidências aqui apresentadas até o momento indicaram que RasGEF1b é um ativador de Rap2a, que por sua vez é ativado em macrófagos estimulados com LPS. Portanto, realizamos RT-qPCRs para amplificação de CXCL1 nas mesmas amostras de MEFs transfectadas com siRNA-Rap2a. CXCL1 é uma quimiocina imediatamente expressa após estímulos inflamatórios. No gráfico da figura 20a, observamos forte indução da expressão de CXCL1 logo após duas horas de tratamento com LPS e verificamos que essa indução é reduzida nas células transfectadas com siRNA-Rap2a em relação às células transfectadas com siRNA-controle. Para os demais tempos de estímulo, mais tardios, observa-se robusta queda na expressão de

CXCL1, embora ainda com algum nível de indução em relação às células não estimuladas. Averiguamos também os níveis de IL-6 e TNF, duas importantes citocinas precocemente induzidas na resposta inflamatória. Como esperado, observamos a indução na expressão dessas moléculas após os estímulos com LPS, o que ocorre de forma mais intensa no tempo mais precoce de tratamento (figuras 20b,c). Entretanto, não foram observadas diferenças expressivas nos níveis do mRNA de IL-6 ou TNF entre as células silenciadas de Rap2a e os grupos controle após os estímulos com LPS (figuras 20b,c).

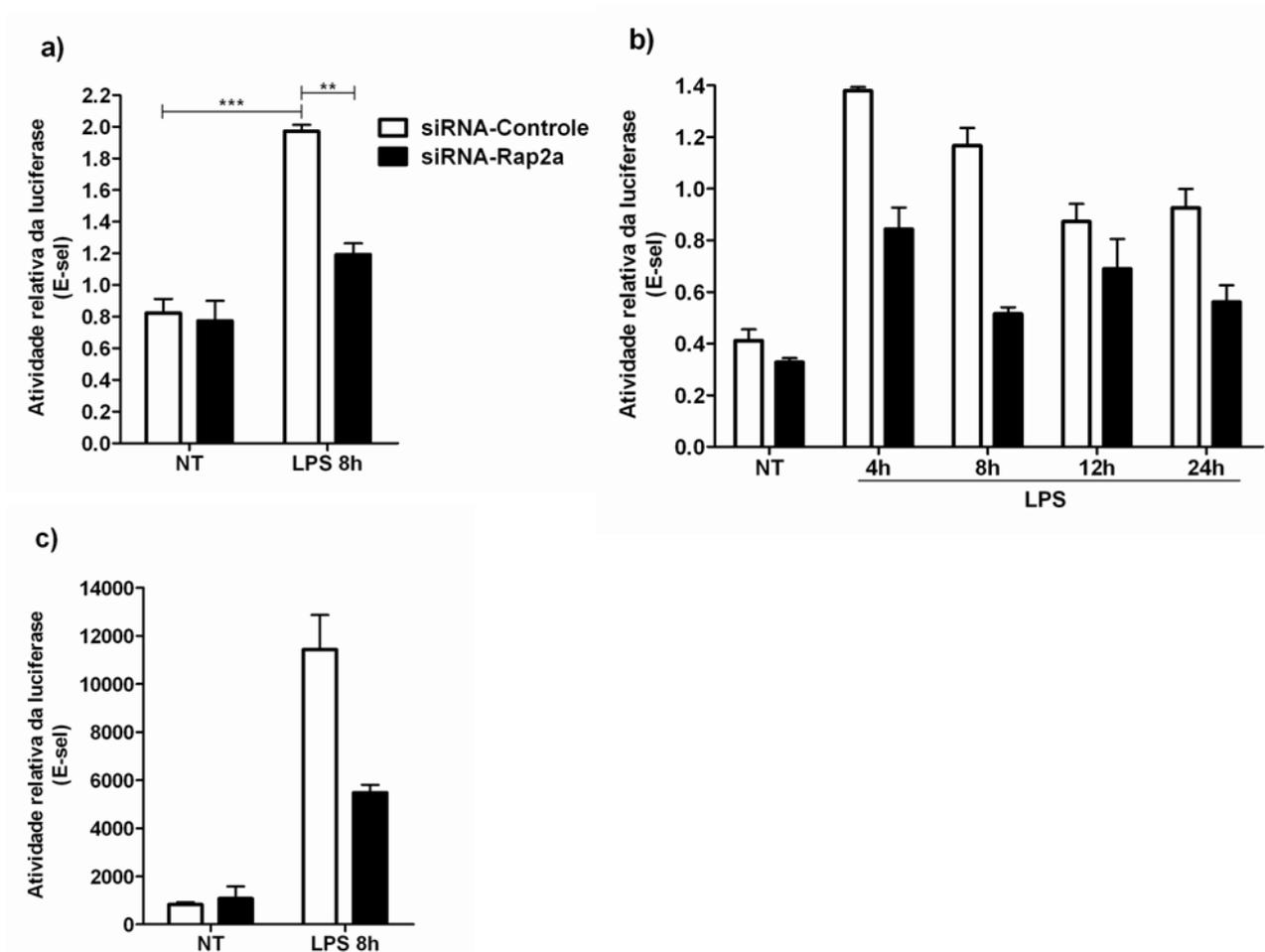


**Figura 20: Níveis do mRNA de mediadores inflamatórios em fibroblastos transfectados com siRNA-Rap2a.** Células MEF-SV40 foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a a 100nM por 48h e após este tempo foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) pelos tempos indicados. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de CXCL1 (a), IL-6 (b) ou TNF- $\alpha$  (c). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

### **5.13 A ativação de NF- $\kappa$ B induzida por LPS é reduzida em macrófagos RAW264.7 transfectados com siRNA-Rap2a**

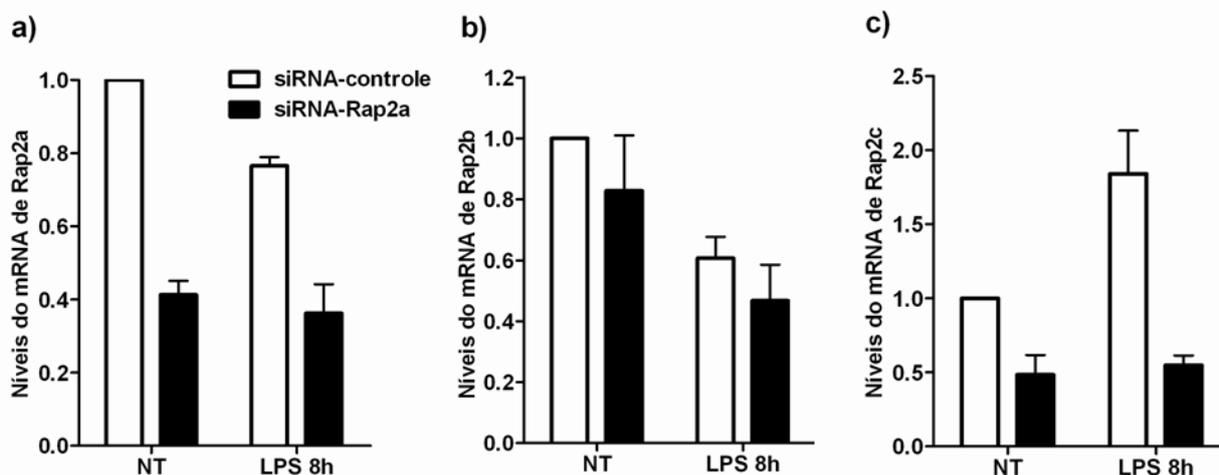
Em seguida, decidimos investigar os níveis de ativação de um fator de transcrição central na resposta inflamatória, o NF- $\kappa$ B, em macrófagos RAW264.7 transfectados com siRNA-Rap2a. Após a transfecção de plasmídeos repórter para a atividade de NF- $\kappa$ B juntamente com o siRNA-Rap2a, os macrófagos foram estimulados com LPS por 8h. O resultado mostra que a indução da ativação de NF- $\kappa$ B gerada nos grupos estimulados com LPS é significativamente reduzida nas células transfectadas com siRNA-Rap2a quando comparadas ao grupo com siRNA-controle (figura 21a). Assim, nos perguntamos se a mesma alteração ocorreria após diferentes tempos de estimulação com o mesmo agonista (LPS). O gráfico da figura 21b mostra que há diminuição expressiva nos níveis de ativação de NF- $\kappa$ B nas células siRNA-Rap2a para todos os tempos de estímulo testados, chegando a quase 60% de redução após 8 horas de tratamento com LPS em comparação com as células transfectadas com siRNA-controle.

Ademais, para descartar a possibilidade de artefatos técnicos devido às tranfecções do plasmídeo repórter, também realizamos experimentos em células RAW264.7- $\kappa$ B-luc, que possuem o repórter de NF- $\kappa$ B de maneira estável. O resultado confirma que a atividade de NF- $\kappa$ B é reduzida em células transfectadas com siRNA-Rap2a e tratadas com LPS (figura 21c).



**Figura 21:** A ativação de NF- $\kappa$ B induzida por LPS é reduzida em macrófagos RAW264.7 transfectados com siRNA-Rap2a. (a,b) Células RAW264.7 foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a juntamente com os plasmídeos repórteres pGL3-E-sel e pRL-TK por 48 horas, e então estimuladas com LPS (100ng / ml) pelos tempos indicados na figura. (c) Células RAW264.7- $\kappa$ B-luc foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a por 48 horas e então estimuladas com LPS (100ng / ml) por 8h. Ao final dos experimentos a atividade de luciferase foi medida em luminômetro. Os resultados são apresentados como atividades relativas da luciferase de vagalume normalizadas pelas atividades de luciferase de (a, b) *Renilla* ou (c) pela a quantidade total de proteínas nos lisados. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de (b,c) duas ou (a) três réplicas independentes. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . NT=não tratado.

