

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

**Análise dos níveis proteicos de RasGEF1b e
do seu papel sobre a regulação da ativação de
NF-kappaB em macrófagos estimulados com
agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs)**

Kátia Maciel Lima

Orientador: Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte – MG

Julho de 2012

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

Pós-graduação em Biologia Celular

Análise dos níveis proteicos de RasGEF1b e do seu papel sobre a regulação da ativação de NF-kappaB em macrófagos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Belo Horizonte – MG

Julho de 2012



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE
KÁTIA MACIEL LIMA

223/2012/15
 entrada
 2º/2010
 2010720703

Às **quatorze horas** do dia **23 de julho de 2012** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “**Análise dos níveis protéicos de RasGEF1b e do seu papel sobre a regulação da ativação de NF-kappaB em macrófagos estimulados com agonistas de receptores de tipo Toll (TLRs)**”, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Aristóbolo Mendes da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	APROVADA
Dra. Paula Rocha Moreira	UFMG	APROVADA
Dr. Remo de Castro Russo	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
 O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de julho de 2012.**

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva Aristóbolo Mendes da Silva
 (orientador)

Dra. Paula Rocha Moreira Paula Rocha Moreira

Dr. Remo de Castro Russo Remo de Castro Russo

Oliveira
 Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
 COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
 EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e o carimbo do Coordenador

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir cumprir mais uma etapa importante na minha vida.

Ao meu orientador Aristóbolo, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e desenvolver esse trabalho sob sua orientação. Obrigada pela confiança e por tudo que aprendi enquanto estive no laboratório de Genes Inflamatórios.

Aos amigos do laboratório, à Carol que tanto me ensinou e pelo auxílio na realização de vários experimentos; à Paula, por tantos momentos de desabafo e ansiedade compartilhados; ao Felipe por todos os favores prestados a mim durante esse trabalho e ao Brener pela tranquilidade e paciência em ensinar e ajudar.

Aqueles que deixaram o laboratório, como a Tatiane, a Thalita e a Solange, cada uma contribuiu de maneira única e especial para que esse tempo se tornasse inesquecível... à Tati, pela calma e meiguice; à Thalita, pela competência e pelo alto-astral e à Solange, pela experiência e ajuda no cultivo de células.

Aos amigos da pós-graduação, especialmente a Thais, a Patricia, a Luciana e o Thiago, pelo apoio, paciência e companheirismo em todas as horas. Aos demais colegas, professores e funcionários do departamento, pelos bons momentos que vivenciamos juntos.

Ao laboratório IMPAR, em especial ao Prof. Ricardo Gazinelli, pela disponibilidade de equipamentos e reagentes. À Professora Edel e ao professor Flávio, por serem importantes colaboradores. À Prof.^a Patrícia, por disponibilizar o Leitor de Elisa, no laboratório Conceição Machado. Ao Leonardo, do laboratório do Prof. Ary, pela prontidão em me ajudar todas as vezes que precisei do microscópio de fluorescência. À Olga e a Ivete, do laboratório Cemel, pela colaboração.

Às agências financiadoras Capes, INCTV e Fapemig, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Em especial à minha família, ao meu pai e minha irmã, por serem a razão do meu viver; a tia Bete, tio Onésimo, Liliane, Leandro e Leonel, por serem pessoas tão importantes na minha vida e apoiarem minhas escolhas; ao meu marido Jano, por tudo que representa pra mim, e principalmente pelos momentos de alegria, tristeza, nervosismo e ansiedade compartilhados comigo nessa etapa; e aos demais familiares pelo carinho.

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema imune e receptores do tipo Toll.....	1
1.2 Macrófagos	7
1.3 NF- κ B	8
1.4 Regulação negativa de NF- κ B	11
1.5 Proteínas Ras.....	13
1.6 Fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs).....	17
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Células	23
4.1.1 HEK293A e HEK293T	23
4.1.2 RAW264.7.....	24
4.1.3 THP-1.....	24
4.2 Estimulação celular.....	24
4.3 Agonistas de receptores do tipo Toll	25
4.4 Obtenção do RNA total.....	25
4.5 Reação de síntese da primeira fita de cDNA	26
4.6 RT-PCR semi-quantitativa.....	26
4.7 Western Blot	27
4.7.1 Obtenção de extratos celulares	27
4.7.2 Quantificação dos extratos celulares (Bradford, 1976).....	28
4.7.3 Fracionamento eletroforético e transferência	28
4.7.4 Anticorpos	29
4.7.5 Imunoblot e revelação	29

4.8 Plasmídeos	30
4.9 Transformação bacteriana.....	30
4.10 Obtenção em pequena escala (Miniprep) de DNA plasmidiano.....	31
4.11 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano	32
4.12 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano livre de endotoxinas (endo-free).....	32
4.13 Transfecção.....	33
4.13.1 Método polímero catiônico.....	33
4.13.2 Método não-polissômico	34
4.13.3 Método lipossômico	34
4.14 Estabelecimento de condições de transfecção para os estudos funcionais de RasGEF1b em células RAW264.7.....	35
4.15 Ensaio de gene repórter.....	35
4.16 Produção de partículas de lentivírus para o silenciamento de RasGEF1b em macrófagos murinos.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll	39
5.2 Cinética da expressão do mRNA de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com agonistas dos receptores do tipo Toll	41
5.3 Expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll.....	44
5.4 Estabelecimento do reagente de transfecção para ser utilizado nos estudos funcionais de RasGEF1b em células RAW264.7	45
5.5 Efeito de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B em macrófagos murinos	47
5.6 Expressão de RasGEF1b em células HEK293A.....	50
5.7 Expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos infectados com partículas de Lentivírus	52
5.8 Efeito do silenciamento de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B em macrófagos murinos	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61
9. ANEXO.....	69

ABREVIATURAS

- BSA – Albumina bovina sérica
- DAMPs – Padrões moleculares associados a danos
- DMEM – Meio Eagle modificado de Dulbecco
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- GAP – Proteína ativadora de GTPase
- GDP – Guanosina difosfato
- GEF – Fator de troca de nucleotídeo guanina
- GPI – Glicofosfatidilinositol
- GTP – Guanosina trifosfato
- GTPases – Pequenas proteínas GTPases
- LB – Meio de cultura Luria Bertani
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos
- MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide
- NF- κ B – Fator nuclear KappaB
- PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos
- PBS – Salina tamponada em fosfato
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PVDF – Polivinilidenofluoreto
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão dodecil sulfato de sódio
- TBS-T – Salina tamponada em Tris adicionada com Tween
- TIRAP – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
- TRAF – Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
- TRAM – Molécula adaptadora relacionada à TRIF
- TRIF – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon- β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos receptores IL-1R e TLRs.....	2
Figura 2: Vias de sinalização dos TLRs humanos.....	6
Figura 3: Ativação de NF- κ B e seu papel regulador..	14
Figura 4: Subfamílias das proteínas Ras em humanos	16
Figura 5: Modelo esquemático da ativação de Ras.	10
Figura 6: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com LPS (1 μ g/ml).....	40
Figura 7: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com poly (I:C) (50 μ g/ml)..	40
Figura 8: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com diferentes agonistas dos receptores do tipo Toll (TLRs).....	42
Figura 9: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com LPS (1 μ g/ml).....	43
Figura 10: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com LPS (1 μ g/ml).....	44
Figura 11: Ensaio de eficiência de transfecção em macrófagos murinos.....	46
Figura 12: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito da super-expressão de RasGEF1b sobre a cinética de ativação de NF- κ B induzida por agonista TLR4 em células RAW264.7.....	48
Figura 13: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito de quantidades crescentes de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonista TLR4 em células RAW264.7.	49
Figura 14: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em células HEK293A co-transfectadas com pFLAG-RasGEF1b-YFP e shRNAs.....	51
Figura 15: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos infectados com partículas de Lentivírus após a seleção com Puromicina..	53
Figura 16: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito do silenciamento de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonistas TLRs em células RAW264.7.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Receptores do tipo Toll, localização e seus principais ligantes.....	5
Tabela 2: Iniciadores utilizados durante o estudo	27
Tabela 3: Plasmídeos utilizados durante esse estudo	30

RESUMO

RasGEF1b, um fator de troca de nucleotídeos guanina, foi descrito inicialmente como um dos primeiros exemplos de um GEF cuja expressão é induzida por agonistas inflamatórios de receptores do tipo Toll (TLRs). Uma vez que os estudos sobre RasGEF1b se basearam principalmente em análises dos níveis do seu mRNA, tivemos como um dos objetivos deste trabalho avaliar a expressão proteica de RasGEF1b em células do sistema imune, especialmente em células RAW264.7, uma linhagem de macrófagos murinos. Além disso, analisamos também a expressão do mRNA e da proteína RasGEF1b em células THP-1, uma linhagem de promonócitos humanos. Nossos resultados mostram que ocorre a expressão do mRNA e da proteína RasGEF1b em resposta à estimulação com agonistas inflamatórios dos receptores TLR2, TLR3 e TLR4.

Para investigar o papel de RasGEF1b na resposta imune inata, decidimos iniciar estudos funcionais em células RAW264.7, de modo a fornecer evidências do papel de RasGEF1b nessas células. Uma vez que RasGEF1b é uma proteína intracelular e não há ferramentas disponíveis como ativadores ou inibidores específicos para estudar sua função, é necessário empregar procedimentos de transfecção de plasmídeos que levem ao aumento ou silenciamento de sua expressão nas células de interesse. Entretanto, macrófagos são células que apresentam uma permissividade muito baixa à transfecção. Com o intuito de solucionar esse problema, realizamos um ensaio no qual avaliamos alguns reagentes que poderiam ser utilizados em ensaios de transfecção nessas células. Dentre os reagentes de transfecção testados, observamos que a Lipofectamine 2000 foi o reagente mais eficaz e que causou a menor toxicidade para as células.

Estudos conduzidos em nosso laboratório têm demonstrado que RasGEF1b é uma proteína que exerce um papel regulador negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada por componentes da via de sinalização de TLRs e alguns agonistas de TLRs, como o LPS e o poly (I:C). Entretanto, os estudos até o momento têm sido conduzidos em células HEK293 epiteliais humanas, de pouca relevância imune, através de ensaios com a superexpressão de RasGEF1b. Portanto, como outro objetivo em nosso estudo, fomos investigar o papel de RasGEF1b sobre a regulação da ativação de NF- κ B em macrófagos murinos. Para isso, ensaios de gene repórter foram realizados em células RAW264.7 para avaliarmos tanto o efeito do ganho quanto da perda-de-função de

RasGEF1b. Nos estudos de ganho-de-função, observamos que a transfecção de RasGEF1b nas células resulta em inibição da ativação de NF- κ B induzida por LPS (agonista TLR4). Já nos estudos de perda-de-função conduzidos com sequências curtas de RNAs tipo grampo, nós observamos que quando a expressão de RasGEF1b é silenciada nas células, mesmo que transientemente, a ativação de NF- κ B induzida por LPS ou Pam3CSK4 encontra-se elevada. Esses resultados confirmam que RasGEF1b exerce um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada por agonistas de TLRs.

Considerando as dificuldades dos procedimentos de transfecção dos macrófagos murinos e que estudos funcionais poderiam ser realizados objetivando o silenciamento da expressão de RasGEF1b de maneira estável e mais efetiva do que aquela obtida com a transfecção transiente, iniciamos procedimentos para a geração de partículas virais de Lentivírus para os ensaios de transdução (infecção) das células RAW264.7. Entretanto, ao final do procedimento da geração de partículas virais de Lentivírus em células HEK293T e infecção subsequente dos macrófagos RAW264.7 com as partículas de Lentivírus, não obtivemos sucesso no silenciamento da expressão de RasGEF1b. Portanto, mais estudos são necessários para promover o silenciamento de RasGEF1b de maneira estável, pois assim o seu papel poderá ser melhor estudado e compreendido em macrófagos e outros tipos celulares.

Enfim, estudos funcionais poderão contribuir para o entendimento da função de RasGEF1b na regulação da resposta imune inata e também no estabelecimento de medidas preventivas ou intervenções terapêuticas para doenças cuja patogênese esteja relacionada com a ativação exacerbada de NF- κ B como, por exemplo, doenças inflamatórias crônicas e o câncer.

ABSTRACT

RasGEF1b, a guanine nucleotide exchange factor, was described initially as the first example of a GEF whose expression is induced by inflammatory agonists of Toll-like receptors (TLRs). As RasGEF1b expression studies have been predominantly based on mRNA analysis, one of the aims of our study was to evaluate its protein expression in immune cells, especially in RAW264.7 cells, a mouse macrophage cell line. In addition, we also analyzed the mRNA and protein expression of RasGEF1b in THP-1 cells, a human promonocytic cell line. Our results show that expression of RasGEF1b at the mRNA and protein levels occurs in response to stimulation with inflammatory agonists of TLR2, TLR3 and TLR4 receptors.

To investigate the role of RasGEF1b in the innate immune response, we have initiated functional studies in RAW264.7 cells, in order to provide evidence of the role of RasGEF1b in these cells. As RasGEF1b is an intracellular protein and no specific tools such as activators or inhibitors are available to carry out functional studies, procedures such as plasmid transfections should be employed that lead to increased or silencing of the expression in the cells of interest. However, macrophages are cells that have a very low permissiveness to transfection. In order to solve this problem, we carried out a study where some reagents that could be used in transfection assays in these cells were evaluated. Among the transfection reagents tested, we observed that Lipofectamine 2000 was the most effective reagent, and that caused the lowest toxicity to the cells.

Current studies in our laboratory have demonstrated that RasGEF1b is a protein that exerts a negative regulatory function on the activation of NF- κ B mediated by signaling pathway components of TLRs as well as by TLRs agonists, such as LPS and poly (I:C). However, these studies have been so far performed in human epithelial HEK293 cells, of little immune relevance, by assays with the overexpressing RasGEF1b. Therefore, as another objective in our study, we investigated the role of RasGEF1b in regulating the activation of NF- κ B in murine macrophages. To do so, gene reporter assays were carried out in RAW264.7 cells to assess both gain and loss-of-function of RasGEF1b. In the studies of gain-of-function, we observed that transfection of RasGEF1b in cells results in inhibition of NF- κ B activation induced by LPS (TLR4 agonist). In the studies of loss-of-function performed with short hairpin

RNA sequences, we observed that when the expression of RasGEF1b is knocked-down in cells, even transiently, the activation of NF- κ B induced by LPS or Pam3CSK4 is increased. These results confirm that RasGEF1b exerts a negative regulatory effect on the activation of NF- κ B mediated by TLRs agonists.