Avaliamos ainda os níveis de expressão dos mRNAs de Rap2 nas células RAW264.7- $\kappa$ B-luc. De forma semelhante ao observado anteriormente em MEFs, verificamos o *knockdown* de Rap2a (figura 22a) acompanhado de redução nos níveis de Rap2c (figura 22c). Além disso, não detectamos alterações expressivas nos níveis de Rap2b (figura 22b)

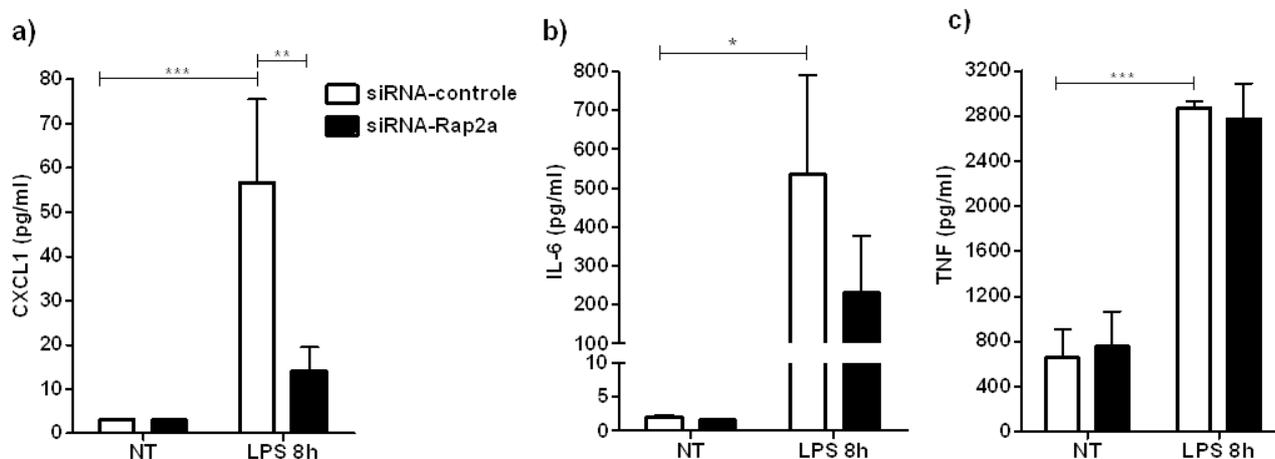


**Figura 22: Níveis de expressão dos mRNAs de Rap2 em células RAW264.7- $\kappa$ B-Luc transfectadas com siRNA-Rap2a.** Células RAW264.7- $\kappa$ B-luc foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a por 48 horas e então estimuladas com LPS (100ng / ml) por 8h. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de Rap2a (a), Rap2b (b) ou Rap2c (c). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes.

#### 5.14 A produção de mediadores inflamatórios é alterada em células RAW264.7- $\kappa$ B-luc transfectadas com siRNA-Rap2a

A molécula de NF- $\kappa$ B regula a transcrição de diversos fatores inflamatórios. Assim, utilizamos os sobrenadantes coletados das células RAW264.7- $\kappa$ B-luc nas quais confirmamos o silenciamento de Rap2a (figura 22a) para avaliar os níveis de CXCL1, IL-6 e TNF por ensaio de ELISA. Como esperado, observamos o aumento na produção

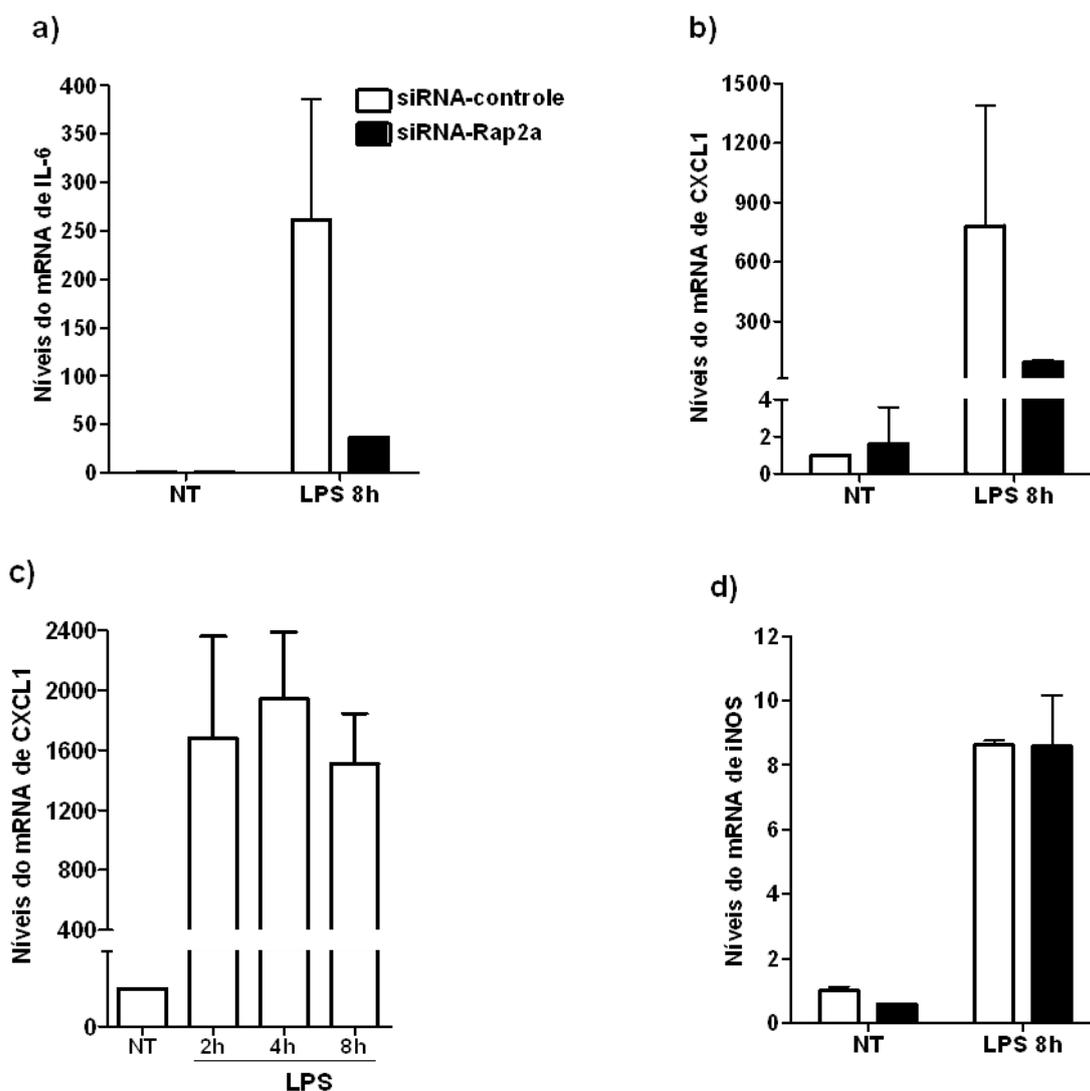
dessas moléculas após o tratamento com LPS (figura 23a-c). O resultado de ELISA para CXCL1 mostra que a indução dessa quimiocina é significativamente menor nas células transfectadas com siRNA-Rap2a após o tratamento com LPS (figura 23a). De forma semelhante, verificamos a redução nos níveis proteicos de IL-6 ao compararmos as células silenciadas com aquelas do grupo controle (figura 23b). Não detectamos diferenças na produção de TNF- $\alpha$  entre as células transfectadas com siRNA-Rap2a e aquelas transfectadas com siRNA-controle.



**Figura 23: A produção de mediadores inflamatórios é alterada em células RAW264.7- $\kappa$ B-luc transfectadas com siRNA-Rap2a.** Células RAW264.7- $\kappa$ B-luc foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a por 48 horas e então estimuladas com LPS (100ng / ml) por 8h. Ao final das estimulações os sobrenadantes foram coletados e utilizados em ensaios de ELISA para a quantificação dos níveis de CXCL1 (a), IL-6 (b), TNF- $\alpha$  (c). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de três réplicas independentes. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. NT=não tratado.

Ainda, a fim de averiguar se as diferenças observadas para a produção IL-6 e CXCL-1 se tratam de um reflexo dos níveis do mRNA, realizamos análises de RT-qPCR para essas moléculas. Assim, observamos que os níveis dos mRNAs de IL-6 e CXCL-1 também se encontram reduzidos nos grupos transfectados com siRNA-Rap2a (figura 24a,b). Apesar de CXCL-1 ser uma quimiocina induzida de forma bastante precoce, demonstramos ainda que os níveis de seu mRNA se mantêm elevados mesmo após 8h de estímulo em células RAW264.7 que expressam Rap2a normalmente (figura

24c). Ademais, averiguamos os níveis do mRNA de iNOS, uma molécula produzida mais tardiamente após estímulos inflamatórios, e verificamos que não há alterações nos níveis dessa molécula nas células transfectadas com siRNA-Rap2a (figura 24d).