Considering the difficulties of transfection procedures of murine macrophages and that functional studies could be carried out by aiming the knocking-down of RasGEF1b in a stable fashion and more effectively obtained rather than by transient transfection, we initiated procedures to generate viral particles Lentivirus for transduction (infection) assays in RAW264.7 cells. However, at the end of the procedure to generate viral particles Lentivirus in HEK293T cells with subsequent infection of RAW264.7 macrophages with the particles, we have not been well succeeded in silencing the expression of RasGEF1b. Therefore, further studies are required to promote the silencing of RasGEF1b in a stable manner, so that its role can properly be better studied and understood in macrophages and other cell types.

Finally, functional studies may contribute to understand the function of RasGEF1b in regulating the innate immune response and also in the establishment of preventive measures or therapeutic interventions in diseases whose pathogenesis is related with the exacerbated activation of NF- κ B as, for example, inflammatory chronic diseases and cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema imune e receptores do tipo Toll

O sistema imune de mamíferos é dividido em dois componentes: inato e adaptativo. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e é mediado por fagócitos, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Já o sistema imune adaptativo está envolvido na eliminação dos patógenos numa fase tardia da infecção como também na geração de memória imunológica, através dos linfócitos T e B. Assim, o sistema imune é capaz de discriminar entre o “próprio” e o “não-próprio” (Akira et al., 2006; McGettrick & O’Neill, 2010; Takeda & Akira, 2005).

O sistema imune inato é filogeneticamente conservado e está presente em todos os organismos multicelulares, enquanto o sistema imune adaptativo, por ser altamente sofisticado, é observado somente nos vertebrados (Hoffmann et al., 1999; Takeda et al., 2003; Takeda & Akira, 2005).

A imunidade inata foi considerada inicialmente como um sistema não-específico de reconhecimento de microrganismos, porém a descoberta dos receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) no final da década de 90 mostrou que o reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato é, na verdade, específico.

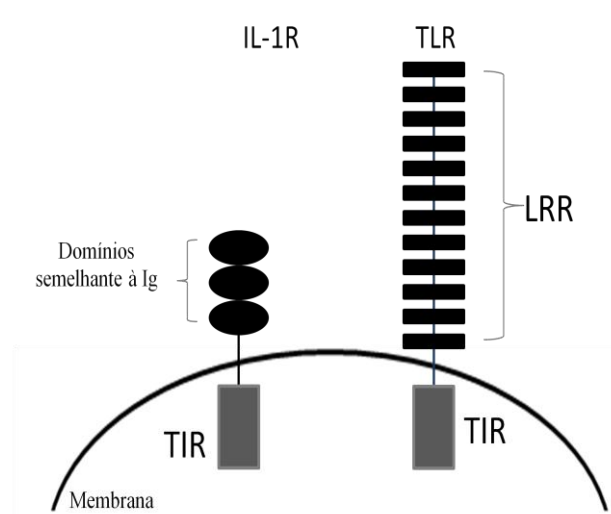
Os TLRs são receptores de reconhecimento de padrões (PPRs, do inglês *Pattern-recognition receptors*) e são sensores cruciais de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) (Kawai & Akira, 2010; Akira et al., 2001; Janeway & Medzhitov, 2002). Além dos PAMPs, os TLRs também reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) (Takagi, 2011; Bianchi, 2007; Matzinger, 1994). Após o reconhecimento de ligantes específicos, os TLRs recrutam moléculas adaptadoras citoplasmáticas para ativarem diferentes vias de sinalização, que subsequentemente disparam respostas inflamatórias e imunológicas, permitindo uma resposta imediata às infecções e o início de uma imunidade adaptativa duradoura (Albiger et al., 2007).

Anderson et al (1985) identificaram um receptor em drosófilas essencial na regulação da polaridade dorsoventral durante a embriogênese, denominado Toll. Posteriormente, Lemaitre et al (1996) demonstraram que mutantes de drosófilas com a

perda de função no receptor Toll eram altamente susceptíveis à infecção fúngica assim como uma expressão defeituosa de um peptídeo antifúngico. Um ano depois, um receptor homólogo ao Toll em *Drosophila* foi identificado em mamíferos, em um estudo onde foi demonstrada a habilidade do Toll em induzir a ativação de um fator de transcrição central na resposta imune e expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. Então, esse receptor foi chamado de receptor do tipo Toll (Medzhitov et al., 1997).

Até hoje, 13 TLRs foram identificados em mamíferos, sendo 10 TLRs funcionalmente caracterizados em humanos (TLR1-10) e 11 TLRs funcionalmente caracterizados em camundongos (TLR1-7, TLR9, TLR11-13). Dentre esses, os TLR1 a TLR9 são conservados em ambas as espécies. Em camundongos, o TLR10 não é funcional devido à inserção de um retrovírus, mas expressam TLR11, TLR12 e TLR13. Esses últimos estão ausentes no genoma humano (Takagi, 2011; Kawai & Akira, 2010; Akira et al., 2006).

Os receptores do tipo Toll são proteínas transmembranas do tipo I caracterizados por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine rich repeats*) que reconhecem os PAMPs ou DAMPs e um domínio intracelular ou citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, do inglês *Interleukin-1 receptor*), conhecido como domínio TIR (Toll/IL-1R), o qual é requerido para transdução do sinal (Figura 1) (Takagi, 2011; Kawai & Akira, 2010; Albiger et al., 2007; Akira et al., 2006).



Adaptado de: Albiger et al., 2007

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).

Os TLRs são expressos em várias células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos B e tipos específicos de linfócitos T, e também em células não-imunes como fibroblastos e células epiteliais. A expressão deles não é estática, podendo ser rapidamente modulada em resposta a patógenos, citocinas, dentre outros (Akira et al., 2006). Eles podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua localização na célula e seus ligantes. Um grupo é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 (humano) e TLR11 (murino), que são expressos na superfície celular e são capazes de reconhecer lipídeos, lipoproteínas e proteínas de bactérias, vírus, parasitas e fungos; o outro grupo é composto por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, os quais são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares como as do retículo endoplasmático, endossomos e endolisossomos e reconhecem ácidos nucleicos de bactérias e vírus. Além dos PAMPs, os TLRs também reconhecem ligantes endógenos (DAMPs - produzidos por células necróticas, em um tecido lesado ou em certas condições patológicas) e ligantes sintéticos, mostrados na tabela 1 (Manavalan et al., 2011; Kumar et al., 2011; Takagi, 2011; Kawai & Akira, 2010).

O papel dos TLRs é funcionar como sensores de PAMPs ou DAMPs para iniciar respostas imunes no organismo. A interação dos TLRs com seus ligantes provoca o recrutamento de diferentes proteínas adaptadoras que apresentam também em suas estruturas o domínio TIR. As proteínas adaptadoras são: o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88, do inglês *Myeloid differentiation factor 88*), a proteína adaptadora indutora de IFN-beta que contém o domínio TIR (TRIF, do inglês *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta*), também conhecida como TICAM-1, a proteína adaptadora que contém o domínio TIR ou também chamada de molécula adaptadora do tipo MyD88 (TIRAP/Mal, do inglês *TIR domain-containing adapter protein/MyD88-like adaptor*) e a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adapter molecule*). Com a exceção do TLR3, todos os TLRs utilizam MyD88 para a transdução de sinais após reconhecimento do ligante. TLR4 usa tanto MyD88 quanto TRIF, ao passo que TLR3 usa somente TRIF. Esse recrutamento das proteínas adaptadoras dispara cascatas de vias de sinalização que levam à ativação de fatores de transcrição como NF-kappaB (do inglês *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene*

enhancer in B-cells) e os fatores de regulação de interferons (IFNs) (IRF3/7, do inglês *Interferon regulatory factor*). Adicionalmente, esse recrutamento também ativa proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *Mitogen-activated protein kinases*) como p38, JNK e ERK1/2, que ativam o fator de transcrição AP-1. Esses fatores regulam a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas co-estimuladoras e interferons do tipo I. As vias de sinalização que emanam dos TLRs podem ser classificadas como vias dependentes de MyD88 ou vias dependentes de TRIF, como demonstrado na figura 2. As moléculas adaptadoras TIRAP/Mal e TRAM são necessárias para a ativação das vias dependentes de MyD88 e dependentes de TRIF, respectivamente (Takagi, 2011, Kumar et al., 2009, Takeda & Akira, 2005).

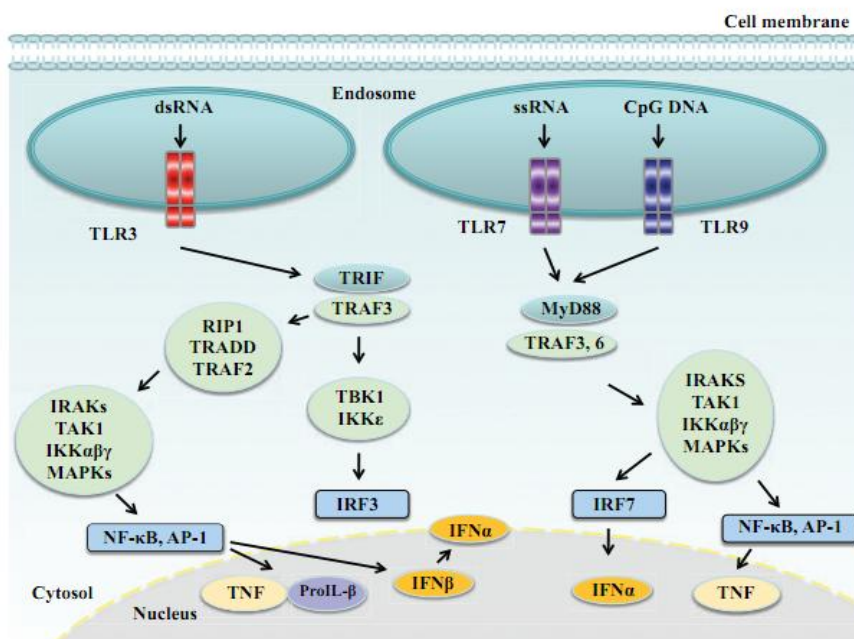
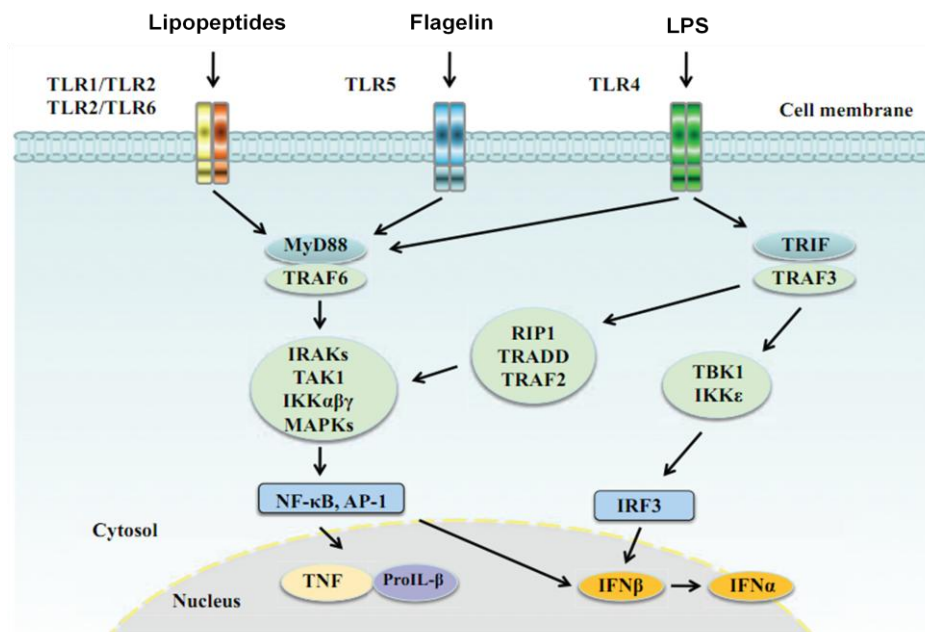
Desde a última década, os TLRs têm sido considerados como reguladores-chave das respostas imunes inata e adaptativa, pois a ativação da imunidade inata é o primeiro passo para que se estabeleça uma imunidade adaptativa eficaz e duradoura. Entretanto, algumas evidências indicam que moléculas endógenas produzidas em certas condições patológicas, em um tecido lesado ou por células necróticas são capazes de ativar receptores do tipo Toll, resultando no desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias e autoimunes. Produtos liberados por células em processo de morte, como o complexo cromatina-DNA podem ativar TLR7 e TLR9, levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes sistêmicas. Outros produtos liberados em um tecido lesado ou numa inflamação podem ativar TLR2 ou TLR4 ou ambos, como por exemplo, proteínas de choque térmico e ácido hialurônico (Ioannou & Voulgarelis, 2010; Kawai & Akira, 2010).

Portanto, são necessários mais estudos e um melhor entendimento sobre os TLRs, seus ligantes e a regulação das vias de sinalização que são ativadas através desses receptores.

Tabela 1: Receptores do tipo Toll, localização e seus principais ligantes

TLRs	Localização	Ligantes		
		Exógenos	Endógenos	Sintéticos
TLR1	Superfície celular	Lipopeptídeos		Triacil lipopeptídeos
TLR2	Superfície celular	Lipoproteínas/lipopeptídeos Peptídeoglicanos Glicolipídeos Proteínas virais estruturais Zymosan	HSP60 HSP70 Ácido hialurônico	Diacil e triacil lipopeptídeos
TLR3	Endossomo	dsRNA ssRNA	mRNA	Poly (I:C)
TLR4	Superfície celular	Lipopolissacarídeos Proteínas de envelope (vírus) Glicoinositolfosfolipídeos	HSP60 HSP70 HMGB1 Fibrinogênio	
TLR5	Superfície celular	Flagelina		Diacil lipopeptídeos
TLR6	Superfície celular	Diacil lipopeptídeos Ácido lipotético Zymosan		Diacil lipopeptídeos
TLR7	Endolisossomo	ssRNA	RNA endógeno	Oligonucleotídeos
TLR8	Endolisossomo	ssRNA	RNA endógeno	Oligonucleotídeos
TLR9	Endolisossomo	CpG-DNA (bactérias e vírus)	DNA endógeno	CpG oligodeoxinucleotídeos
TLR11	Superfície celular	Proteína tipo profilina (<i>T.gondi</i>)		

Modificado de: Manavalan et al., 2011; Kumar et al., 2011



Takagi, 2011.

Figura 2: Vias de sinalização dos TLRs humanos. A sinalização através dos TLRs é dividida em vias MyD88-dependente e TRIF-dependente. MyD88 promove o recrutamento de TRAF3/6, IRAKs, TAK1, IKKs e MAPKs. Fosforilações subsequentes e ubiquitinações promovem a translocação para o núcleo de fatores de transcrição como NF-κB e AP-1, induzindo a expressão de moléculas inflamatórias. TRIF recruta TRAF3 que interage com RIP1 e outras proteínas da via para a ativação de NF-κB e AP-1; ou interage com TBK-1 via TRAF3 para a ativação de IRF3/7, os quais translocam para o núcleo e induzem a ativação transcricional de interferons (IFNs) do tipo I.

1.2 Macrófagos

Os macrófagos podem constituir mais de 15% do conteúdo celular dos tecidos. Essas células do sistema imune inato realizam funções importantes em condições fisiológicas e também patológicas (Martinez, 2011). Eles foram inicialmente reconhecidos por Elie Metchnikoff como células fagocíticas responsáveis pela eliminação de patógenos e limpeza em uma grande variedade de organismos, desde invertebrados a vertebrados (Metchnikoff, 1905; Martinez et al., 2009).

Sabe-se hoje que os macrófagos desempenham funções bem estabelecidas na resposta inicial do hospedeiro contra patógenos, como também na homeostase tecidual, coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo (Martinez et al., 2009).

Essas células reconhecem sinais de perigo através de receptores capazes de induzir programas de ativação especializados (Martinez et al., 2009, Martinez, 2011). Como já mencionado anteriormente, os TLRs são sensores cruciais de PAMPs e DAMPs expressos pelos macrófagos (Mosser & Edwards, 2008; Tarang et al., 2007). Uma vez ativados em resposta a agentes infecciosos ou estímulos pró-inflamatórios, os macrófagos secretam uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios incluindo interleucina-1 β , interleucina-6, TNF (do inglês, *Tumor necrosis factor*), óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (Pan et al., 2011; Mosser & Edwards, 2008).

A ativação dos macrófagos depende do seu grau de diferenciação, do tecido onde ocorre a inflamação e da presença de citocinas, PAMPs ou DAMPs (Martinez, 2011). A ativação clássica é induzida por interferon- γ ou moléculas microbianas, como o LPS, e o fenótipo adquirido é M1 (macrófagos M1, pela analogia com os linfócitos Th1). Essa ativação é importante para a eliminação de patógenos intracelulares. Na ativação clássica dos macrófagos, vários elementos regulatórios presentes na região promotora do DNA de diversos genes são importantes, sobretudo aqueles que apresentam sítios de ligação para o NF- κ B e o IRF-3 (do inglês, *Interferon regulatory transcription factor*). A ativação alternativa é induzida por interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), importante na resposta imune contra parasitas extracelulares, e o fenótipo das células é M2 (macrófagos M2). Esse segundo tipo de ativação altera a capacidade e qualidade dos macrófagos em responder a ligantes microbianos ou citocinas (Pluddemann et al., 2011; Martinez, 2011; Martinez et al., 2008).

1.3 NF- κ B

Sen & Baltimore (1986) descreveram NF- κ B como um fator de transcrição nuclear que se ligava a uma região reguladora do gene da cadeia leve *kappa* (sítio κ B) em células B. Desde então, o NF- κ B se tornou um dos fatores de transcrição mais estudados, pois é um fator central e essencial na resposta imune inata e adaptativa. Além disso, sabe-se hoje que sua ativação tem um papel fundamental em vários processos biológicos, como na inflamação, na apoptose, na proliferação celular e em várias patologias, inclusive no câncer (Siebenlist et al., 2005; Karin & Greten, 2005; Gilmore, 2006; Kawai & Akira, 2007; So & Ouchi, 2010; Tilstra et al., 2011).

NF- κ B é uma proteína dimérica, cujos monômeros pertencem à família das proteínas Rel/ NF- κ B. Em mamíferos, essa família é constituída por p105 (NF- κ B1; o precursor de p50), p100 (NF- κ B2; o precursor de p52), Rel/cRel, Rel-A (também conhecido como p-65) e Rel-B. Essas proteínas se dimerizam para formar o NF- κ B. Todas as combinações homo ou heterodímeras são possíveis e contribuem para a atividade de NF- κ B, com exceção da Rel-B, que interage apenas com p50 ou p52. Todos os membros da família possuem um conservado domínio de homologia Rel (RHD, do inglês *Rel-homology domain*), de aproximadamente 300 aminoácidos, o qual apresenta três motivos: um para a ligação específica à sequências de DNA; um para a dimerização; e um para a localização nuclear, conhecido como sinal de localização nuclear (NLS, do inglês *Nuclear-localization signal*). O domínio RHD permite a ligação de NF- κ B a sequências no DNA conhecidas como sítios κ B (5-GGGRNNYYCC-3, onde R representa A ou G; Y representa C ou T; N representa qualquer nucleotídeo) presente na região promotora de vários genes (Kawai & Akira, 2007; Gilmore, 2006; Siebenlist et al., 2005; Karin & Greten, 2005). As proteínas Rel, Rel-A e Rel-B possuem também o domínio de transativação (TAD, do inglês *Transactivation domain*), responsável pela ativação de promotores gênicos, ao interagir com o complexo transcricional da célula (Siebenlist et al., 2005).

Em células não estimuladas, o NF- κ B é mantido inativo no citoplasma pela interação com membros da família de proteínas inibitórias I κ B. A família I κ B é constituída por sete membros: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, I κ B ζ e I κ BNS. Cada membro dessa família possui domínios com repetições de anquirina que se ligam ao NF- κ B. As proteínas inibitórias I κ B α , I κ B β , I κ B γ e I κ B ϵ interagem, através de seus domínios de anquirina, com dímeros de NF- κ B, mascarando um dos sinais de localização nuclear para prevenir a translocação do NF- κ B para o núcleo. As proteínas

atípicas BCL-3, I κ B ζ e I κ BNS não são expressas nas células até que ocorra um estímulo. Quando isso ocorre, elas são encontradas no núcleo e interagem com NF- κ B para regular a transcrição de genes (Siebenlist et al., 2005; Kawai & Akira, 2007; Ghosh & Hayden, 2008).

Existem vários sinais que ativam NF- κ B (Figura 3). Ligantes de TLRs como LPS via TLR4/MD-2, flagelina via TLR5, CpG via TLR9 são potentes ativadores. O TNF e a IL-1 β , duas principais citocinas pró-inflamatórias, são além de ativadores após sua ligação a receptores específicos, também alvos transcripcionais de NF- κ B. Outros ativadores incluem receptores de antígenos encontrados em células imune adaptativas, como o receptor de células T (TCR) e o receptor de células B (BCR), além de outros receptores como CD40, BAFFR, RANK e LT- β R. Adicionalmente, fatores de crescimento, como exemplo, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) ativa NF- κ B (Tilstra et al., 2011; Siebenlist et al., 2005).

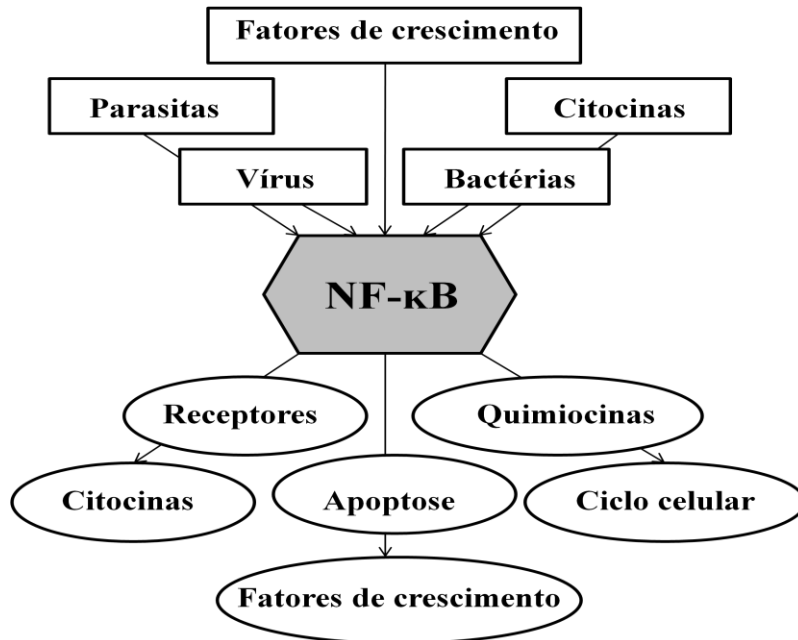
A ativação de NF- κ B acontece através de duas principais vias: a via clássica (canônica) e a via não-clássica ou alternativa (não-canônica).

Entre as vias de sinalização que culminam na ativação clássica de NF- κ B, está a via mediada pelos receptores do tipo Toll. Todos os TLRs ativam NF- κ B através da via dependente de MyD88 ou TRIF. MyD88 ativa NF- κ B através do recrutamento e ativação de IRAKs-TRAF6/3-TAK1-IKK α/β , enquanto TRIF ativa NF- κ B através do recrutamento e ativação de TRAF6-RIP1-TAK1-IKK α/β . Em células não estimuladas, o heterodímero p65-p50 é mantido no citoplasma inativo pela interação com proteínas I κ Bs. Após a estimulação do TLR com seu respectivo ligante, como, por exemplo, o LPS, ocorre o recrutamento de MyD88 e TRIF, disparando a via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF, respectivamente. Na via dependente de MyD88, essa proteína interage com membros da família de proteínas cinases como IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAK-M. Uma vez IRAK4 e IRAK1 (do inglês *IL-1R-associated kinase 4/1*) tenham sofrido fosforilação, elas se dissociam de MyD88 e interagem com TRAF6. Em seguida TRAF6 ativa um complexo formado pela cinase TAK1 (do inglês *Transforming growth factor- β activated protein kinase 1*) e proteínas ligadas à TAK1 como TAB1, TAB2 e TAB3 (do inglês *TAK-1 binding protein*). Esse complexo então ativa o complexo IKK, o qual é composto por um trio de cinases formado por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma subunidade regulatória, IKK γ (também conhecida como NEMO). IKK γ induz a fosforilação das subunidades IKK α e IKK β . Essas subunidades então são liberadas do complexo e fosforilam as proteínas inibitórias I κ B α

e $\text{I}\kappa\text{B}\beta$. Após a fosforilação, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ é poliubiquitinada e degradada pelo proteassomo 26S. Essa degradação permite a translocação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ para o núcleo, resultando na transcrição de genes alvos (Tilstra et al., 2011; Kawai & Akira, 2007)

A via de sinalização alternativa ocorre no desenvolvimento de órgãos linfóides, o qual é requerido para o desenvolvimento de células B e T. Nela o heterodímero formado é o p52-Rel-B . Essa via é desencadeada por um número limitado de receptores (CD40 , $\text{LT}\beta$, BAFF , RANK). Um estímulo via qualquer um desses receptores, ativa o homodímero $\text{IKK}\alpha$, e não $\text{IKK}\gamma$ ou $\text{IKK}\beta$. Esse complexo fosforila p100 , ocasionando seu processamento em p52 . Rel-B e p52 formam um heterodímero e translocam para o núcleo para regular a transcrição de genes alvos (Tilstra et al., 2011; Kawai & Akira, 2007).

Centenas de genes são reguladas por $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Entre esses estão incluídos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimuladoras, imunoreceptores, como também proteínas em resposta a estresse, fatores de crescimento e seus receptores. A maioria dos genes regulados pelo $\text{NF-}\kappa\text{B}$ estão envolvidos na resposta imune, inflamação, apoptose e proliferação celular, como mostrado na Figura 3 (Karen & Greten, 2005; Gilmore, 2006; Kawai & Akira, 2007; Tilstra et al., 2011).



Modificado de: Tilstra et al., 2011.

Figura 3: Ativação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e seu papel regulador. O $\text{NF-}\kappa\text{B}$ é ativado por diferentes estímulos e regula a expressão de genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa, e em vários processos biológicos, como na inflamação, apoptose e ciclo celular.

1.4 Regulação negativa de NF- κ B

As proteínas I κ Bs são as principais reguladoras da ativação de NF- κ B. Elas impedem a translocação de NF- κ B para o núcleo ao mascarar os sinais de localização nuclear (NLS) presentes em sua estrutura. I κ B α é a proteína inibitória mais bem caracterizada, uma vez que ela que inibe a translocação do heterodímero p65-p50 para o núcleo. Já as proteínas I κ B atípicas inibem a transcrição pela ligação ao NF- κ B no núcleo, como exemplo, BCL-3 que estabiliza p50 no DNA, bloqueando a ligação de outras subunidades de NF- κ B à região promotora do gene e impedindo a transativação positiva realizada por alguns membros da família Rel/NF- κ B, como por exemplo, Rel-A (Tilstra et al., 2011). Adicionalmente, I κ B α recém sintetizada é capaz de se translocar para o núcleo, onde se associa ao dímero p65-p50 levando à sua inativação e exportação para o citoplasma (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Isso promove uma retro-alimentação negativa que impede a ativação irreversível de NF- κ B. Além disso, já foi demonstrado que após uma ativação inicial induzida por citocinas pró-inflamatórias ou estímulo microbiano, Rel-A associado à região promotora do DNA é marcado para degradação no proteossoma, finalizando a sinalização via NF- κ B (Natoli & Chiocca, 2008).

A cinase inibitória de κ B, a IKK γ (do inglês *Inhibitor of κ B kinase gamma*), conhecida também como modulador essencial do fator nuclear κ B (NEMO, do inglês *Nuclear factor κ B essencial modulator*), é um importante componente do complexo IKK, constituído também por IKK α e IKK β . Após as células serem estimuladas com agentes que levam à ativação de NF- κ B, o complexo IKK catalisa a fosforilação de proteínas inibitórias I κ Bs, que é um importante passo para que ocorra a ativação de NF- κ B (Shifera, 2010).

Proteínas que se ligam à IKK γ e levam a uma supressão da atividade do complexo IKK, e conseqüentemente a uma regulação negativa de NF- κ B têm sido identificadas. Dentre alguns exemplos dessas proteínas estão A20, ABIN-1 e CYLD, as quais promovem a deubiquitinação de IKK γ (Shifera, 2010). É importante ressaltar que a ubiquitinação é uma modificação pós-tradução reversível, que consiste na adição de um ou mais monômeros de ubiquitina a uma proteína alvo, a qual será direcionada ao proteossoma para ser degradada. Portanto, proteínas como A20, ABIN-1 e CYLD são deubiquitinases, ou seja, degradam a ubiquitina que foi adicionada a uma proteína-alvo. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado numerosas funções não-proteolíticas da

ubiquitinação, incluindo o transporte de proteínas e ativação de cinases e proteases (Harhaj & Dixit, 2011).