**Figura 24: Os níveis do mRNA de mediadores inflamatórios são alterados em células RAW264.7-κB-luc transfectadas com siRNA-Rap2a.** Células RAW264.7-κB-luc foram transfectadas com siRNA-controle ou siRNA-Rap2a por 48 horas e então estimuladas com LPS (100ng / ml) por 8h. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito em cDNA que foi utilizado como molde em reações de RT-qPCR para a amplificação específica de IL-6 (a), CXCL1 (b,c) ou iNOS (c). Rpl32 também foi amplificado e os valores de Ct utilizados na normalização dos resultados. Ao final das reações os dados foram salvos em formato Microsoft Excel para análise da abundância relativa do mRNA através da equação de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Os valores são

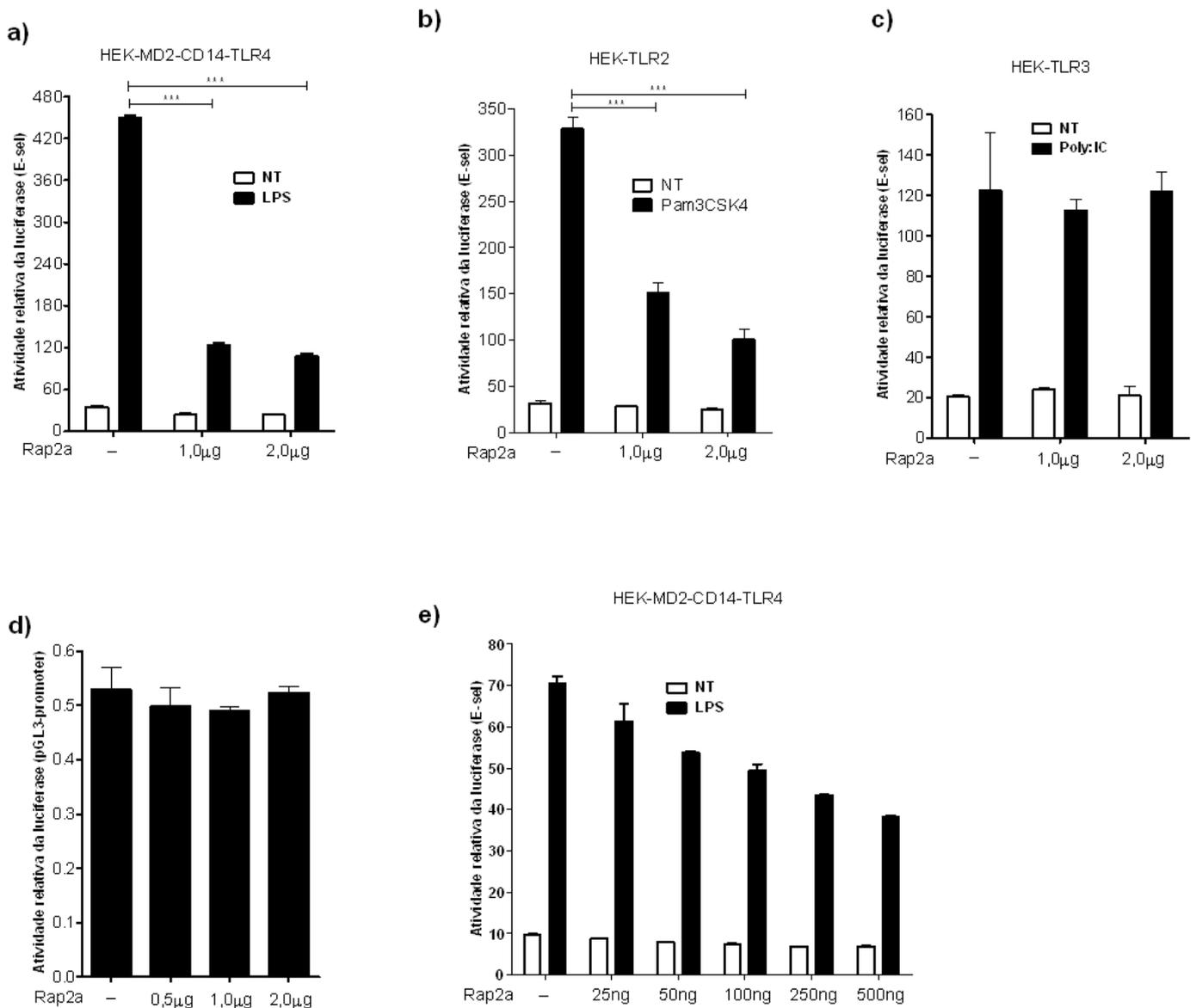
expressos como média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de duas réplicas independentes. NT=não tratado.

### **5.15 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por agonistas de TLRs em células HEK293**

A fim de nos aprofundarmos nos estudos funcionais de Rap2a sobre a atividade de NF- $\kappa$ B, realizamos experimentos de gene repórter em células HEK293 transfectadas com plasmídeo para superexpressão de Rap2a. Além do gene repórter e de diferentes quantidades do plasmídeo para superexpressão de Rap2a foram transfectados diferentes TLRs a saber: TLR2, ou TLR3, ou TLR4/MD2/CD14. As células foram então estimuladas com os respectivos agonistas para cada TLR.

Nas células que foram transfectadas apenas com TLR4/MD2/CD14 e posteriormente tratadas com LPS, houve uma ativação significativa de NF- $\kappa$ B (figura 25a). No entanto, de forma intrigante e em contrário ao esperado, quando Rap2a foi co-transfectado nas células HEK293, e posteriormente tratadas com LPS, essa ativação foi diminuída, chegando a quase 80% de redução na ativação de NF- $\kappa$ B para o grupo transfectado com maior quantidade de Rap2a quando comparamos ao grupo tratado onde não há superexpressão de Rap2a (figura 25a). Um efeito semelhante ocorre ao avaliarmos o impacto da superexpressão de Rap2a nos níveis de ativação de NF- $\kappa$ B induzidos por Pam3CSK4 nas células transfectadas com TLR2. O resultado sugere que ocorre uma redução na ativação de NF- $\kappa$ B de forma dependente da concentração de Rap2a (figura 25b). Num terceiro experimento, avaliamos o efeito de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por Poly:IC nas células transfectadas com TLR3. Ocorreu ativação expressiva de NF- $\kappa$ B após o estímulo com Poly:IC (figura 25c). No entanto, não houve diferenças na ativação de NF- $\kappa$ B entre células que foram transfectadas com Rap2a e aquelas onde Rap2a não foi superexpresso, diferentemente do que foi observado nos experimentos realizados com LPS e Pam3CSK4 (figura 25 a,b). Para eliminar a possibilidade de que a expressão forçada em altos níveis de Rap2a perturbe de alguma maneira a síntese proteica celular, realizamos um experimento controle no qual transfectamos o plasmídeo para superexpressão de Rap2a juntamente com um plasmídeo que expressa a luciferase de forma constitutiva (pGL3-promoter). Assim, determinamos que a atividade de luciferase permanece intacta nos grupos transfectados

com Rap2a, indicando que a interferência de Rap2a detectada nos experimentos anteriores ocorre especificamente sobre a atividade de NF-κB reportada pelo promotor de E-selectina (figura 25d). Ainda, demonstramos no gráfico da figura 25e, que Rap2a reduz a ativação de NF-κB mesmo quando transfectado em baixas quantidades e de forma concentração-dependente após o estímulo com LPS.

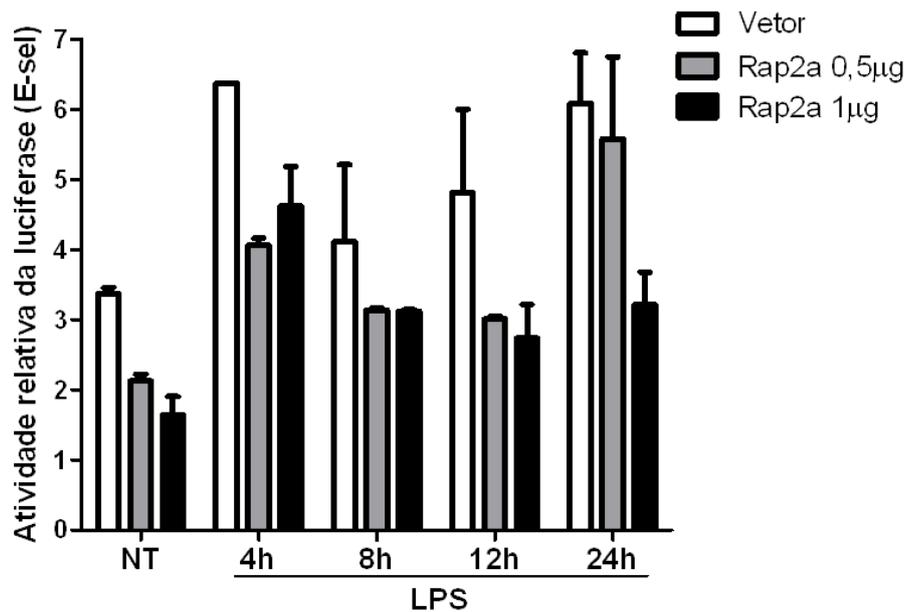


**Figura 25:** A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por agonistas de TLR4 e TLR2 em células HEK293. Células HEK293 foram transfectadas com preparações de plasmídeos endofree de (a,e) MD2,CD14 e TLR4 ou (b) TLR2 ou (c) TLR3 juntamente com os repórteres de pGL3-E-sel e pRL-TK em combinação com diferentes quantidades de pFLAG-CMV4 (vetor) ou pCIneo-Myc-Rap2a, conforme indicado. Vinte e quatro horas após as transfecções, as células foram estimuladas com

(a,e) LPS (1µg / ml) ou (b) Pam3CSK4 (100ng/mL) ou (c) Poli:IC (100 µg/mL) por 18 horas. (d) As células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos pGL3-promoter e pRL-TK em combinação com diferentes quantidades de pCIneo-Myc-Rap2a conforme indicado. Vinte e quatro horas após a transfecção, os extratos celulares foram coletados. (a-e) A atividade de luciferase foi determinada em luminômetro. As quantidades de DNA foram mantidas constantes em todos os experimentos. Os resultados são mostrados como atividade relativa da luciferase de vaga-lume normalizadas em relação às atividades da luciferase de *Renilla*. Os dados representam média ± desvio padrão de duas (d,e) ou três (a-c) réplicas independentes. \*\*\*P<0.001. NT=não tratado.

### **5.16 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por LPS em macrófagos RAW264.7**

Com o intuito de confirmar a interferência gerada pela superexpressão de Rap2a na atividade de NF-κB em macrófagos, células RAW264.7 foram transfectadas com o gene repórter e duas diferentes quantidades de Rap2a. Após estímulos com LPS por diferentes tempos, verificamos que a ativação de NF-κB também é diminuída em células RAW264.7 nas quais Rap2a é superexpressa (figura 26). De forma interessante, mesmo os níveis basais de NF-κB das células não tratadas são reduzidos nos grupos transfectados com Rap2a.