A proteína A20 (TNFAIP3) foi identificada como uma proteína induzida por TNF em células humanas (Opipari et al., 1990). Mauro e colaboradores (2006) mostraram que A20 deubiquitina IKK γ e inibe a ubiquitinação de IKK γ induzida por TNF. Eles mostraram que essa atividade de A20 é necessária para inibir a ativação de NF- κ B. Zhang et al (2000) mostraram que a superexpressão de A20 parece aumentar o recrutamento do complexo IKK ao receptor de TNF. Entretanto esse recrutamento está associado com a inibição desse complexo e a supressão da ativação de NF- κ B em seguida à estimulação com TNF. Então é possível que a interação entre A20 e IKK γ provê um mecanismo de retro-alimentação negativa para regular a atividade de NF- κ B seguida da sua ativação inicial por TNF. Stilo e colaboradores (2008) também mostraram que A20 inibe a ubiquitinação de IKK γ e a ativação de NF- κ B via receptor de células T (TCR). A20 também é um importante regulador negativo da ativação de NF- κ B mediada por receptores do tipo Toll. Boone et al (2004) mostraram que a ativação de A20 é rapidamente induzida por LPS (ligante TLR4) em macrófagos derivados de medula óssea; que macrófagos deficientes de A20 produzem mais citocinas pró-inflamatórias em resposta a estimulação com LPS; e que a ativação de NF- κ B é elevada e persistente em macrófagos deficientes de A20. Além disso, parece que A20 atua não somente no complexo IKK, mas também na deubiquitinação de TRAF6.

ABIN-1 (do inglês *A20 binding inhibitor of NF- κ B 1*) é uma proteína que se liga a A20 e, como A20, inibe a ativação de NF- κ B. Segundo Mauro e colaboradores (2006) ABIN-1 se liga a IKK γ e promove sua ligação a A20. Essa interação facilita a deubiquitinação de IKK γ por A20. A deubiquitinação parece ser requerida na presença de ABIN-1. Então ABIN-1 pode servir como uma molécula adaptadora na interação de A20 com IKK γ .

CYLD (do inglês *Cylindromatosis protein*), uma proteína supressora de tumor mutada em pacientes com Cilindromatose, interage com IKK γ e remove ubiquitinas adicionadas a ele, levando a inibição de NF- κ B (Shifera, 2010). De acordo com Kovalenko et al (2003), CYLD interage diretamente com TRAF2, causa a deubiquitinação dessa proteína e inibe a ativação de IKK γ por TRAF2. Estudos mostram que CYLD é essencial para prevenir a ativação espontânea de NF- κ B em linfócitos T e B periféricos, sendo importante para a manutenção da homeostase do sistema imune (Harhaj & Dixit, 2011). Zhang et al (2006) geraram camundongos

deficientes de CYLD e mostraram que a deficiência de CYLD está associada com o aumento da ubiquitinação de IKK γ e TRAF2 e uma ativação aumentada de NF- κ B em células T e em macrófagos após serem estimuladas via TCR e com LPS, respectivamente.

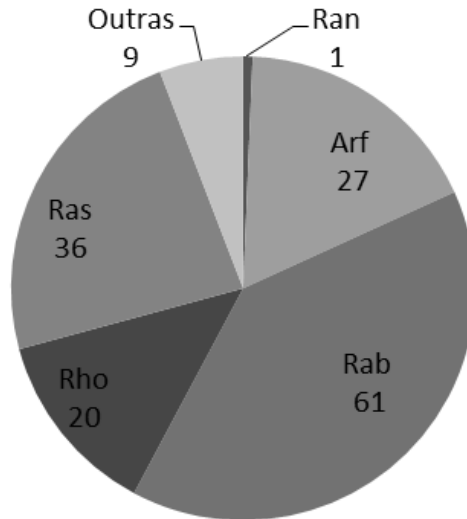
Outros estudos demonstraram que a proteína TRIM30 α , membro da família de proteínas TRIM (do inglês *Family of tripartite-motif-TRIM proteins*), envolvidas na regulação da proliferação celular, diferenciação, oncogênese, apoptose e respostas antivirais, também regula negativamente a ativação de NF- κ B induzida por ligantes TLRs. Tal mecanismo de inibição acontece através da interação de TRIM30 α com o complexo TAK1-TAB2-TAB3. TRIM30 α direciona TAB2 e TAB3 para a degradação e previne a autoubiquitinação de TRAF6 (Shi et al., 2008; Nisole et al., 2005).

Enfim, o conhecimento de proteínas que controlam a ativação de NF- κ B, na presença de vários estímulos e em diferentes tipos celulares, pode levar a descoberta de abordagens para a modulação de NF- κ B, o qual é constitutivamente ativado em algumas doenças autoimunes e tipos de câncer (Shifera et al., 2010).

1.5 Proteínas Ras

As proteínas Ras pertencem a uma superfamília de GTPases monoméricas de baixo peso molecular (20-25kD), conhecidas como pequenas GTPases (do inglês, *Small GTPase proteins*). Essa superfamília é composta de proteínas evolutivamente conservadas e encontradas entre os vários reinos de organismos. Ela compreende mais de 150 membros, os quais são divididos em cinco principais subfamílias (Figura 4), devido às similaridades em suas sequências e funções (Vigil et al., 2010).

As proteínas Ras estão envolvidas na transdução de sinal, na regulação da expressão gênica, proliferação celular, sobrevivência e diferenciação. Rho GTPases estão envolvidas na transdução de sinal, na organização da actina, movimento celular e interações célula-célula e célula-matriz. Rab GTPases participam no transporte de vesículas, regulando vias endocíticas e secretórias. Arf GTPases também participam no transporte de vesículas, como também na dinâmica dos microtúbulos. E, por fim, as Ran GTPases regulam o transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas (Vigil et al., 2010; Wennerberg et al., 2005).



Baseado em: Vigil et al., 2010

Figura 4: Subfamílias das proteínas Ras em humanos. A superfamília das proteínas Ras é dividida em cinco subfamílias: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran.

A história das proteínas Ras data de quase cinco décadas, quando foi observado que uma infecção viral poderia levar à formação de tumor em camundongos e humanos (Harvey, 1964, Kirsten & Mayer, 1967). Os genes virais responsáveis foram denominados *Ras*, de sarcoma de rato (do inglês, *rat sarcoma*), e representam versões de genes mutados que codificam enzimas com atividade GTPase intrínseca. Elas foram identificadas como produtos de oncogenes capazes de induzir transformação celular. Ainda, mutantes de alguns desses oncogenes foram associados com alguns tipos de cânceres humanos (Ye & Carew, 2010). E mais, existe uma evidência crescente que a atividade exacerbada de numerosos membros da superfamília Ras contribui para o crescimento, invasão e metástase do câncer (Vigil et al., 2010).

As Ras GTPases HRas, NRas e KRas (KRas4A e 4B) são os membros mais bem caracterizados da subfamília Ras. Elas são codificadas por três proto-oncogenes e mutações nesses genes são encontradas em aproximadamente 33% dos cânceres humanos (Coleman et al., 2004, Vigil et al., 2010). Mutações em *H-Ras* têm sido identificadas em câncer de tireóide, pele e mama. Mutações em *K-ras* são encontradas com frequência no câncer de pâncreas, colon e pulmão, enquanto mutações em *N-ras* acontecem em leucemias agudas. A expressão dessas proteínas é ubíqua e amplamente conservada entre as espécies, embora haja diferenças no nível de expressão de acordo com o tipo celular, tecido e estágio do desenvolvimento (Castellano & Santos, 2011).

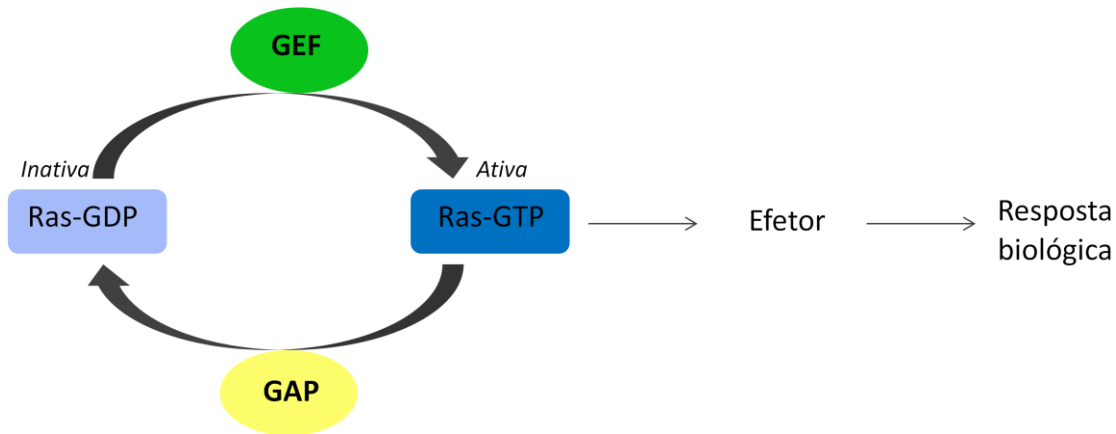
As pequenas GTPases são essenciais para várias respostas celulares ao converterem uma variedade de sinais extracelulares para cascatas de sinalização intracelulares, regulando diversos processos biológicos. Além disso, apresentam a habilidade de se ligar e hidrolizar nucleotídeos guanina (Castellano & Santos, 2011).

Elas agem como “interruptores moleculares”, alternando entre duas formas: inativa, quando ligadas a guanosina difosfato (GDP), e ativas, ligadas a guanosina trifosfato (GTP). A conversão entre os estados GTP e GDP-ligados é regulada por duas famílias de proteínas: fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs) e proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), como mostrado na Figura 5 (Takai et al., 2001; Ye & Carew, 2010; Ahearn et al., 2012).

Em adição à ligação ao GTP, o direcionamento das proteínas Ras para membranas celulares é indispensável para que elas possam desempenhar suas funções. Para que isso aconteça, proteínas Ras recém sintetizadas no citoplasma sofrem várias modificações pós-traducionais (PTMs), sobretudo modificações lipídicas como farnesilação, geranyl-geranilação, miristoilação e palmitoilação. Essas modificações acontecem na sequência CAAX (onde C é uma cisteína, A é um aminoácido alifático e X é qualquer aminoácido) presente na chamada região hipervariável ou heterogênea (HVR), localizada no domínio carboxi-terminal de cada proteína. São as PTMs que determinam a localização das proteínas Ras. Adicionalmente, existem elementos na HVR que também são requeridos para o direcionamento das proteínas, denominados “sinais secundários”. Existem dois tipos de sinais secundários: um consiste de resíduos de cisteína que servem como aceptores de palmitoilação (encontrado em HRAS, NRAS e KRAS4A) e o outro consiste de regiões polibásicas ricas em resíduos de lisina (encontrado em KRAS4B) (Ahearn et al., 2012; Castellano & Santos, 2011).

Apesar das proteínas Ras serem consideradas inicialmente como estacionárias, sendo expressas e sinalizarem somente na membrana plasmática, hoje está claro que essas proteínas trafegam entre vários compartimentos celulares, incluindo o complexo de Golgi e endossomos e que são capazes de sinalizarem a partir desses diferentes locais (Ahearn et al., 2012).

A ativação de Ras inicia-se com um estímulo extracelular seguido pelo recrutamento de um GEF onde Ras está localizada. Ocorre então a indução transitória do complexo Ras-GTP e a ativação de vários efetores, culminando numa resposta celular, como demonstrado na figura 4 (Ye & Carew, 2010; Boguski & McCormick, 1993).



Adaptado de: Ye & Carew, 2010

Figura 5: Modelo esquemático da ativação de Ras. As proteínas Ras são reguladas por GEFs e GAPs, que ativam ou inativam, respectivamente, as pequenas GTPases. As proteínas Ras ativadas são capazes de interagir com vários efetores desencadeando diversas respostas biológicas, como por exemplo, proliferação celular e transporte de vesículas.

Entre as vias de sinalização reguladas pelas proteínas Ras e seus vários efetores, a via mais bem caracterizada é a Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Essa via é ativada quando fatores de crescimento se ligam a seus receptores tirosino-cinases. A ligação promove a dimerização dos receptores, o que permite a fosforilação cruzada dos resíduos de tirosina contidos em domínios citossólicos desses receptores, através das cinases intrínsecas a esses domínios. Uma vez ativada, Ras recruta e ativa Raf-1, uma serina-treonina cinase, que leva à fosforilação e ativação de MEK, que, por sua vez, fosforila e ativa ERK1/2. Essa via está envolvida na proliferação celular, sobrevivência, mitose e migração (Friday & Adjei, 2008).

Um segundo efetor de Ras é a cinase lipídica fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3-cinase (PI3K). Ras se liga a PI3K e promove a atividade catalítica dessa cinase, resultando num aumento de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) associado à membrana e subsequente recrutamento de proteínas cinases. A ativação de PI3K mediada por Ras é um importante componente da transformação celular (Colicelli, 2004).

Outros efetores de Ras também foram descritos. RalGDS, um fator de troca de nucleotídeo guanina de Ral (um membro de Ras) que, ao ser ativado pela via Ras-RalGDS, promove processos celulares como transporte de vesículas e progressão do ciclo celular. A fosfolipase Cε (PLCε), que após ser ativada por Ras, promove a sinalização de cálcio (Downward, 2003).

As vias de sinalização reguladas pelas proteínas Ras são altamente complexas e as diversas respostas podem ser geradas pelas células em função do tipo de proteína Ras ativada, da interação com reguladores específicos, as moléculas efetoras usadas durante o período de estimulação e a localização celular onde a ativação ocorre (Caloca et al., 2003; Castellano & Santos, 2011).

Entretanto, na resposta imune, o papel dessas proteínas, seus ativadores e efetores é ainda pouco conhecido. Wang et al. (2010) mostraram que Rab10 desempenha um papel crítico na sinalização via TLR4. A expressão de Rab10 regula a produção de TNF, IL-6 e IFN β induzida por LPS, como também potencializa a ativação de múltiplas vias de sinalização induzidas por LPS, incluindo MAPK, NF- κ B e IRF3. Além disso, Rab10 é um regulador positivo da via de sinalização mediada por TLR4, promovendo o transporte desse receptor do complexo de Golgi para a membrana plasmática. Segundo Xu e colaboradores (2003), Ras pode ser ativada por oligodeoxinucleotídeos CpG em macrófagos murinos e está envolvida na via de sinalização mediada por TLR9. Ras pode se associar com TLR9 e promover a formação do complexo IRAK1/TRAF6 para a conseqüente ativação de MAPK e NF- κ B. Portanto, é importante conhecer mais sobre essas proteínas e demonstrar sua participação na resposta imune.