**Figura 26: A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por LPS em macrófagos RAW264.7.** Células RAW264.7 foram transfectadas com os plasmídeos repórter pGL3-E-Sel e pRL-TK juntamente com pFLAG-CMV4 (vetor vazio) ou quantidades crescentes de pCIneo-Myc-Rap2a. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram estimuladas com LPS (100ng / ml) por 18 horas. Ao final do experimento a atividade de luciferase foi medida em um luminômetro. As quantidades de DNA foram mantidas constantes nos experimentos. Os resultados são mostrados como atividade relativa de luciferase do vagalume normalizadas pela atividade da luciferase de *Renilla*. Os dados representam média ± desvio padrão de duas réplicas independentes.

### 5.17 A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por moléculas da via de TLRs em células HEK293

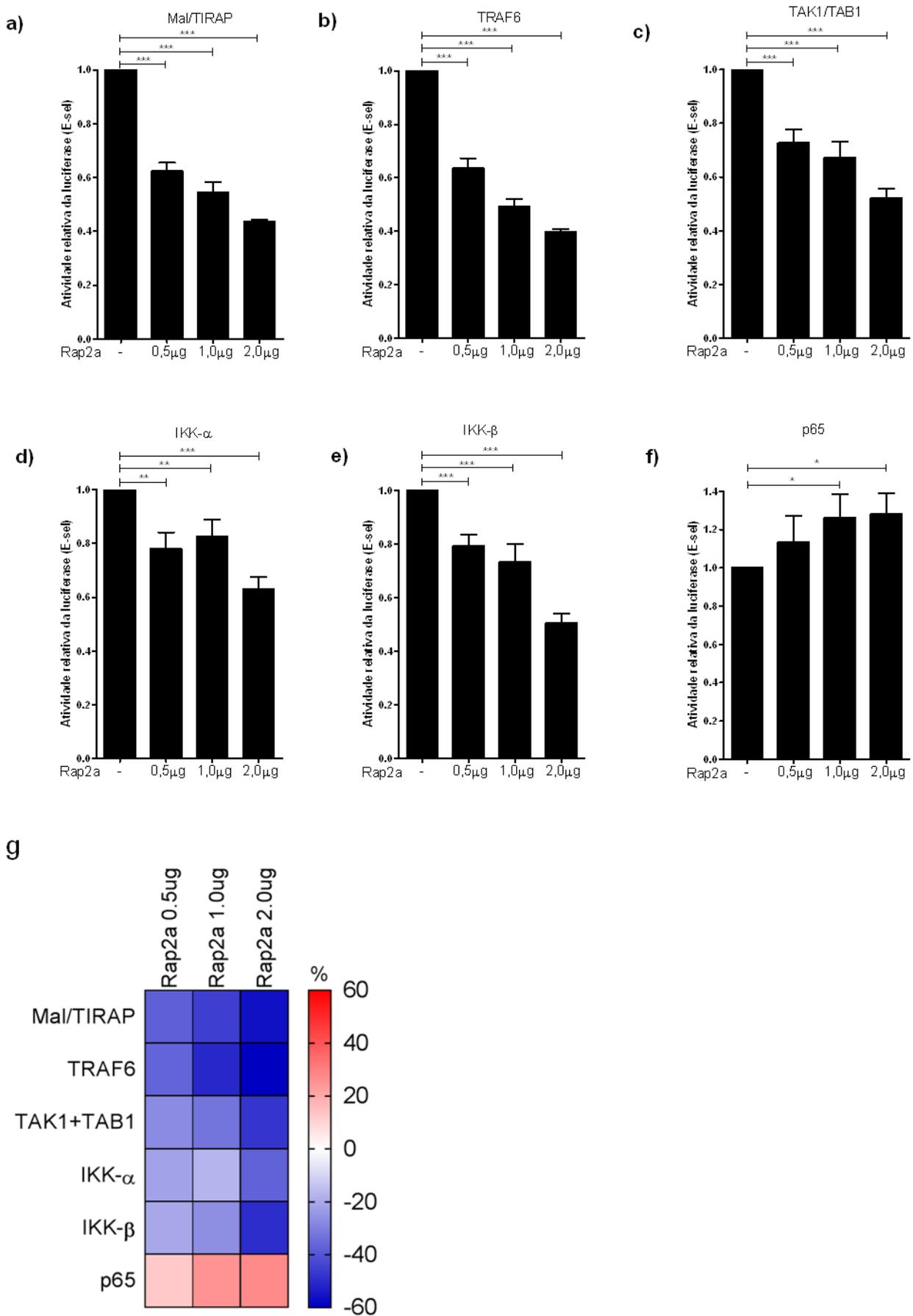
Com o objetivo de confirmar os dados anteriores e ainda obter indícios sobre possíveis moléculas alvo de Rap2a na via de TLRs, conduzimos novos experimentos de ganho de função em células HEK293 transfectadas para expressão de componentes da via de sinalização dos TLRs. Iniciamos nossa investigação a partir de uma importante molécula adaptadora comum às vias de TLR2 e TLR4, o MAL/TIRAP. As proteínas MALTIRAP 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. Os resultados desse experimento estão representados pelo gráfico da figura 27a e, como esperado, mostra que em todos os grupos de células que foram transfectadas com Mal/TIRAP a ativação de NF- $\kappa$ B ocorre de maneira expressiva. No entanto, constatamos que nos grupos de células transfectadas com Rap2a essa ativação ocorre de forma reduzida. A maior diferença pode ser visualizada no grupo de células transfectadas com Mal/TIRAP juntamente com 2 $\mu$ g 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 apenas com a molécula adaptadora. Ainda, novamente verificamos que o nível de diminuição da atividade de NF- $\kappa$ B causada pela superexpressão de Rap2a é concentração-dependente, o que pode ser observado ainda no gráfico da figura 27a.

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 nas células HEK293 (figura 27b ou c). De forma bastante semelhante ao que foi observado no experimento com tratamento de Mal/TIRAP (figura 27a), ao superexpressarmos proteínas intermediárias na via de sinalização dos TLRs, observamos clara ativação de NF- $\kappa$ B em todos os grupos, mas com uma diminuição concentração-dependente na ativação de NF- $\kappa$ B nos grupos transfectados com quantidades crescentes de Rap2a. Para o experimento em que TRAF6 é superexpresso, a diferença entre as células transfectadas apenas 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 $\mu$ g de Rap2a (figura 27b). O mesmo perfil é observado quando induzimos a superexpressão de proteínas do complexo IKK (IKK- $\alpha$  ou IKK- $\beta$ , figuras 27d e 27e, respectivamente), com uma redução de aproximadamente 70% em relação às células transfectadas com o vetor para aquelas com maior quantidade de Rap2a.

Ainda, realizamos um experimento no qual expressamos p65, um monômero do próprio NF- $\kappa$ B (figura 27f). É importante salientar que o dímero de NF- $\kappa$ B mais abundante nas células é p50/p65 (Chen *et al.*, 1998). De forma intrigante, observamos que a superexpressão de Rap2a não reduz os níveis de ativação de NF- $\kappa$ B induzida diretamente por p65, sugerindo que a interferência de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B

ia de TLRs. nesse caso ocorre em algum ponto “acima” de p65 na via de TLRs. Ademais, os resultados das figuras 27a-f foram analisados segundo as diferenças percentuais entre os grupos transfectados apenas com o vetor e aqueles onde Rap2a foi superexpresso. Os resultados dessa análise foram plotados em gráfico de *heatmap* para facilitar a comparação do efeito de expressão forçada de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B induzida pelas diferentes moléculas da via de TLRs. De maneira interessante, percebemos que os efeitos mais expressivos da superexpressão de Rap2a sobre a atividade de NF- $\kappa$ B ocorrem nos experimentos com as moléculas ativadoras mais à jusante da via de TLRs.



**Figura 27:** A expressão forçada de Rap2a reduz a ativação de NF-κB induzida por moléculas da via de TLRs em células HEK293. Células HEK293 foram transfectadas com os

plasmídeos repórter e, **(a)** Mal/TIRAP, **(b)** TRAF6, **(c)** TAK1/TAB1, **(d)** IKK $\alpha$ , **(e)** IKK $\beta$  e **(f)** p65(RelA), juntamente com quantidades crescentes de pCIneo-Myc-Rap2a. Vinte e quatro horas após a transfecção os extratos celulares foram obtidos e a atividade de luciferase foi medida em luminômetro. As quantidades de DNA foram mantidas constantes nos experimentos. Os resultados são mostrados como atividade relativa de luciferase do vagalume normalizadas pela atividade da luciferase de *Renilla*. Ainda, todos os valores dos grupos onde NF- $\kappa$ B foi ativado por moléculas da via de TLR foram corrigidos pelos valores dos grupos sem a transfecção dessas moléculas. Os valores plotados correspondem ao *fold* relativo aos grupos sem Rap2a. Os dados mostram média  $\pm$  desvio padrão de três réplicas independentes. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. **(g)** *Heatmap* representativo das diferenças percentuais entre os grupos transfectados apenas com o vetor e aqueles onde Rap2a foi superexpresso.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, relatamos pela primeira vez que a GTPase Rap2a é ativada por LPS e está implicada em vias disparadas por TLRs em macrófagos. Averiguamos que mudanças na quantidade de Rap2a nessas células prejudicam a ativação de NF- $\kappa$ B e podem provocar distúrbios na produção de mediadores inflamatórios.

Iniciamos a nossa investigação avaliando a expressão de Rap2a após estímulos com agonistas de TLRs em macrófagos. Constatamos que os níveis do mRNA de Rap2a são alterados após estímulos com agonistas de TLRs. Embora estatisticamente significativo, o efeito da redução nos tempos iniciais induzida por LPS sobre os níveis de mRNA de Rap2a em macrófagos é modesto, não chegando a atingir uma redução maior que 2 vezes, o que poderia ser interpretado como de importância biológica questionável. No entanto, o nível de redução na expressão gênica não exclui a relevância do efeito observado, dado que a modulação no perfil dos níveis de mRNA é muito consistente entre os diferentes agonistas e macrófagos testados.