1.6 Fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs)

Os fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs) causam a ativação de Ras ao catalisar a dissociação de GDP da proteína. Isso diminui a afinidade de GDP pela proteína, ocorrendo então sua liberação e conseqüente troca por GTP. A troca de GDP para GTP é um processo que provoca uma mudança conformacional na proteína, permitindo que ela fique acessível a seus vários efetores, resultando em diversas respostas biológicas. Já as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) causam a inativação de Ras ao estimular a hidrólise do GTP ligado à proteína. Uma falha em qualquer um desses passos pode levar a várias patologias, inclusive o câncer (Diez et al., 2011; Vigil et al., 2010; Bos et al., 2007; Caloca et al., 2003)

Embora todas as pequenas GTPases apresentem a mesma maneira de regulação, cada subfamília de Ras têm seu próprio grupo de GEFs e GAPs (Van Dam et al., 2011). Os GEFs podem ser classificados em famílias de acordo com a similaridade de

sequência de aminoácidos que apresentam em sua estrutura primária e de acordo com o tipo de proteína Ras que eles ativam (Zheng & Quilliam, 2003).

A maioria dos GEFs tem, em comum, um domínio catalítico de aproximadamente 250 aminoácidos, denominado CDC25 (também chamado domínio RasGEF), e um domínio adjacente, amino-terminal, de aproximadamente 50 aminoácidos (também chamado de domínio RasGEFN) (Quilliam et al., 2002; Vigil et al., 2010). O domínio CDC25 foi identificado primeiramente em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e os GEFs que possuem esse domínio regulam exclusivamente a família Ras (Broek et al., 1987; Robinson et al., 1987). Além do domínio catalítico CDC25, alguns GEFs possuem ainda outros domínios importantes e funcionais. Por exemplo, os RasGRF1/2 e os Sos1/2 possuem os domínios de homologia (DH, do inglês *DbI homology*) e plequistrina (PH, do inglês *Pleckstrin homology*) que estão arranjados em conjunto. O domínio DH parece também promover a troca de guaninas em GTPases da subfamília Rho, enquanto o domínio PH participa nas interações proteína-proteína ou proteína-lipídeos (Lemmon et al., 1996; Quilliam et al., 1995).

A ativação de Ras é mediada pela troca GDP/GTP, regulada por diferentes GEFs. Para o mecanismo de ação dos GEFs na troca de GDP/GTP, foi estabelecido que o íon Mg^{2+} é um cofator essencial para estabelecer a ligação GTP-proteína (Coleman & Sprang, 1998). Esse cofator é necessário para a ligação do nucleotídeo à proteína, assim como para a hidrólise de GTP. Na presença de Mg^{2+} , Ras exibe uma afinidade de ligação extremamente alta com o nucleotídeo guanina, com uma dissociação constante na ordem da concentração subnanomolar (Feuerstein et al., 1987; John et al., 1990; John et al., 1993). Burstein & Macara (1992) observaram que a remoção de Mg^{2+} através de tratamento com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) aboliu a capacidade de ligação da proteína GTPase Rab3A ao nucleotídeo GTP.

Estudos bioquímicos demonstraram que, no processo de ligação do nucleotídeo guanina à GTPase, o sítio de ligação para guanina associado ao íon Mg^{2+} existente na proteína Ras é constituído de regiões altamente conservadas, incluindo o “loop” de ligação ao fosfato (P-loop) e duas regiões cujas seqüências variam entre as subfamílias de proteínas Ras (Sprang, 1997). Uma vez que as regiões conservadas mantêm a mesma conformação quando GDP ou GTP estão ligados, as regiões variáveis respondem à natureza do nucleotídeo através de mudanças estruturais e são assim chamadas de regiões “Switch I” e “Switch II”. Essas regiões se ligam ao grupo fosfato

GTP, mas têm pouca ou nenhuma afinidade de ligação ao GDP (Cherfils & Chardin, 1999). Os GEFs estimulam a liberação intrínseca do GDP da proteína através de interações com as regiões “Switch I” e “Switch II” e com o “loop” de ligação ao fosfato (Vetter & Wittinghofer, 2001). Zhang e colaboradores (2005) propuseram um mecanismo de troca GDP/GTP nas proteínas Ras que consiste em: A) Ras-GDP interage com o GEF para formar um complexo ternário. B) Após a formação do complexo Ras-GDP-GEF, o GTP através do seu fosfato também se liga, levando ao surgimento de um complexo quaternário intermediário. C) Em seguida, o complexo quaternário sofre uma mudança de conformação liberando o GDP. Após a liberação do GDP, o GTP se liga firmemente à proteína Ras ocasionando a liberação do GEF.

Além dos GEFs regularem a ativação de Ras pela troca GDP/GTP, os GEFs também podem regulados por diversos sinais. Tais sinais incluem a fosforilação de proteínas e lipídios, o fluxo de cálcio e a geração de segundos mensageiros, como diacilglicerol (DAG). Um exemplo é o GEF RasGRF1, um fator de troca de nucleotídeo guanina regulado por cálcio, que possui um motivo de ligação à calmodulina (motivo IQ). Tal ligação parece ser crucial para a ativação desse GEF em resposta ao cálcio (Shou et al, 1992; Farnsworth et al, 1995).

Vários GEFs associados aos membros da subfamília Ras foram isolados e caracterizados em células de mamíferos, como SOS, RasGRF, RasGRF2, quatro isoformas de RasGRP, Vav, entre outros (Bowtell et al., 1992; Gulbins et al., 1994; Ahearn et al., 2012). O primeiro RasGEF a ser isolado em células de mamíferos foi designado RasGRF ou Cdc25Mn (Wei et al., 1992; Martegani et al., 1992).

Nos últimos anos demonstrou-se que vários GEFs desempenham a regulação de várias proteínas da superfamília Ras em diversos tipos de células e em diferentes compartimentos celulares. Priatel et al (2002) mostraram em células T que RasGRP1 ativa Ras, sendo crucial para o desenvolvimento e diferenciação dessas células. Wang et al (2009) identificaram ArhGEF5 como um importante fator na quimiotaxia de leucócitos, na linhagem de macrófagos murinos RAW264.7. ArhGEF5 ativou fortemente RhoA e RhoB GTPases, importantes na regulação da migração de leucócitos. Someya et al (2001) descreveram GEP100 (p100) como uma proteína de troca de nucleotídeos guanina que ativa ARF6 *in vitro*. Essa GEP ativadora da GTPase ARF6 regula a fagocitose em macrófagos, já que ARF6 está envolvida no transporte de membrana e organização do citoesqueleto nessas células durante o processo da fagocitose. A co-localização de ARF-GEP100 com EEA-1 (marcador para endossomos

primários) sugere que a função dessa GEP na ativação de ARF6 pode acontecer em locais específicos envolvidos na formação de vesículas ou em uma via endocítica (Someya et al., 2010; Someya et al., 2001).

No entanto, ainda são poucos os estudos sobre a participação de GEFs na resposta imune. RasGEF1b, originalmente designado GPIγ4, é um GEF cuja expressão de seu mRNA encontra-se significativamente induzida em macrófagos peritoniais murinos após a estimulação com agonistas TLRs. De modo semelhante em macrófagos murinos, a expressão do mRNA de RasGEF1b é induzida em macrófagos primários humanos após estimulação com GPI-mucina de *T.cruzi* ou lipopolissacarídeo (LPS) (Ferreira et al, 2002). A proteína RasGEF1b contém dois domínios: o domínio aminoterminal com função potencialmente estrutural, denominado GEF-N; e o domínio carboxi-terminal, que se assemelha ao domínio catalítico CDC25. Em um estudo conduzido por Andrade et al (2010) foi investigado o envolvimento de RasGEF1b na ativação de Ras em células de mamíferos. Foi observada uma interação e co-localização específica entre a proteína Ras e esse GEF, na qual RasGEF1b foi capaz de ativar Ras. Além disso, foi observado que esse GEF encontra-se preferencialmente localizado em endossomos primários. Porém, sua função nas células imunes precisa ser estabelecida. Portanto, é necessário entender melhor sobre RasGEF1b, seu papel na ativação de Ras e sua função, principalmente, em células do sistema imune.

2. JUSTIFICATIVA

Os macrófagos são células do sistema imune inato que respondem a diversos estímulos, incluindo moléculas derivadas de patógenos, citocinas, dentre outros. A resposta dessas células é a consequência da ativação de múltiplas vias de sinalização. A principal via de sinalização que controla a resposta inflamatória está envolvida na ativação do fator de transcrição NF- κ B e culmina na regulação da expressão de genes inflamatórios. Entretanto, a função de alguns desses genes ainda permanece por ser estabelecida. Portanto, ao determinar a função dos produtos codificados por genes regulados em resposta a ativação de NF- κ B, podemos contribuir para o melhor entendimento da regulação de processos infecciosos e inflamatórios.

RasGEF1b, um membro da família dos fatores de troca de nucleotídeos guanina, é uma proteína codificada por um gene originalmente identificado em macrófagos murinos, e sua expressão é induzida em macrófagos murinos e humanos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll. Entretanto, a expressão proteica de RasGEF1b em macrófagos estimulados com agonistas TLRs ainda é pouco conhecida. Estudos conduzidos em nosso laboratório demonstraram que RasGEF1b interage com a proteína Ras e se localiza predominantemente em endossomos primários. Porém, o seu papel na resposta celular, sobretudo de macrófagos, é também desconhecido.

Portanto, ao investigar a expressão proteica de RasGEF1b, assim como os efeitos do ganho e perda-de-função dessa proteína em macrófagos, os dados obtidos poderão fornecer evidências sobre o papel de RasGEF1b em células do sistema imune inato em resposta a agonistas inflamatórios de TLRs, como por exemplo, o LPS.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão proteica de RasGEF1b e seu papel em macrófagos estimulados com agonistas dos receptores TLR2, TLR3 e TLR4.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar a expressão proteica de RasGEF1b em uma linhagem de macrófagos murinos estimulados com agonistas de TLR3 e TLR4.
- 2) Analisar a expressão do mRNA e da proteína RasGEF1b em uma linhagem de promonócitos humanos estimulados com agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4.
- 3) Estabelecer condições de transfecção celular para os estudos funcionais de RasGEF1b em uma linhagem de macrófagos murinos.
- 4) Avaliar, por transfecção de plasmídeo de expressão eucariótica e ensaios de gene repórter, o efeito do ganho-de-função de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonista de TLR4 em macrófagos murinos.
- 5) Avaliar, por transfecção de plasmídeo de expressão de RNA interferente e ensaios de gene repórter, o efeito da perda-de-função de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por agonistas de TLR2 e TLR4 em macrófagos murinos.
- 6) Iniciar e estabelecer condições para a geração de partículas virais de Lentivírus para estudos de transdução e silenciamento da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células

4.1.1 HEK293A e HEK293T

As células HEK293A e HEK293T são linhagens de células epiteliais de rim de embrião humano contendo o antígeno tipo 5 de adenovírus ou o antígeno T do vírus simian SV40, respectivamente. Essas células são amplamente utilizadas para ensaios de transfecção devido à sua alta permissividade.

Para o seu cultivo, as células eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e imediatamente descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular era plaqueada em garrafa estéril para cultura de células (TPP, 25cm²), contendo meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco's - Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco) e os seguintes antibióticos: estreptomicina (100µg/ml - Invitrogen)/ penicilina (100U/mL - Invitrogen) e incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Após 4 horas, o meio era renovado com a finalidade de desprezar células não viáveis e que não aderiram à superfície do frasco. Ao atingirem 80-90% de confluência era realizada a passagem para outra garrafa estéril (TPP, 75 cm²) para a manutenção. Para realizar as passagens, o meio de cultura era desprezado do frasco e a monocamada de células era lavada com PBS 1X (NaCl 140mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1Mm; KCl 2mM). Logo após, o PBS 1X era desprezado e então era adicionado 1 mL de solução de Tripsina (0,25%)-EDTA à monocamada, seguida de incubação a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, as células eram ressuspensas em meio DMEM com 10% SFB e antibióticos e transferidas para novas garrafas de cultura na razão desejada (1:6, 1:10 por exemplo).

Para o congelamento, as células apresentando 80-90% de confluência eram lavadas em PBS e tripsinizadas como descrito acima, sendo posteriormente ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% SFB e 10% de DMSO (Sigma). Um mililitro e meio da suspensão eram transferidos para tubos de congelamento (Corning), os quais eram colocados em freezer a -70°C por no mínimo 48 horas e, posteriormente, estocados em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

4.1.2 RAW264.7

RAW264.7 é uma linhagem imortalizada de monócitos/macrófagos murinos amplamente utilizada em estudos relacionados com a resposta inflamatória (Olsson & Sundler, 2006; Ramana et al., 2006), por expressarem receptores do tipo Toll (TLRs) (Applequist et al., 2002).

Os procedimentos para o seu cultivo, passagens e descongelamento eram similares aos já descritos para as células HEK293A, exceto que o soro fetal bovino utilizado era proveniente da HyCLONE, USA, além de serem utilizadas garrafas estéreis para cultura de células de 25 e 75 cm² da NUNC.

4.1.3 THP-1

THP-1 é uma linhagem imortalizada de promonócitos humanos. Para o seu cultivo, as células eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e imediatamente descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular era plaqueada em garrafa estéril para cultura de células (TPP, 25cm²), contendo meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 2 mM glutamina, e os seguintes antibióticos: estreptomicina (100 µg/ml - Invitrogen)/ penicilina (100 U/mL - Invitrogen) e incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Ao atingirem densidade estimada em 1-1,5 x 10⁶ células/ml, era realizado o repique das células para a manutenção. Brevemente, dois terços da suspensão celular eram desprezados e quantidade similar de meio RPMI-1640 suplementado, a fresco, era adicionada na garrafa de cultura.

4.2 Estimulação celular

Para os ensaios de estimulação, células RAW264.7 mantidas em garrafa estéril de 75 cm² eram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas e contadas. Posteriormente, eram preparadas placas de 12 ou 24 poços com a concentração de 1 x 10⁶ ou 3 x 10⁵ células/poço, respectivamente. As células eram deixadas sem estimulação (controle) ou eram tratadas com agonistas de TLR3 e TLR4, nas concentrações de 50µg/ml e 1µg/ml, respectivamente, por 12 ou 24 horas. Ao final das estimulações, o meio era desprezado, a monocamada era lavada com PBS 1X e as células eram lisadas com tampão de lise (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NaF 50mM; β-glicerofosfato 10mM; EDTA 0,1 mM pH 8,0; Glicerol 10%; Triton X-100 1%).

Células THP-1 mantidas em garrafa de cultura estéril eram transferidas para tubos de 15 ml e centrifugadas a 200 x g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso em 10 ml de meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de SFB, glutamina e antibióticos. Em seguida, as células eram contadas na câmara de Neubauer. Eram preparadas placas de 6 poços com a concentração de 3 x 10⁶ células/poço. Essas células eram deixadas sem estimulação ou estimuladas com agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4, nas concentrações de 100ng/ml, 100µg/ml e 1µg/ml, respectivamente, por 6 ou 24 horas. Ao final das estimulações, o RNA total ou extrato celular total eram obtidos das células.

4.3 Agonistas de receptores do tipo Toll

Foram utilizados os seguintes agonistas (ligantes): agonista de TLR4: LPS O55:B5 (Sigma, USA), na concentração 1µg/ml; agonista de TLR3: Ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (poly-I:C) (Sigma, USA), nas concentrações 50 ou 100µg/ml; agonista de TLR2: Pam3CSK4 (EMC Microcollections, Alemanha), na concentração 100ng/ml.

4.4 Obtenção do RNA total

Em alguns experimentos examinamos por RT-PCR os níveis do mRNA de RasGEF1b. Ao término das estimulações das células THP-1 com os agonistas TLRs, a suspensão celular era transferida para tubo de 15 ml (TPP) e centrifugada a 200 x g por 7 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante era descartado e em seguida era adicionado 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen), seguido de homogeneização vigorosa em vortex. O lisado obtido era transferido para tubo de microcentrífuga 1,5 ml (Axygen Scientific) autoclavado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, eram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Vetec) 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 a 4°C, 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 estéril, ao qual foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico (Vetec) para a precipitação do RNA. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugada, em seguida, a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi 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 a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA totalmente solubilizado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) com auxílio de uma micropipeta. Em seguida a amostra foi incubada a 55°C durante 10 minutos, seguida de breve centrifugação e posteriormente estocada a -20°C. Os RNAs foram quantificados em comprimento de onda a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (NanoDrop). As razões 260/280 dos RNAs também foram determinadas.

4.5 Reação de síntese da primeira fita de cDNA

Um micrograma de RNA total de cada amostra era misturado a 0,5 µg/µL de oligo-dT (Promega) diluído em água DEPC, obtendo-se um volume de 11 µL. A solução era incubada a 70°C durante 5 minutos, e em seguida incubada em gelo por 2 minutos. Posteriormente, era adicionada uma mistura de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) 10mM (Promega), solução tampão 5X da enzima MMLV (Promega), 200 U da enzima MMLV (Promega) e água DEPC, obtendo-se o volume final de 20 µL. Esta mistura era incubada a 42°C durante 1 hora. Ao final, para inativação da enzima transcriptase reversa MMLV, a solução era incubada a 70°C durante 15 minutos. As amostras eram armazenadas a -20°C.

4.6 RT-PCR semi-quantitativa

Para a realização da RT-PCR semi-quantitativa foram utilizados 2 µL da reação de síntese da primeira fita de cDNA. Para a PCR foram utilizados, por reação, 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 2,5 µL de Tampão IO 10X (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Phoneutria), 0,5 µL de dNTP 10mM, 1,25 µL de cada um dos iniciadores indicados na Tabela 2. Foram acrescidos também 16,625 µL de H₂O Milli-Q autoclavada. O volume final da reação foi de 25 µL. A reação foi colocada em termociclador (Biorad/MyCyclerThermal) nas condições termocíclicas indicadas na Tabela 3. Os amplicons foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel de agarose 3% ou 1,2%. Após a adição do tampão de carregamento (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 50mM pH 8,0, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,25% e Xileno cianol 0,25%), os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose preparado em tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V em tampão TAE 1X. Ao final da corrida, os DNAs fracionados no gel foram visualizados em transiluminador de luz

ultravioleta (UV) e as imagens capturadas através de câmera acoplada a sistema de fotodocumentação UV.

Tabela 2: Iniciadores utilizados durante o estudo

Iniciador	Sequência 5' → 3'	Condições termocíclicas	Gene alvo
QRT-HURGF1B FWD QRT-HURGF1B REV	ATCCTTCAACTCCTCACGGA CTGCATCATTGCTGGACAT	1º passo: 94°C/4min 2º passo: 30 ciclos a 94°C/30seg, 60°C/30seg, 72°C/45seg 3º passo: 72°C/5min	RasGEF1b humano
HuHPRT FWD HuHPRT REV	CGAGATGTGATGAAGGAGATG GGATTATACTGCCTGACCAAGG	1º passo: 94°C/4min) 2º passo: 30 ciclos a 94°C/30seg, 64°C/30seg, 72°C/1min 45seg 3º passo: 72°C/7min)	HPRT humano
QRT-Kozak-RGF1B FWDQRT-Eco501 REV	CCCAAGCTTGGGACCATGGCTC AGACGCC GGAATTCAGAGGGCGGCGAGT TTTC	1º passo: 94°C/4min) 2º passo: 27 ciclos a 94°C/30seg, 60°C/30seg, 72°C/1min 45seg 3º passo: 72°C/5min	RasGEF1b murino
mGAPDH FWD mGAPDH REV	CCTCAACTACATGGTCTAC CCTTCCACAATGCCAAAGT	1º passo: 94°C/5min) 2º passo: 31 ciclos a 94°C/30seg, 52°C/30seg, 72°C/1min 45seg 3º passo: 72°C/5min)	GAPDH murino

4.7 Western Blot

4.7.1 Obtenção de extratos celulares

Para a obtenção dos extratos celulares, o sobrenadante das células HEK293A ou RAW264.7 era descartado e a monocamada era lavada 1 vez 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 mg/mL; Leupeptina 1µg/ml). A

quantidade do tampão de lise contendo inibidores de proteases que era usada dependia da área de superfície da placa. Posteriormente, as amostras eram centrifugadas a 13.000 x r.p.m (Microcentrífuga Eppendorf Mod.5424, rotor para 24 tubos de microcentrífuga de 1.5mL) por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenadas a -20°C.

Para a obtenção dos extratos celulares totais das células THP-1, a suspensão celular era transferida para tubos de 15 ml contendo 10 ml de PBS 1X gelado. Aos poços da placa ainda eram adicionados mais 2 ml de PBS 1X gelado para a recuperação - com o auxílio de um raspador de células (Nunc) - de células aderidas em função da estimulação com agonistas inflamatórios. As suspensões eram combinadas e então centrifugadas a 200 x g por 7 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante era descartado e eram adicionados mais 10 ml de PBS 1X gelado. O sedimento era ressuspenso e recentrifugado nas condições já descritas. Logo após, o sobrenadante era descartado e ao sedimento celular era adicionado tampão de lise de proteínas contendo inibidores de proteases, seguido de ressuspensão. Posteriormente as amostras eram centrifugadas a 13.000 x r.p.m (Centrífuga Thermo Scientific HMX3R/Bioliner) por 10 minutos a temperatura ambiente e armazenadas a -20°C. Todas as amostras destinadas ao experimento de Western blot eram quantificadas por ensaio de Bradford.

4.7.2 Quantificação dos extratos celulares (Bradford, 1976)

Alíquotas dos extratos celulares eram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços e diluídas 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 (Molecular Devices/Spectra Max Plus). A concentração em µg/µL das amostras e a curva padrão do BSA era obtida através do programa SoftMax-Pro.

4.7.3 Fracionamento eletroforético e transferência

O tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 0,4%; Glicerol 30%; SDS 10%; β-Mercaptoetanol 6%; Azul de bromofenol 1,2%) era misturado à alíquotas dos extratos celulares. Após fervura por 5 minutos, os extratos eram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, e corrida em tampão Tris-Glicina (Tris base 25mM pH 8.3; Glicina 250mM; SDS 0,1%), numa tensão de 150 V e duração média de 1 hora e 20 minutos. 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-Hybond-P (Amersham Biosciences), 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 guardada a 4°C.

4.7.4 Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: soro policlonal de coelho anti-RasGEF1b (Andrade et al., 2010) nas diluições 1:1000 e 1:4000, anti-tubulina 1:1000 (Sigma) e anti-actina 1:250 (Sigma). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG2a de camundongo conjugado a peroxidase e produzido em cabra (Southern Biotechnology Associates) na diluição 1:2000, e anti-IgG policlonal de coelho conjugado a peroxidase e produzido em burro (Amersham Biosciences) 1:2000. Para os ensaios de immunoblot, os anticorpos primários e secundários eram diluídos 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], com algumas exceções quando indicadas.

4.7.5 Imunoblot e revelação

A membrana era lavada por 3 vezes (5 minutos cada lavagem) em TBS-T e incubada em solução de bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Após o bloqueio, a membrana era lavada em TBS-T como mencionado anteriormente e incubada a 4°C por 16 horas com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio. Após este tempo, a membrana era lavada conforme acima e incubada a temperatura ambiente sob agitação por mais 1 hora com o anticorpo secundário correspondente, diluído em solução de bloqueio. Posteriormente, eram realizadas 3 lavagens como já descrito. Para a detecção do anticorpo secundário, a membrana era transferida para uma placa cassete de raio-X e sobre a membrana era gotejado 1 mL de solução substrato “ECL Plus Western Blot Detection System” (Amersham Biosciences). O excesso da solução era retirado e, sob o abrigo da luz, um filme de raio X (Kodak) era colocado sobre a membrana e, após o fechamento do cassete, a membrana era exposta em tempos que variavam de 30 segundos a 5 minutos. Em seguida, o cassete era aberto e o filme era revelado e fixado utilizando as soluções adequadas: reveladora e fixadora, respectivamente (Kodak).

4.8 Plasmídeos

Os plasmídeos que foram utilizados durante esse estudo estão listados na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3: Plasmídeos utilizados durante esse estudo

Plasmídeos	Descrição
pEGFP-N1	Contém variante da proteína verde fluorescente (GFP) otimizada para expressão em células de mamíferos (Clontech, USA)
pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93	Contém sequência nucleotídica para produção de RNA curto para silenciamento da expressão de RasGEF1b murino (Sigma, USA)
pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63	Contém sequência nucleotídica para produção de um RNA curto para silenciamento da expressão de RasGEF1b humano (Sigma, USA)
pRL-TK	Contém o gene da luciferase de <i>Renilla</i> sob o controle transcricional do promotor do gene da timidina cinase do vírus HSV-1 (Promega, USA)
pGL3-E-Selectina	Contém o gene da luciferase de vagalume (<i>Pluc</i>) sob o controle transcricional do promotor do gene E-selectina (E-Sel) (Schindler & Baichwal, 1994)
pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b-YFP	Contém sequência codificadora de RasGEF1b murino clonada no vetor pcDNA3.1-YFP (Andrade et al, 2010)
pcDNA3.1-YFP	Contém variante da proteína verde fluorescente (GFP) modificada para excitação e emissão em outros comprimentos de onda (Andrade et al, 2010)
pFLAG-RasGEF1b	Contém sequência codificadora de RasGEF1b murino clonada no vetor pFLAG-CMV2 (Andrade et al, 2010)
pFLAG-CMV4	Plasmídeo de expressão eucariótica contendo epitopo FLAG (Sigma, USA) (Andrade et al, 2010)

4.9 Transformação bacteriana

Previamente ao início da transformação, os tubos de bactérias quimiocompetentes eram retirados do nitrogênio líquido e colocados no gelo. Após o total descongelamento, 10 ng dos plasmídeos que foram utilizados eram adicionados à 100µL de bactérias competentes. A mistura era incubada por 30 minutos no gelo, seguido de choque térmico em banho de água a 37°C por 45 segundos e incubação novamente no gelo por 2 minutos. Logo após, 10 µL da mistura eram plaqueados em

placas de Petri contendo ágar a 1,5% preparado em meio LB (Tryptona 10g/L, NaCl 5g/L, extrato de levedura 5g/L) e ampicilina a 100 µg/mL. As placas eram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.10 Obtenção em pequena escala (Miniprep) de DNA plasmidiano

Colônias resultantes do plaqueamento eram escolhidas aleatoriamente e individualmente inoculadas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). O inóculo era incubado a 37°C em shaker a uma rotação de 220 x r.p.m (Marconi, MA410) por 16 horas. O procedimento de extração do DNA plasmidiano era realizado utilizando o kit “Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega). Para isso, 1,5 ml da cultura crescida eram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante era desprezado e o sedimento obtido era solubilizado em 250µL de solução de ressuspensão celular (Tris-HCl 50mM pH 7.5; EDTA 10mM; RNase A 100 µg/mL). Em seguida, eram adicionados 250 µL de solução de lise celular (NaOH 0.2M; SDS 1%) seguido de inversão por 4 vezes e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, eram adicionados 350 µL de solução de neutralização (Guanidina-HCl 4,09M; acetato de potássio 0,759M; ácido glacial acético 2,12M) e imediatamente o conteúdo era invertido 4 vezes. O tubo era centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para uma minicoluna de purificação (fornecida pelo kit). Após centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente, o conteúdo era passado através da coluna e então descartado. À coluna eram adicionados 750 µL de solução de lavagem (Acetato de potássio 162,8mM; Tris-HCl 22,6mM pH 7.5; EDTA 0,109mM pH 8.0 – preparado em solução de etanol 60%), seguido de centrifugação a 14.000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. Uma lavagem adicional com 250 µL da solução de lavagem era realizada a 14.000 x g por 2 minutos. A minicoluna era transferida para outro tubo de microcentrífuga. À minicoluna eram adicionados 100 µL de água livre de nuclease para eluição do DNA. Após 2 minutos, era realizada uma última centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Logo após, a minicoluna era descartada e o DNA plasmidiano contido no tubo era mantido a -20°C.