Em nossos experimentos realizados a fim de validar a qualidade do anticorpo utilizado para detecção de Rap2a, atestamos a afinidade por Rap2a por superexpressão e obtivemos uma indicação da especificidade do anticorpo em um experimento no qual silenciemos Rap2a a partir da transfecção com shRNA. Ainda, é importante mencionar um trabalho em que Mollinedo e colaboradores demonstraram a afinidade de um anticorpo por Rap2a, mas não por Rap2b, e cuja sequência possui doze dos dezoito aminoácidos presentes no imunógeno do anticorpo comercial utilizado no nosso trabalho (Mollinedo *et al.*, 1993).

Observamos que ocorre indução nos níveis proteicos de Rap2a de forma expressiva e tão rapidamente quanto uma hora pós-tratamento com LPS, o que reforça a ideia de que a proteína de Rap2a desempenhe um papel biológico em vias disparadas por TLRs. Entretanto, os resultados das análises de western-blot para examinar os níveis de Rap2a em extratos de macrófagos tratados com LPS ou Pam3CSK4 não foram coerentes com as análises dos níveis de mRNA, não sendo encontrada uma correlação direta entre as alterações induzidas pelos agonistas nos níveis de mRNA e aquelas nos níveis da proteína de Rap2a. Diversos trabalhos anteriores (Maier *et al.*, 2009; Vogel e Marcotte, 2012) já haviam demonstrado situações em que os níveis proteicos de uma

molécula não estão diretamente correlacionados aos níveis de mRNA. Já foi demonstrado, por exemplo, que os níveis do mRNA de Gfi1 (uma molécula importante na diferenciação mieloide) diminuem durante a diferenciação monocítica, mas que os níveis proteicos aumentam devido a uma menor degradação proteossomal (Marteijn *et al.*, 2007). Esses resultados são intrigantes e também desafiadores para a busca dos mecanismos envolvidos. Há que se observar que ao menos nos tempos iniciais e intermediários há uma correlação inversa que deve se ajustar a um potencial mecanismo em que perturbações nos níveis do mRNA de Rap2a causadas em resposta à estimulação induzida por TLRs em macrófagos possam levar a alterações biológicas críticas na tradução de seu mRNA. A tradução do mRNA é um processo complexo e estritamente controlado por diversas moléculas e em diferentes níveis, sendo regulado por fatores de iniciação e alongação (Spilka *et al.*, 2013), disponibilidade de aminoácidos (Kimball e Jefferson, 2002) e pequenas moléculas de RNA, como microRNAs (Xue *et al.*, 2016). Essa regulação complexa da tradução celular sustenta a ideia de por que apenas 30 a 40% da variação nos níveis de proteínas é explicada pela abundância de mRNA em células de mamíferos (Vogel e Marcotte, 2012). É possível especular que, devido a uma necessidade imediata da proteína, moléculas de mRNA de Rap2a pré-existentes sejam “liberadas” para a tradução logo após os estímulos com agonistas de TLRs, e que o aumento na transcrição do mRNA observado em tempos mais tardios ocorra como forma de reposição desses níveis basais. É interessante notar que no tempo mais tardio de estimulação (24h) os resultados sugerem uma diminuição nos níveis proteicos de Rap2a, justamente no tempo em que verificamos o aumento nos níveis do mRNA.

Ainda, verificamos que após a indução em tempos iniciais, há o acúmulo da proteína de Rap2a após tempos mais intermediários de estimulação. A partir de tal observação, também pode ser considerada a atuação de mecanismos de modificações pós-traducionais para o aumento da estabilidade proteica provocado por fosforilação, acetilação, ubiquitinação e outros (Brooks e Gu, 2003). Dadas essas especulações, já foi demonstrado que Rap2a pode sofrer ubiquitinação mediada por NEDD4 em células de glioma (Wang *et al.*, 2017). Nesse trabalho foi demonstrado que Rap2a sofre mono e di-ubiquitinação, e que esse processo requer a proteína cinase TNIK, impedindo sua interação com proteínas efetoras e levando à inativação de Rap2a. É tentador especular que Rap2a possa sofrer tal modificação em células tratadas com LPS como um

mecanismo de controle intracelular para manter Rap2a em níveis estritamente regulados durante a resposta celular disparada por TLRs. Pois, como observamos em nosso trabalho, as alterações nos níveis de Rap2a provocadas pela superexpressão ou silenciamento perturbam a ativação de NF- $\kappa$ B e consequente regulação seletiva da expressão de genes inflamatórios.

Já foi demonstrado que diversas proteínas reguladoras de NF- $\kappa$ B e de outras moléculas de vias do sistema imune têm a sua expressão modulada na inflamação para que possam cumprir suas funções. Um dos reguladores de NF- $\kappa$ B mais bem estudados é a proteína A20, e sabe-se que na maioria das células já estudadas sua expressão é rapidamente induzida após ativação de NF- $\kappa$ B (Verstrepen *et al.*, 2010). Ainda, Kong e colaboradores mostraram que SIRP $\alpha$ , uma proteína reguladora 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).

Vários trabalhos já haviam sido realizados utilizando-se a sonda GST-RalGDS-RBD para a captura de proteínas Rap ligadas à GTP (Van Triest *et al.*, 2001; Moon e Pyo, 2007). No presente estudo, demonstramos que Rap2a é uma molécula ativada após estímulos com LPS ou PMA em macrófagos murinos. Observamos que os níveis proteicos de Rap2a total nos BMDMs também estão aumentados nos grupos estimulados com LPS ou PMA. Este resultado confirma nossos achados de que os níveis proteicos de Rap2a são precocemente induzidos logo após estímulos com agonistas de TLRs e ainda mostra que algo semelhante ocorre para o estímulo com PMA. Ainda, reforça a hipótese de que existam mecanismos de regulação na expressão de Rap2a antes da tradução e/ou modificações pós-traducionais para o aumento da estabilidade da proteína de Rap2a após os estímulos. Ademais, é provável que parte do aumento nos níveis de Rap2a-GTP observados no ensaio de pull-down, seja consequência do aumento na expressão proteica de Rap2a. Entretanto, a normalização dos dados por densitometria ratifica a ativação de moléculas pré-existentes de Rap2a. Tanto o aumento na expressão proteica quanto nos níveis de Rap2a ativado, reforçam a implicação de Rap2a em vias mediadas por TLRs.

De forma interessante, os níveis de ativação de Rap2a em macrófagos RAW264.7 após o tratamento com PMA são ainda maiores do que os níveis de Rap2a

ativado após os estímulos com LPS. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que Rap1 é uma molécula ativada por PMA em diferentes tipos celulares, como plaquetas e linfócitos (Franke *et al.*, 2000; Eppler *et al.*;2017). Por sua vez, PMA é um ativador de PKC (*Protein kinase C*), uma cinase envolvida na transdução de sinal de diversas vias relacionadas ao crescimento e proliferação celular (Wu-Zhang e Newton, 2013). Em conjunto, esses dados sugerem que mais estudos sobre as proteínas Rap2 em vias ativadas por PMA podem ser promissores e revelar novas implicações para estas GTPases.

Já havia sido demonstrado por meio de abordagens bioquímicas, que RasGEF1b é um ativador de Rap2a (Yaman *et al.*,2009). Alguns anos depois, o mesmo grupo publicou resultados de ensaio de pull-down a partir de extratos de células HEK293 silenciadas de RasGEF1b e demonstraram uma ativação reduzida de Rap2 nessas células (Telkoparan *et al.*, 2013). Entretanto, ainda não havia sido mostrada a relação dessas moléculas em vias de TLRs e nem a ativação específica de Rap2a por RasGEF1b em cultura de células. Observamos que Rap2a é diretamente ativado por RasGEF1b em células HEK293, e, ainda, verificamos níveis menores de ativação de Rap2a em macrófagos murinos (BMDMs) desprovidos de RasGEF1b e estimulados com LPS. Como os níveis de Rap2a-GTP não foram totalmente suprimidos nas células RasGEF1b-KO, é provável que outras moléculas atuem na ativação de Rap2a juntamente com RasGEF1b nesse contexto. De fato, diversos GEFs ativadores de Rap-GTPases já foram descritos (Rebhun *et al.*, 2000; Dubé *et al.*, 2008). Um dos GEFs ativadores de proteínas Rap mais estudados é EPAC, um fator de troca ativado por cAMP (Cyclic adenosine monophosphate). Recentemente, Emery e colaboradores demonstraram que EPAC2 é um ativador de Rap2a em células neuroendócrinas (Emery *et al.*, 2017), o que torna esse GEF mais um alvo de estudos em vias relacionadas à Rap2a.

Já foi descrito que as vias Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT estão entre as principais acionadas por proteínas Ras (Simanshu *et al.*, 2017). As observações de que os níveis de fosforilação de ERK e AKT estão alterados em células desprovidas de RasGEF1b e estimuladas com LPS ou PMA em relação às células selvagens, instigam a realização de investigações mais aprofundadas sobre a função específica de Rap2 e outras GTPases que também são alvo de RasGEF1b. Verificamos o aumento na fosforilação de ERK após o estímulo com PMA, já a fosforilação de AKT não foi detectada após a realização

do mesmo estímulo. É interessante observar que Kawasaki e colaboradores (Kawasaki *et al.*, 2016) sugeriram que a indução da ativação de ERK em células de carcinoma humano (BT-474) por PMA leva a diminuição da ativação de AKT. Podemos apenas especular sobre uma possível interferência entre essas vias após estímulos com PMA em BMDMs, de modo que mais estudos são necessários para determinar se essa é uma conjectura plausível.

De forma intrigante, observamos uma correlação inversa entre os níveis de pERK1/2 e ERK total. Já foi descrito que após a sua ativação ERK é translocado/sequestrado para o núcleo, um evento dependente dos níveis de fosforilação dessa cinase (Volmat *et al.*, 2001; Lidke *et al.*, 2010). Logo, é possível que ao utilizar os lisados clarificados no ensaio de western blot para ERK total, tenhamos excluído uma fração de ERK associada ao DNA e outras moléculas nucleares, correspondentes exatamente a ERK ativado.