4.11 Obtenção em média escala (Midiprep) de DNA plasmidiano

Cinquenta microlitros da suspensão bacteriana eram inoculados em 50 mL de meio LB com ampicilina (50µg/mL) e cultivados por 16 horas a 37°C sob agitação. O DNA plasmidiano era extraído através do Kit “GenElute™ HP Plasmid Midiprep” (Sigma). O inóculo era transferido para tubos de 50 mL e centrifugado a 5.000 x g durante 10 minutos, o sobrenadante era desprezado. Em seguida, o sedimento era completamente solubilizado em 4 mL da solução de ressuspensão celular. Logo após, era adicionado ao conteúdo 4 mL de solução de lise e o mesmo era invertido por 6 a 8 vezes e incubado à temperatura ambiente de 3 a 5 minutos até ficar claro e viscoso. Em seguida, eram adicionados 4 mL de solução de neutralização resfriada e o conteúdo era misturado gentilmente, invertendo o tubo de 4 a 6 vezes. Após formar um agregado branco, eram adicionados 3 mL da solução de ligação e o tubo invertido de 1 a 2 vezes. A solução era transferida para o barril de uma seringa e ficava incubada durante 5 minutos. Durante este tempo, era colocada a coluna de ligação em um tubo adequado, a qual era lavada com 4 mL da solução de preparação da coluna, centrifugada a 2.739 x g por 2 minutos e seu eluato descartado. Posteriormente, toda a solução contida no barril da seringa era despejada na coluna de ligação. Após ocorrer a transferência da solução da seringa para a coluna, esta era lavada com 4 mL da solução de lavagem 1, em seguida, com a solução de lavagem 2 e centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos. Após esse tempo, a coluna de ligação era transferida para um novo tubo coletor e a ela era adicionado 1 mL da solução de eluição. Em seguida, o tubo era centrifugado a 2.739 x g durante 5 minutos, a coluna era então descartada e o DNA plasmidiano contido no tubo estocado à -20°C. Era utilizado o Nanodrop para a quantificação do DNA, que era calculado em µg/µL.

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

O DNA plasmidiano livre de endotoxinas era obtido através do Kit “GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep” (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Quarenta microlitros da suspensão bacteriana eram inoculados em 40 mL de meio LB com ampicilina (50µg/mL) e mantidos a 37°C, sob agitação por 16 horas. Após esse tempo a cultura era transferida para tubos de 50 mL e centrifugada a 2739 x g durante 15 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante era descartado e ao sedimento eram adicionados 1,2 mL da solução de ressuspensão até

ser completamente ressuspenso. Logo após eram 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 eram precipitados adicionando 800 µL da solução de neutralização, invertendo o tubo 6-8 vezes e centrifugando o mesmo a 15000 x g por 15 minutos. O sobrenadante era descartado e em seguida eram adicionados 300 µL da solução de remoção de endotoxinas ao lisado, invertendo o tubo por 1 minuto. Após esse tempo o tubo era resfriado no gelo por 5 minutos, aquecido a 37°C por 5 minutos e centrifugado a 2739 x g por 7 minutos (repetia-se essa etapa). A fase clara, contendo o DNA plasmidial sem endotoxinas era transferida para outro tubo, onde eram adicionados 800 µL da solução de ligação ao DNA, invertendo o tubo por 6-8 vezes. Em outro tubo era colocada uma coluna e nela eram adicionados 3 mL da solução de preparação da coluna, a qual era centrifugada a 2739 x g por 3 minutos, descartando o eluato em seguida.. Após a centrifugação, a solução obtida na fase anterior era transferida para a coluna, e repetia-se a centrifugação. Após adicionar 3 mL da solução de lavagem à coluna, a mesma era novamente centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente. Depois da centrifugação, a coluna era transferida para um novo tubo, e nela era adicionado 1 mL de água livre de endotoxinas, para eluição do DNA plasmidial, seguida pela centrifugação a 2739 x g por 7 minutos. Ao final dessa última centrifugação era descartada a coluna e o DNA plasmidial obtido era armazenado à -20°C.

4.13 Transfecção

4.13.1 Método polímero catiônico

No dia anterior à transfecção, células HEK293A eram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 12 poços, de modo que no momento da transfecção a confluência apresentasse cerca de 80-90%. Antes da transfecção, o meio de cada poço era substituído por 500 µL de meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos (DMEM completo). O protocolo de transfecção em placas de 12 poços era realizado da seguinte maneira: em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a quantidade desejada de DNA era misturada a 100 µL de meio DMEM livre de soro (SFM, do inglês *serum free medium*). Em seguida, era adicionado à mistura o reagente de transfecção poly(ethylenimine) (PEI) na proporção de 5:1 (microlitros do reagente/micrograma de DNA) seguido de agitação vigorosa em vortex durante 10 segundos. A mistura era incubada à temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente, eram adicionados à mistura 200 µL de meio DMEM completo. A solução era misturada gentilmente seguida de breve centrifugação. Em seguida, a mistura de transfecção era adicionada gota-a-gota às células, em cada poço. A placa era inclinada por algumas vezes para facilitar a distribuição homogênea da solução transfectante. A placa era então incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, e era aguardado o tempo mínimo de 24 horas para a obtenção dos extratos celulares.

4.13.2 Método não-polissômico

Células RAW264.7 foram transfectadas com o reagente FUGENE-6 (Roche), que segundo o fabricante, consiste de uma mistura para transfecção do tipo não-lipossômica. Vinte e quatro horas prévias à transfecção, células RAW264.7 ($2,5 \times 10^5$ céls/poço) eram plaqueadas em placa de 24 poços com o intuito de obter no dia seguinte um confluência de 80%. As transfecções eram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, e para cada micrograma de DNA eram utilizados 3 µl do reagente. Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, o FUGENE era diluído em meio DMEM livre de soro. A solução era vortexada por um segundo e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, era adicionado o DNA ao FUGENE diluído, obtendo-se um volume final de 100 µL (FUGENE + DMEM + DNA). Essa solução era submetida à vortex por um segundo e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Após a incubação, a solução de transfecção era gotejada sobre as células, em cada poço. A placa era inclinada por algumas vezes para facilitar a distribuição homogênea da solução. As células então eram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, para posterior análise da expressão da proteína.

4.13.3 Método lipossômico

Para a transfecção mediada por lipossomos, os procedimentos eram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen), com algumas modificações. No dia anterior, células RAW264.7 (3×10^5 céls/poço) eram plaqueadas em placas de 24 poços de modo a obter no dia da transfecção confluência em torno de 90 a 95%. As transfecções eram realizadas utilizando o meio DMEM livre de soro acrescentado dos plasmídeos e o reagente de transfecção. Para cada micrograma de DNA eram utilizados 3 µL de Lipofectamine. O DNA era diluído em 50 µL de meio DMEM e a solução era misturada gentilmente. Paralelamente, era feita a diluição da Lipofectamine em 50 µL de meio DMEM e incubava-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, combinava-se o DNA e

Lipofectamine diluídos (totalizando volume de 100 μ L), seguido por incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o volume do complexo DNA/Lipofectamine era distribuído por toda a extensão do poço, sendo inclinada a placa por algumas vezes para facilitar a distribuição homogênea da solução transfectante. As células eram incubadas com o meio de transfecção em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Após 24 horas de transfecção prosseguia-se com o experimento.

4.14 Estabelecimento de condições de transfecção para os estudos funcionais de RasGEF1b em células RAW264.7.

Para a realização dos estudos funcionais com o intuito de fornecer evidências do papel de RasGEF1b em macrófagos, foram necessários procedimentos de transfecção de DNA. Entretanto, a transfecção de células RAW264.7 não é trivial, pois além de sua baixa permissividade, a eficiência da transfecção nessas células encontra-se limitada a poucos reagentes de transfecção, que são de elevado custo. Nesse sentido, um ensaio de transfecção foi conduzido para a avaliação de qual reagente de transfecção poderia ser usado em nossos estudos, baseando-se na sua capacidade de fornecer uma eficiência razoável e de baixa toxicidade para as células. Para isso, células RAW264.7 foram plaqueadas e três reagentes foram avaliados em procedimentos de transfecção conduzidos com o plasmídeo pEGFP-N1: PEI, FUGENE e LIPOFECTAMINE 2000. Para cada reagente de transfecção utilizado, foi seguido seu protocolo específico conforme descrito acima. Posteriormente, as células foram observadas em microscópio de fluorescência para a verificação da expressão da proteína verde fluorescente.

4.15 Ensaio de gene repórter

O ensaio de gene repórter é amplamente utilizado em estudos de ativação gênica. Através desse método é possível avaliar as atividades específicas de elementos regulatórios presentes em regiões gênicas promotoras, através de uma proteína “repórter” que seja facilmente detectada e quantificada, porém distinta das proteínas celulares endógenas. Normalmente, emprega-se uma enzima “repórter” para o estudo do promotor, ou seja, a região gênica promotora é clonada acima da sequência codificadora da proteína repórter. A quantidade de proteína expressa, associada à sua atividade enzimática, permite determinar a atividade da região promotora. Dentre os genes repórteres mais estudados está a luciferase.

Células RAW264.7 eram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços. Aproximadamente 24 horas após, numa confluência de 90-95%, as células eram transfectadas com os plasmídeos pFLAG-CMV4 (controle), pFLAG-RasGEF1b e co-transfectadas com o plasmídeo repórter pGL3-E-Sel, cuja expressão da luciferase está sob o controle do promotor do gene E-selectina, que é regulado diretamente pelo fator de transcrição NF-kappaB (Schindler & Baichwal, 1994).

Células RAW264.7 também eram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Aproximadamente 48 horas após, as células eram transfectadas com os plasmídeos pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93, pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA63 e co-transfectadas com o plasmídeo repórter pGL3-E-Sel.

Dessa forma, a ativação de NF-kappaB induzida por diferentes moléculas, sobretudo citocinas e agonistas TLRs, pode ser avaliada diretamente nos extratos celulares. Para a normalização dos resultados, era co-transfectado o plasmídeo pRL-TK, que contém do gene da luciferase de *Renilla* sob o controle do promotor da timidina cinase do vírus HSV-1. A normalização dos resultados é determinada pela razão da luminescência do gene repórter sobre a luminescência do gene normalizador. As transfecções eram realizadas com Lipofectamine 2000 e conduzidas conforme instruções do fabricante, com algumas modificações. Vinte e quatro horas ou 36 horas após a transfecção, as células eram estimuladas com os agonistas de TLRs. Ao final dos tratamentos, os sobrenadantes eram descartados e os extratos celulares eram obtidos para a realização do ensaio de atividade da luciferase conforme recomendações do fabricante (Sistema Dual-luciferase da Promega), com algumas alterações. Primeiramente, os extratos eram obtidos com 200 μ l (ou 45 μ l – placa de 96 poços) do Tampão de Lise Passivo 1X (PLB 1X), fornecido pelo kit. Os lisados eram homogeneizados com o auxílio de ponteira acoplada a uma micropipeta, transferidos para tubos de 1,5 ml (Axygen), centrifugados a $8.000 \times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente e mantidos a -20°C até a leitura das amostras. Para medir a atividade da luciferase, 20 μ l de extrato celular eram transferidos para uma placa de 96 poços (FluoroNuncMaxiSorp, Nunc), onde eram adicionados 40 μ l do reagente Luciferase Assay Reagent II – substrato da luciferase de vagalume – LAR II, tendo logo após a leitura realizada em luminômetro (Lumicount-Packard). Em seguida, eram adicionados 40 μ l do substrato da *Renilla* diluído no tampão Stop & Glo (Promega), tendo logo após a leitura realizada nos mesmos parâmetros para a luciferase de vagalume. Os dados eram transferidos para uma planilha Microsoft Excel para análises da razão entre a

atividade da luciferase de vagalume sobre a luciferase da *Renilla*, para a obtenção da atividade relativa da luciferase nas células transfectadas e estimuladas ou não com agonistas TLRs.

4.16 Produção de partículas de lentivírus para o silenciamento de RasGEF1b em macrófagos murinos

Produção de partículas virais

Para a produção de partículas de lentivírus que pudessem ser utilizadas posteriormente para a infecção de células RAW264.7, foram utilizados o plasmídeo psPAX2 (Addgene) que contém os genes virais *gag*, *pol* e *rev* para o empacotamento; o plasmídeo pMD2.G (Addgene) que contém o gene para a expressão da proteína VSV-G para a formação do envelope viral; e, os plasmídeos pLKO.1-shRNA63 e pLKO.1-shRNA93 que contém inserto de RNA de curta sequência tipo grampo (shRNA, do inglês *Short hairpin RNA*) para o gene Rasgef1b humano e murino, respectivamente. Esses plasmídeos foram purificados com o kit “GenElute Endotoxin-Free Plasmid Midiprep” (Sigma) de modo a eliminar contaminação com endotoxinas. Uma micrograma de cada plasmídeo de produção lentiviral e 1,5 micrograma de cada plasmídeo pLKO.1 foram transfectados em células HEK293T (3 X 10⁵ células/poço) em placas de 6 poços. As transfecções foram realizadas com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, exceto que o meio DMEM sem SFB foi utilizado em substituição ao meio OPTI-MEM (Invitrogen). Paralelamente, o plasmídeo pEGFP-N1 era transfectado para avaliação da eficiência de transfecção.

Quinze horas após a transfecção, o meio das células foi desprezado, seguido da renovação com meio DMEM + 10% SFB + antibióticos (penicilina/estreptomicina) e incubação em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂.

Quarenta e oito horas após, o sobrenadante das células foi coletado, centrifugado a 1.250 x r.p.m. (Centrífuga Thermo Scientific/Multifuge X3R) por 5 minutos e armazenado a -80°C.

Transdução das células RAW264.7

Células RAW264.7 (1,5 X 10⁶ células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo meio DMEM + 10% SFB + antibióticos (penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. No dia seguinte, as células – já apresentando cerca de 70% de confluência – foram deixadas sem infecção ou infectadas

com as partículas virais geradas. Para as infecções, 500 µL dos sobrenadantes coletados das culturas de células HEK293T transfectadas previamente foram misturados com 2 mL de meio DMEM + 10% SFB + antibióticos e, então, adicionados sobre as células. Para as células controle, não infectadas, apenas meio DMEM completo (10% SFB + antibióticos), sem partículas virais, foi adicionado.

Vinte e quatro horas após a infecção, o meio das células foi renovado, seguido da incubação em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Posteriormente, as células sofreram duas passagens na proporção 1:8 para novas placas de cultura de 6 poços, quando então deu-se início à seleção de clones com as concentrações 4,5, 6 e 8 µg/ml de puromicina. Após quatro dias em meio contendo o antibiótico, o RNA total foi obtido das células. Paralelamente, células selecionadas com 6 µg/ml de puromicina foram repicadas e cultivadas.