Demonstramos aqui, que células transfectadas com siRNA-Rap2a têm menor ativação de NF- $\kappa$ B e menor produção de CXCL1 e IL-6. Alguns trabalhos já foram publicados demonstrando o envolvimento de proteínas Ras na produção de moléculas relacionadas ao sistema imune, a maior parte deles relacionados à motilidade e adesão de leucócitos e à produção de quimiocinas (Bokoch, 2005; Yu *et al.*, 2015). Entretanto, este é o primeiro relato sobre a interferência de proteínas Rap2 na produção de quimiocinas e citocinas. Assim, a relevância de nossos achados instiga a realização de novos experimentos de perda de função de Rap2a com variados tempos de estímulo por agonistas de TLRs, de forma que possamos avaliar uma gama maior de mediadores inflamatórios e também de moléculas anti-inflamatórias.

Observamos a redução na ativação de NF- $\kappa$ B induzida por agonistas de TLR2 e TLR4 ao realizar experimentos de ganho de função de Rap2a em células HEK293, um efeito similar ao verificado para o silenciamento de Rap2a em macrófagos. Embora seja um resultado intrigante, a obtenção de um mesmo fenótipo tanto para a superexpressão quanto para o silenciamento de uma molécula têm sido reportada em outros trabalhos. Em 2014, Wang e colaboradores demonstraram que tanto a elevação quanto a redução dos níveis da proteína SRPK1 causam defosforilação da cinase AKT, o que leva a um perfil tumorigênico em fibroblastos murinos (Wang, P. *et al.*, 2014). Ainda, é observado que SRPK1 forma um complexo com AKT e a fosfatase PHLPP. Na ausência de

SRPK1, não há um arcabouço para a formação do complexo, mas com o excesso da proteína provocado por ensaios de superexpressão, PHLPP é sequestrada individualmente, o que também impede a formação do complexo. De fato, efeitos de sobrecarga, desequilíbrio estequiométrico de moléculas e interações promíscuas, são implicações bem discutidas em relação a estudos por superexpressão de moléculas (Moriya, 2015).

Ainda, é importante mencionar que notamos uma diminuição na expressão de Rap2c ao silenciar Rap2a. Podemos apenas especular sobre as causas desse efeito. Duas possibilidades são a influência do silenciamento de Rap2a na expressão de Rap2c ou ainda um efeito *off-target* do siRNA-Rap2a sobre Rap2c. Diversos trabalhos já relataram a existência de redundância na função de proteínas Ras de um mesmo grupo. Em um trabalho de 2013, Pannekoek e colaboradores demonstraram que Rap2 está envolvida na permeabilização de barreira endotelial, e que essa função é redundante para as três proteínas dessa subfamília, ou seja, a depleção de apenas uma das proteínas Rap2 não causa efeito na barreira endotelial (Pannekoek *et al.*, 2013). Entretanto, também já foram descritos trabalhos que mostram efeitos opostos para GTPases de um mesmo grupo (Santillo *et al.*, 2001). Assim, caso a redução na expressão de Rap2c em células transfectadas com siRNA-Rap2a seja devido a um efeito *off-target* e as duas GTPases possuam efeitos contraditórios, é possível que essa seja a causa de observarmos o mesmo fenótipo na ativação de NF- $\kappa$ B para experimentos de perda e ganho de função. Mas essa é apenas uma conjectura, e estudos mais profundos serão necessários futuramente para revelar a função exata de cada GTPase Rap2 na ativação de NF- $\kappa$ B em vias de TLRs.

É intrigante observar que não encontramos efeitos na ativação de NF- $\kappa$ B quando as células são estimuladas com agonista de TLR3 (poly:IC). Tal fato pode sugerir que há uma especificidade na atuação de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B nas vias de sinalização disparadas por MyD88, uma vez que TLR3 é exclusivamente TRIF dependente (Kawai e Akira, 2011b). Assim, com o intuito de fornecer mais evidências sobre a função de Rap2a sobre ativação de NF- $\kappa$ B em vias de sinalização dos TLRs, nós conduzimos estudos de ganho de função para componentes críticos das vias de TLR2 e TLR4. Juntamente com MyD88, a molécula adaptadora Mal/TIRAP é recrutada para o domínio TIR de TLR2 e TLR4 logo após o reconhecimento de PAMPs, iniciando assim a cascata de sinalização (Kumar *et al.*, 2011). Nós observamos que a expressão forçada

de Rap2a reduz a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por Mal/TIRAP. Percebemos ainda que mais à jusante da ativação de NF- $\kappa$ B, há uma gradativa diminuição do efeito de Rap2a. É tentador especular que Rap2a exerce efeito mais à montante na via de sinalização dos TLRs, dado que os efeitos mais significativos de Rap2a sobre a ativação de NF- $\kappa$ B foram vistos nos experimentos onde Mal/TIRAP e TRAF6 foram superexpressos.

A descoberta de que Rap2a interfere na ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLRs, amplia a necessidade de maior conhecimento sobre a molécula e seus mecanismos de ação nessa conjuntura, amparada por mais evidências experimentais. Um trabalho de 2014 descreve que ao se associar fisicamente com Rap2, a proteína TRIM32 atua como um efetor de Rap2 na regulação de diversas cinases como TNIK e NIK (Demiray, 2014). TRIM32 é uma E3 ubiquitina ligase que facilita a ativação de NF- $\kappa$ B ao interagir com PIASy, um inibidor de NF- $\kappa$ B (Albor *et al.*, 2006; Kawai e Akira, 2011a). Ainda, TRIM32 tem papel celular sobre a ativação NF- $\kappa$ B em células HeLa estimuladas com TNF, o que reforça o papel regulatório das moléculas TRIM (uma família com mais de 70 membros em humanos) nas vias de sinalização da resposta imune inata (Tomar e Singh, 2015; Yang *et al.*, 2015). Tais evidências podem instigar a realização de estudos sobre TRIM32 (ou outro membro do grupo) como possível alvo de Rap2a na interferência sobre a ativação de NF- $\kappa$ B em vias de TLRs.

## 7. CONCLUSÕES

- Os níveis do mRNA de Rap2a em macrófagos murinos são alterados após estímulos com agonistas de TLRs, sendo reduzidos após os estímulos em tempos iniciais e aumentados nos tempos mais tardios de tratamento.
- Níveis proteicos de Rap2a em células RAW264.7 se acumulam após estímulos com agonistas de TLR e não possuem uma correlação direta com os perfis do mRNA.
- Os níveis do mRNA de Rap2b e Rap2c também são alterados após estímulos com agonistas de TLRs em células RAW264.7, embora as alterações para Rap2b sejam bastante modestas.
- Rap2a é ativado após estímulos com LPS ou PMA em macrófagos RAW264.7 e BMDMs.
- RasGEF1b contribui para a ativação de Rap2a após o estímulo com LPS em macrófagos.
- O silenciamento de Rap2a em macrófagos RAW264.7 reduz os níveis de ativação de NF- $\kappa$ B e prejudica a produção de CXCL1 e IL-6 em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS.
- A expressão forçada de Rap2a em células HEK293 reduz a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por agonistas de TLRs e por proteínas da via de sinalização dos TLRs.
- A expressão forçada de Rap2a em macrófagos RAW264.7 reduz a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por LPS.

Mudanças nos níveis de Rap2a em macrófagos perturbam a ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLRs e a produção de mediadores inflamatórios específicos nessas vias. Assim, demonstramos de forma inédita o envolvimento de uma GTPase Rap2 na resposta imune inata em vias de TLRs.

O desajuste da ativação de NF- $\kappa$ B está relacionado a várias doenças inflamatórias e o câncer, logo, mais estudos sobre o papel das proteínas Rap2 nesse contexto podem contribuir para um melhor entendimento sobre diversas doenças.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARN, I. M. et al. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 1, p. 39-51, Dec 2011. ISSN 1471-0080..

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674.

AKSENTIJEVICH, I.; ZHOU, Q. NF- $\kappa$ B Pathway in autoinflammatory diseases: dysregulation of protein modifications by ubiquitin defines a new category of autoinflammatory diseases. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 399, 2017.

ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Intern Med**, v. 261, n. 6, p. 511-28, Jun 2007. ISSN 0954-6820

ALBOR, A. et al. The interaction of Piasy with Trim32, an E3-ubiquitin ligase mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2H, promotes Piasy degradation and regulates UVB-induced keratinocyte apoptosis through NF $\kappa$ B. **J Biol Chem**, v. 281, n. 35, p. 25850-66, Sep 2006. ISSN 0021-9258.

ANDERSON, K. V.; JURGENS, G.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. **Cell**, v. 42, n. 3, p. 779-89, Oct 1985. ISSN 0092-8674

ANDRADE, W. A. et al. Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. **Genes Immun**, v. 11, n. 6, p. 447-57, Sep 2010. ISSN 1476-5470.

ANWAR, M. A.; BASITH, S.; CHOI, S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. **Exp Mol Med**, v. 45, p. e11, Feb 2013. ISSN 2092-6413.

APPLEQUIST, S. E.; WALLIN, R. P.; LJUNGGREN, H. G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. **Int Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1065-74, Sep 2002. ISSN 0953-8178

ARENZANA-SEISDEDOS, F. et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. **J Cell Sci**, v. 110 ( Pt 3), p. 369-78, Feb 1997. ISSN 0021-9533.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metab**, v. 13, n. 1, p. 11-22, Jan 5 2011. ISSN 1932-7420

BEG, A. A. et al. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. **Genes Dev**, v. 6, n. 10, p. 1899-913, Oct 1992. ISSN 0890-9369.

BIGLER, D. et al. Rap2 regulates androgen sensitivity in human prostate cancer cells. **Prostate**, v. 67, n. 14, p. 1590-9, Oct 2007. ISSN 0270-4137.

BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305-15, Mar 26 2010. ISSN 1097-4180.

BOKOCH, G. M. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 163-71, Mar 2005. ISSN 0962-8924.

BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 865-77, Jun 2007. ISSN 0092-8674. >.

BROOKS, C. L.; GU, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 164-71, Apr 2003. ISSN 0955-0674.

BRUURS, L. J.; BOS, J. L. Mechanisms of isoform specific Rap2 signaling during enterocytic brush border formation. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106687, 2014. ISSN 1932-6203.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009. ISSN 1530-8561

CASTELLANO, E.; SANTOS, E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 216-31, Mar 2011. ISSN 1947-6027.

CHEN, F. E. et al. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 410-3, Jan 1998. ISSN 0028-0836.

CHEN, Y. et al. Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 7, p. 3048-56, Apr 2004. ISSN 0270-7306.

CHEN, Y.; WU, J.; GHOSH, G. KappaB-Ras binds to the unique insert within the ankyrin repeat domain of IkappaBbeta and regulates cytoplasmic retention of

IkappaBbeta x NF-kappaB complexes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 25, p. 23101-6, Jun 2003. ISSN 0021-9258.

CHERFILS, J.; ZEGHOUF, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 269-309, Jan 2013. ISSN 1522-1210.

CHU, J. Y.; MCCORMICK, B.; VERMEREN, S. Small GTPase-dependent regulation of leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Biochem Soc Trans**, v. 46, n. 3, p. 649-658, Jun 2018. ISSN 1470-8752.

COLICELLI, J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. **Sci STKE**, v. 2004, n. 250, p. RE13, Sep 14 2004. ISSN 1525-8882

COOPER, J. T. et al. A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. **J Biol Chem**, v. 271, n. 30, p. 18068-73, Jul 26 1996. ISSN 0021-9258

COX, A. D.; DER, C. J. Ras history: The saga continues. **Small GTPases**, v. 1, n. 1, p. 2-27, Jul 2010. ISSN 2154-1256.

CÔTE, M. et al. SLAT promotes TCR-mediated, Rap1-dependent LFA-1 activation and adhesion through interaction of its PH domain with Rap1. **J Cell Sci**, v. 128, n. 23, p. 4341-52, Dec 2015. ISSN 1477-9137.

DEMIRAY, B. The E3 Ligase TRIM32 is an effector of the RAS family GTPase RAP2. Tese (Cancer Institute, University College London). 2014

DI, J. et al. Rap2B promotes cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer. **Med Oncol**, v. 33, n. 6, p. 58, Jun 2016. ISSN 1559-131X.

DI, J., GAO, K., QU, D., WU, Y., YANG, J., & ZHENG, J.. Rap2B promotes angiogenesis via PI3K/AKT/VEGF signaling pathway in human renal cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 39, n. 7, p. 1010428317701653, Jul 2017. ISSN 1423-0380.

DIDONATO, J. et al. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 1295-304, Apr 1996. ISSN 0270-7306

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11-22, Jan 2003. ISSN 1474-175X

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. Toll-like receptors: from the discovery of NF $\kappa$ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 9, p. 1102-13, Oct 2006. ISSN 0006-2952..

DUBÉ, N. et al. The RapGEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell-cell junctions. **Cell Signal**, v. 20, n. 9, p. 1608-15, Sep 2008. ISSN 0898-6568.

DÖPPLER, H. et al. The PRKD1 promoter is a target of the KRas-NF- $\kappa$ B pathway in pancreatic cancer. **Sci Rep**, v. 6, p. 33758, 09 2016. ISSN 2045-2322.

EMERY, A. C. et al. Guanine nucleotide exchange factor Epac2-dependent activation of the GTP-binding protein Rap2A mediates cAMP-dependent growth arrest in neuroendocrine cells. **J Biol Chem**, v. 292, n. 29, p. 12220-12231, 07 2017. ISSN 1083-351X. >.

EPPLER, F. J.; QUAST, T.; KOLANUS, W. Dynamin2 controls Rap1 activation and integrin clustering in human T lymphocyte adhesion. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0172443, 2017. ISSN 1932-6203.

FENWICK, C. et al. A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. **Science**, v. 287, n. 5454, p. 869-73, Feb 2000. ISSN 0036-8075.

FRANKE, B. et al. Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 3, p. 779-85, Feb 2000. ISSN 0270-7306.

FRIDAY, B. B.; ADJEI, A. A. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. 342-6, Jan 15 2008. ISSN 1078-0432

GHOSH, G. et al. NF-kappaB regulation: lessons from structures. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 36-58, Mar 2012. ISSN 1600-065X

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 11, p. 837-48, Nov 2008. ISSN 1474-1741

GHOSH S, HAYDEN MS.. Celebrating 25 years of NF-kappaB research. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 5-13, Mar 2012. ISSN 1600-065X

GLOERICH, M. et al. Rap2A links intestinal cell polarity to brush border formation. **Nat Cell Biol**, v. 14, n. 8, p. 793-801, Aug 2012. ISSN 1476-4679.

GOITRE, L. et al. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. **Methods Mol Biol**, v. 1120, p. 1-18, 2014. ISSN 1940-6029.

GUO, X. X. et al. Rap-Interacting Proteins are Key Players in the Rap Symphony Orchestra. **Cell Physiol Biochem**, v. 39, n. 1, p. 137-56, 2016. ISSN 1421-9778.

HARHAJ, E. W.; DIXIT, V. M. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 22-39, Jan 2011. ISSN 1748-7838

HARHAJ, E. W.; DIXIT, V. M.. Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 107-24, Mar 2012. ISSN 1600-065X

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev**, v. 18, n. 18, p. 2195-224, Sep 15 2004. ISSN 0890-9369

HENKEL, T. et al. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. **Cell**, v. 68, n. 6, p. 1121-33, Mar 20 1992. ISSN 0092-8674

JAATTELA, M. et al. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. **J Immunol**, v. 156, n. 3, p. 1166-73, Feb 1 1996. ISSN 0022-1767

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 54 Pt 1, p. 1-13, 1989. ISSN 0091-7451.

JOHNSON, D. S.; CHEN, Y. H. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 4, p. 458-63, Aug 2012. ISSN 1471-4973.

KAMDAR, K.; NGUYEN, V.; DEPAOLO, R. W. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 207-12, Apr 1 2013. ISSN 2150-5608

KAWABE, H. et al. Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. **Neuron**, v. 65, n. 3, p. 358-72, Feb 11 2010. ISSN 1097-4199

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916

KAWAI, T., & AKIRA, S.. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 9, p. 513-27, Sep 2011a. ISSN 1757-4684.

KAWAI, T., & AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, May 2011b. ISSN 1097-4180.

KAWASAKI, Y. et al. Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. **Sci Rep**, v. 6, p. 31502, 08 2016. ISSN 2045-2322.

KIM, J. G. et al. Ras-related GTPases Rap1 and RhoA collectively induce the phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles in macrophages. **J Biol Chem**, v. 287, n. 7, p. 5145-55, Feb 2012. ISSN 1083-351X.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Control of protein synthesis by amino acid availability. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n. 1, p. 63-7, Jan 2002. ISSN 1363-1950.

KITAYAMA, H. et al. A ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell**, v. 56, n. 1, p. 77-84, Jan 1989. ISSN 0092-8674.

KONG, X. N. et al. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. **J Exp Med**, v. 204, n. 11, p. 2719-31, Oct 29 2007. ISSN 0022-1007.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, Feb 2011. ISSN 1563-5244.

LARUE, K. E.; MCCALL, C. E. A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. **J Exp Med**, v. 180, n. 6, p. 2269-75, Dec 1 1994. ISSN 0022-1007

LEÃO, FB; CARVALHO, BC; LIMA, KM; VIEIRA, HGS; OLIVEIRA, L; GHOSH, S; SILVA, AM. Functional characterization of murine TLR-inducible *Rasgef1b* gene promoter: implication of NF-kappaB transcription factor. (Manuscrito em preparação)

LEE, E. G. et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. **Science**, v. 289, n. 5488, p. 2350-4, Sep 29 2000. ISSN 0036-8075

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, Sep 20 1996. ISSN 0092-8674 (Print)

LI, M. et al. The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 3, p. 365-74, Apr 2009. ISSN 1566-5240

LIDKE, D. S. et al. ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 285, n. 5, p. 3092-102, Jan 2010. ISSN 1083-351X.

LIU, G. Y. et al. Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. **Cell Rep**, v. 14, n. 10, p. 2325-36, Mar 2016. ISSN 2211-1247.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023

LU Y, LI X, LIU S, ZHANG Y, ZHANG D Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. **Front Immunol** Jan 2018 30;9:72.

LUCAS, K.; MAES, M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 1, p. 190-204, Aug 2013. ISSN 1559-1182.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Lett**, v. 583, n. 24, p. 3966-73, Dec 2009. ISSN 1873-3468.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, Dec 2010. ISSN 1932-6203.

MARTEIJN, J. A. et al. Diminished proteasomal degradation results in accumulation of Gfi1 protein in monocytes. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 100-8, Jan 2007. ISSN 0006-4971..

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-26, Oct 2007. ISSN 1476-4687.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, Jul 24 1997. ISSN 0028-0836

MIFSUD, E. J.; TAN, A. C.; JACKSON, D. C. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. **Front Immunol**, v. 5, p. 79, 2014.

MIZUMOTO, Y. et al. Activation of NF-kappaB is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 6, p. 1341-50, Mar 2011. ISSN 1078-0432.

MOLLINEDO, F. et al. Localization of rap1 and rap2 proteins in the gelatinase-containing granules of human neutrophils. **FEBS Lett**, v. 326, n. 1-3, p. 209-14, Jul 1993. ISSN 0014-5793.

MOON, E. Y. et al. ROS/Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB activation is required for the expression of BAFF in Raw264.7 murine macrophages. **Cell Signal**, v. 23, n. 9, p. 1479-88, Sep 2011. ISSN 1873-3913.

MOON, E. Y.; PYO, S. Lipopolysaccharide stimulates Epac1-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264.7 murine macrophages. **Immunol Lett**, v. 110, n. 2, p. 121-5, Jun 2007. ISSN 0165-2478.

MORIYA, H. Quantitative nature of overexpression experiments. **Mol Biol Cell**, v. 26, n. 22, p. 3932-9, Nov 2015. ISSN 1939-4586.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 695-708, Aug 2011. ISSN 1529-2916

OECKINGHAUS, A. et al.  $\kappa$ B-Ras proteins regulate both NF- $\kappa$ B-dependent inflammation and Ral-dependent proliferation. **Cell Rep**, v. 8, n. 6, p. 1793-807, Sep 2014. ISSN 2211-1247.

OLSSON, S.; SUNDLER, R. The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. **Mol Immunol**, v. 43, n. 6, p. 607-12, Feb 2006. ISSN 0161-5890

OPIPARI, A. W., JR.; BOGUSKI, M. S.; DIXIT, V. M. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. **J Biol Chem**, v. 265, n. 25, p. 14705-8, Sep 5 1990. ISSN 0021-9258

PAGANINI, S. et al. Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins. **Biochimie**, v. 88, n. 3-4, p. 285-95, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0300-9084.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-66, Nov 1999. ISSN 0950-9232.

PANNEKOEK, W. J. et al. Rap1 and Rap2 antagonistically control endothelial barrier resistance. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57903, 2013. ISSN 1932-6203.

PASCOAL-XAVIER, M. A. et al. RAP1 GTPase overexpression is associated with cervical intraepithelial neoplasia. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123531, 2015. ISSN 1932-6203.

PIFER, R. et al. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 5, p. 3307-14, Feb 4 2011. ISSN 1083-351X

PIZON, V. et al. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* gene *Dras3* encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. **Oncogene**, v. 3, n. 2, p. 201-4, Aug 1988. ISSN 0950-9232.

RAMANA, K. V. et al. Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. **J Biol Chem**, v. 281, n. 44, p. 33019-29, Nov 3 2006. ISSN 0021-9258

RAMOS, C. J.; ANTONETTI, D. A. The role of small GTPases and EPAC-Rap signaling in the regulation of the blood-brain and blood-retinal barriers. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 3, p. e1339768, 07 2017. ISSN 2168-8370.

REBHUN, J. F.; CASTRO, A. F.; QUILLIAM, L. A. Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. **J Biol Chem**, v. 275, n. 45, p. 34901-8, Nov 2000. ISSN 0021-9258.

RULAND, J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 709-14, Aug 2011. ISSN 1529-2916

SAMSTAG, Y.; NEBL, G. Ras initiates phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/PKB mediated signalling pathways in untransformed human peripheral blood T lymphocytes. **Adv Enzyme Regul**, v. 45, p. 52-62, 2005. ISSN 0065-2571.

SANTILLO, M. et al. Opposing functions of Ki- and Ha-Ras genes in the regulation of redox signals. **Curr Biol**, v. 11, n. 8, p. 614-9, Apr 2001. ISSN 0960-9822.

SCOTT, J. et al. Exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) activation reverses neutrophil dysfunction induced by  $\beta$ 2-agonists, corticosteroids, and critical illness. **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, n. 2, p. 535-44, Feb 2016. ISSN 1097-6825.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705-16, Aug 1986. ISSN 0092-8674.

SILVA, A.M., FERNANDES, H.B., HUBNER, J., OLIVEIRA, I.M., SOUZA, M.C., LEÃO, F.B., CARVALHO, B.C., VIEIRA, H.G.S., LIMA, K.M., GAZZINELLI, R.T., 2018 (submetido). Cre/loxP-mediated gene targeting for deleting Ras guanine exchange factor member 1b disturbs Cxcl1 expression in Toll-like receptor (TLR)-activated macrophages. (Submetido)

SIMANSHU, D. K.; NISSLEY, D. V.; MCCORMICK, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 17-33, Jun 2017. ISSN 1097-4172.

SONG, H. Y.; ROTHE, M.; GOEDDEL, D. V. 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**, v. 93, n. 13, p. 6721-5, Jun 25 1996. ISSN 0027-8424 (Print)

SPILKA, R. et al. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. **Cancer Lett**, v. 340, n. 1, p. 9-21, Oct 2013. ISSN 1872-7980.

STEFANINI, L. et al. Functional redundancy between RAP1 isoforms in murine platelet production and function. **Blood**, Aug 2018. ISSN 1528-0020.

STORNETTA, R. L.; ZHU, J. J. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 54-78, Feb 2011. ISSN 1089-4098.

TAGO, K. et al. 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**, v. 285, n. 40, p. 30622-33, Oct 2010. ISSN 1083-351X..

TAKAGI, M. Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. **J Clin Exp Hematop**, v. 51, n. 2, p. 77-92, 2011. ISSN 1880-9952..

TAMATE, M. et al. Rap1GAP inhibits tumor progression in endometrial cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 485, n. 2, p. 476-483, Apr 2017. ISSN 1090-2104.

TELKOPARAN, P. et al. Coiled-coil domain containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69289, 2013. ISSN 1932-6203.

TIMENETSKY, J. et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p. 907-14, Jul 2006. ISSN 0100-879X.

TOMAR, D.; SINGH, R. TRIM family proteins: emerging class of RING E3 ligases as regulator of NF- $\kappa$ B pathway. **Biol Cell**, v. 107, n. 1, p. 22-40, Jan 2015. ISSN 1768-322X.

TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int J Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-6, Aug 1980. ISSN 0020-7136 (Print)

UECHI, Y. et al. Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 378, n. 4, p. 732-7, Jan 2009. ISSN 1090-2104.

VAN DAM, T. J.; BOS, J. L.; SNEL, B. Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. **Small GTPases**, v. 2, n. 1, p. 4-16, Jan 2011. ISSN 2154-1256.

VAN TRIEST, M.; DE ROOIJ, J.; BOS, J. L. Measurement of GTP-bound Ras-like GTPases by activation-specific probes. **Methods Enzymol**, v. 333, p. 343-8, 2001. ISSN 0076-6879. >.

VERSTREPEN, L. et al. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 12, p. 2009-20, Dec 2010. ISSN 1873-2968.

VIGIL, D. et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842-57, Dec 2010. ISSN 1474-1768.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 4, p. 227-32, Mar 2012. ISSN 1471-0064.

VOLMAT, V. et al. The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 19, p. 3433-43, Oct 2001. ISSN 0021-9533.

WANG, J. C. et al. The Rap2c GTPase facilitates B cell receptor-induced reorientation of the microtubule-organizing center. **Small GTPases**, p. 1-11, Feb 2018. ISSN 2154-1256.

WANG, L. et al. Over-expression of Rap2a inhibits glioma migration and invasion by down-regulating p-AKT. **Cell Biol Int**, v. 38, n. 3, p. 326-34, Mar 2013. ISSN 1095-8355

WANG, L., ZHAN, W., XIE, S., HU, J., SHI, Q., ZHOU, X., ... & YU, R. Over-expression of Rap2a inhibits glioma migration and invasion by down-regulating p-AKT. **Cell Biol Int**, v. 38, n. 3, p. 326-34, Mar 2014. ISSN 1095-8355..

WANG, L., ZHU, B., WANG, S., WU, Y., ZHAN, W., XIE, S., ... & YU, R.. Regulation of glioma migration and invasion via modification of Rap2a activity by the ubiquitin ligase Nedd4-1. **Oncol Rep**, v. 37, n. 5, p. 2565-2574, May 2017. ISSN 1791-2431.

WANG, P. et al. Both decreased and increased SRPK1 levels promote cancer by interfering with PHLPP-mediated dephosphorylation of Akt. **Mol Cell**, v. 54, n. 3, p. 378-91, May 2014. ISSN 1097-4164.

WRIGHT, K. L. et al. Ras Signaling Is a Key Determinant for Metastatic Dissemination and Poor Survival of Luminal Breast Cancer Patients. **Cancer Res**, v. 75, n. 22, p. 4960-72, Nov 2015. ISSN 1538-7445.

WU, J. et al. Ras-related protein Rap2c promotes the migration and invasion of human osteosarcoma cells. **Oncol Lett**, v. 15, n. 4, p. 5352-5358, Apr 2018. ISSN 1792-1074.

WU, J. X. et al. Rap2a serves as a potential prognostic indicator of renal cell carcinoma and promotes its migration and invasion through up-regulating p-Akt. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6623, Jul 2017. ISSN 2045-2322.

WU, J. X., ZHANG, D. G., ZHENG, J. N., & PEI, D. S.. Rap2a is a novel target gene of p53 and regulates cancer cell migration and invasion. **Cell Signal**, v. 27, n. 6, p. 1198-207, Jun 2015. ISSN 1873-3913..

WU-ZHANG, A. X.; NEWTON, A. C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. **Biochem J**, v. 452, n. 2, p. 195-209, Jun 2013. ISSN 1470-8728.

XUE, Q. et al. miR-9 and miR-124 synergistically affect regulation of dendritic branching via the AKT/GSK3 $\beta$  pathway by targeting Rap2a. **Sci Rep**, v. 6, p. 26781, May 2016. ISSN 2045-2322.

YAMAN, E. et al. RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange. **FEBS J**, v. 276, n. 16, p. 4607-16, Aug 2009. ISSN 1742-4658)

YAN, Q. et al. Nuclear factor-kappaB binding motifs specify Toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 35, p. 14140-5, Aug 28 2012. ISSN 1091-6490

YANG, Z. et al. SseK3 Is a Salmonella Effector That Binds TRIM32 and Modulates the Host's NF- $\kappa$ B Signalling Activity. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138529, 2015. ISSN 1932-6203.

YU, C. et al. Inhibition of Ras signalling reduces neutrophil infiltration and tissue damage in severe acute pancreatitis. **Eur J Pharmacol**, v. 746, p. 245-51, Jan 2015. ISSN 1879-0712.

ZHANG, X. et al. Rap2b, a novel p53 target, regulates p53-mediated pro-survival function. **Cell Cycle**, v. 12, n. 8, p. 1279-91, Apr 2013. ISSN 1551-4005.

ZHOU, Y. et al. Lipid-Sorting Specificity Encoded in K-Ras Membrane Anchor Regulates Signal Output. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 239-251.e16, Jan 2017. ISSN 1097-4172.