5. RESULTADOS

5.1 Expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll

Já foi demonstrado que a expressão de RasGEF1b é regulada em resposta a estimulação com agonistas de TLRs, sobretudo TLR4 e TLR3 (Ferreira et al., 2002; Andrade et al., 2010). Entretanto, esses estudos se basearam principalmente em análises dos níveis do mRNA de RasGEF1b. Portanto, a expressão proteica de RasGEF1b em células estimuladas com agonistas de TLRs é ainda pouco conhecida. Nesse sentido, decidimos avaliar a cinética da expressão de RasGEF1b em células RAW264.7 após estimulação com agonista de TLR4 (Figura 6) e agonista de TLR3 (Figura 7) em diferentes intervalos de tempo, através da técnica de Western blot.

Os resultados obtidos mostram que células RAW264.7 não estimuladas apresentam algum nível de expressão basal de RasGEF1b. Porém, um aumento dessa expressão é induzido em resposta ao LPS a partir de 6 horas de estimulação e em resposta ao poly (I:C) a partir de 3 horas de estimulação.

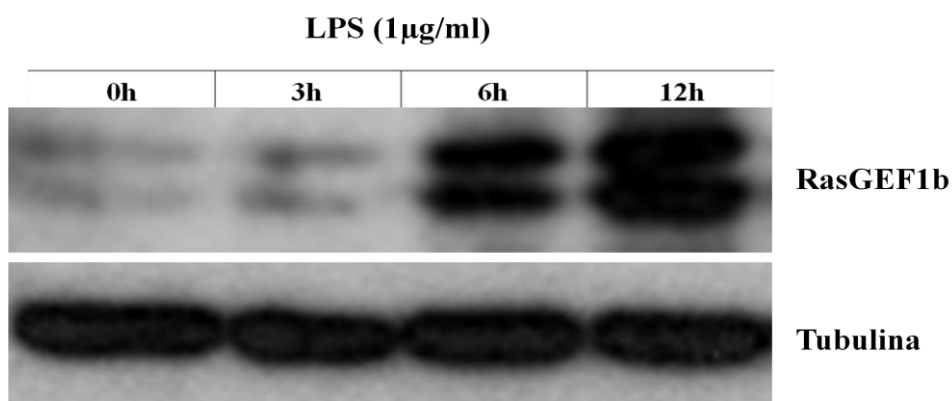


Figura 6: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com LPS (1µg/ml). Células RAW264.7 foram deixadas sem estimulação (0h) ou estimuladas nos tempos indicados. Ao final da estimulação, os extratos protéicos foram obtidos, quantificados e 30µg foram submetidos à SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos para as proteínas indicadas na figura.

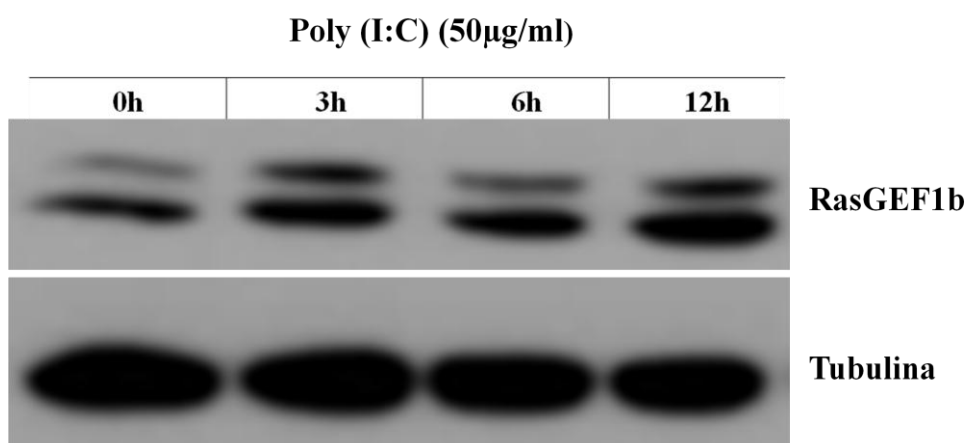


Figura 7: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos estimulados com poly (I:C) (50µg/ml). Células RAW264.7 foram deixadas sem estimulação (0h) ou estimuladas nos tempos indicados. Ao final da estimulação, os extratos protéicos foram obtidos, quantificados e 30µg foram submetidos à SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos para as proteínas indicadas na figura.

5.2 Cinética da expressão do mRNA de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com agonistas dos receptores do tipo Toll

Investigamos, através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa, a expressão do mRNA de RasGEF1b em células THP-1 estimuladas com diferentes agonistas TLRs.

Podemos observar que após estimular as células com Pam3Cys (agonista de TLR2), como mostrado no painel A, na Figura 8, houve a indução da expressão do mRNA de RasGEF1b, e essa expressão se torna mais evidente três horas após o estímulo.

Ao estimular as células com LPS (agonista de TLR4) e poly (I:C) (agonista de TLR3), notamos que houve uma discreta indução da expressão do mRNA de RasGEF1b, principalmente, com três horas de estimulação, de acordo com o painel B, e C, respectivamente, na Figura 8.

Os resultados citados acima foram obtidos em células THP-1 estimuladas com agonistas de TLRs por um período de tempo relativamente curto, de no máximo seis horas de estimulação. Decidimos então avaliar a expressão do mRNA de RasGEF1b em células THP-1 estimuladas por um período de tempo mais prolongado com um dos agonistas de TLRs, nesse caso, o LPS (Figura 9). O resultado mostra que houve a indução da expressão de RasGEF1b em células THP-1 a partir de duas horas de estimulação, e que essa expressão é semelhante nos tempos de estimulação aos quais essas células foram submetidas. Entretanto, ocorre um discreto aumento da expressão de RasGEF1b após quatro horas de estimulação das células THP-1 com o LPS, conforme mostra a Figura 9.

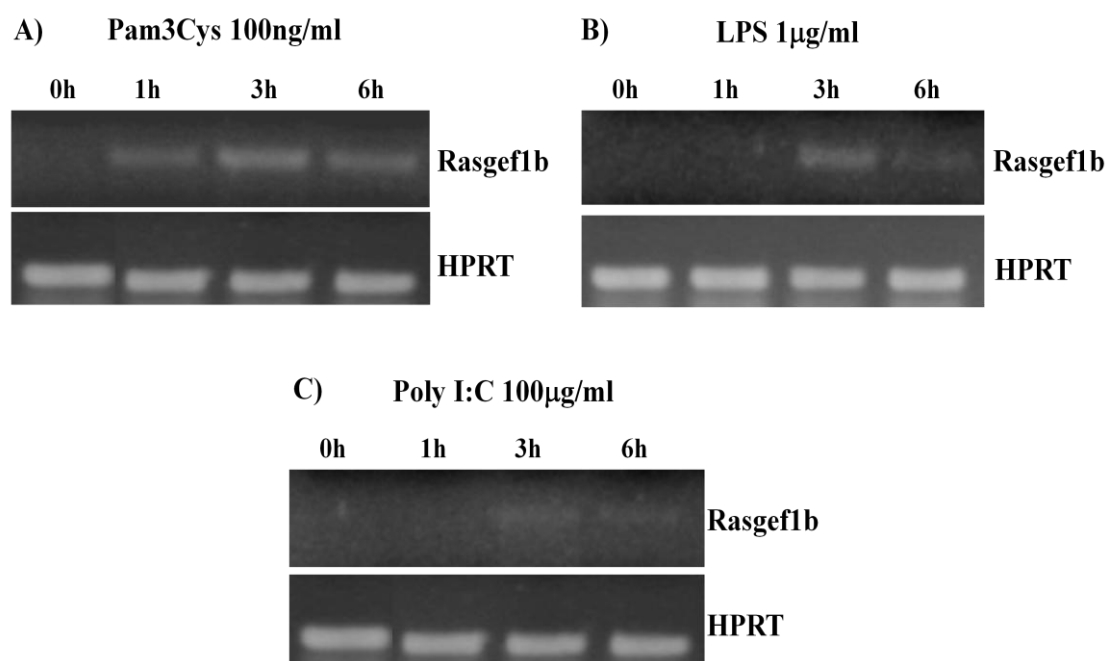


Figura 8: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com diferentes agonistas dos receptores do tipo Toll (TLRs). Células THP-1 foram deixadas sem estimulação (0h) ou estimuladas com agonistas TLRs em diferentes intervalos de tempo nas concentrações indicadas na figura. Ao final das estimulações, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-PCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de RasGEF1b (144bp) e HPRT (300bp). Após o fracionamento dos produtos de PCR em gel de agarose 3% (para RGF1b) e 1,2% (para HPRT), corado em solução de brometo de etídeo, as bandas foram visualizadas através de luz ultravioleta e a imagem capturada em câmera CCD.

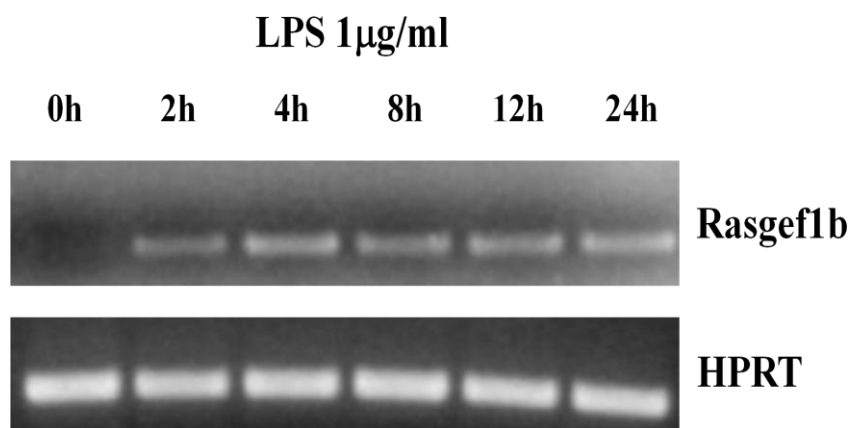


Figura 9: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com LPS (1 μ g/ml). Células THP-1 foram deixadas sem estimulação (0h) ou estimuladas conforme indicado na figura. Ao final da estimulação, o RNA total foi extraído e posteriormente transcrito na primeira fita de cDNA que foi utilizada como molde em reações de RT-PCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de RasGEF1b (144bp) e HPRT (300bp). Após o fracionamento dos produtos de PCR em gel de agarose 3% (para RasGEF1b) e 1,2% (para HPRT), corado em solução de brometo de etídeo, as bandas foram visualizadas através de luz ultravioleta e a imagem capturada em câmera CCD.

5.3 Expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com agonistas de receptores do tipo Toll

Os resultados mostrados anteriormente indicam que a expressão do mRNA de RasGEF1b ocorre em células THP-1 estimuladas com agonistas TLRs. Para verificar também os níveis de expressão protéica de RasGEF1b nessas células sem estimulação ou estimuladas com agonistas TLRs, realizamos um ensaio de cinética no qual células THP-1 foram deixadas sem estimulação ou estimuladas com LPS por até 24 horas. O resultado mostra que há um aumento na expressão da proteína RasGEF1b entre 3 e 6 horas após a estimulação das células THP-1 com LPS (Figura 10).

É interessante que, ao comparar os dados obtidos por RT-PCR com aqueles obtidos por Western blot dos estudos em células THP-1, observamos que os níveis proteicos de RasGEF1b se acumulam tão logo seu mRNA seja transcrito. Entretanto, em tempos mais tardios, sobretudo 24 horas, nota-se uma redução nos níveis proteicos, mas não do mRNA de RasGEF1b. Essas observações sugerem que, em monócitos, a proteína RasGEF1b deva sofrer algum tipo de modificação pós-traducional. Além disso, os estudos de análise da expressão proteica de RasGEF1b sugerem que essa proteína desempenha alguma função em macrófagos e monócitos estimulados com agonistas de TLRs.

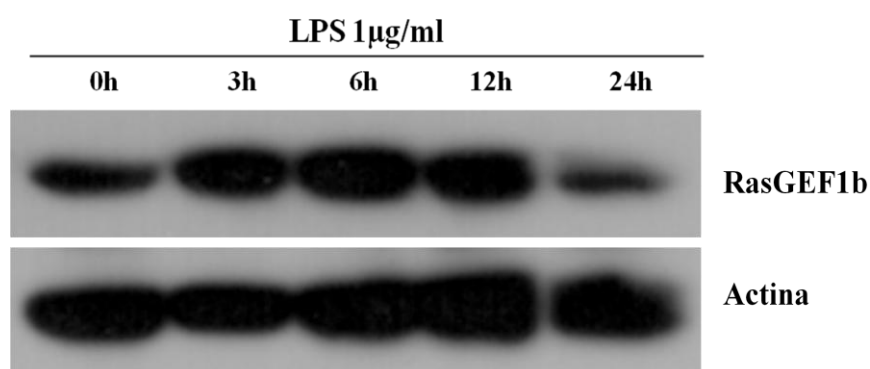


Figura 10: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em linhagem de promonócitos humanos estimulados com LPS (1µg/ml). Células THP-1 foram deixadas sem estimulação (0h) ou estimuladas nos tempos indicados. Ao final da estimulação, os extratos protéicos foram obtidos, quantificados e 20µg foram submetidos à SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana PVDF e analisados com anticorpos específicos para as proteínas indicadas na figura.

5.4 Estabelecimento do reagente de transfecção para ser utilizado nos estudos funcionais de RasGEF1b em células RAW264.7

Para a realização dos estudos funcionais com o intuito de fornecer evidências do papel de RasGEF1b em macrófagos, foram necessários procedimentos de transfecção de DNA. Nesse sentido, um ensaio de transfecção foi conduzido para a avaliação de qual reagente de transfecção poderia ser utilizado nos estudos funcionais realizados com as células RAW264.7. De acordo com o resultado obtido nesse ensaio (Figura 11), nota-se que a transfecção realizada com os reagentes PEI ou Fugene resultou em alterações da morfologia celular, sugerindo comprometimento da viabilidade celular. Em contraste, ao utilizar o reagente Lipofectamine, não foram observadas alterações significativas da morfologia celular, além disso, aparentemente não houve comprometimento da viabilidade celular, quando comparado aos outros reagentes. Assim, ficou estabelecido que as células RAW264.7 seriam transfectadas com o reagente de transfecção LIPOFECTAMINE na proporção 1:3 (para cada micrograma de DNA seriam utilizados 3 µl de Lipofectamine), pois esse reagente foi o que demonstrou menor toxicidade às células e uma eficiência de transfecção razoável para a realização dos estudos funcionais.

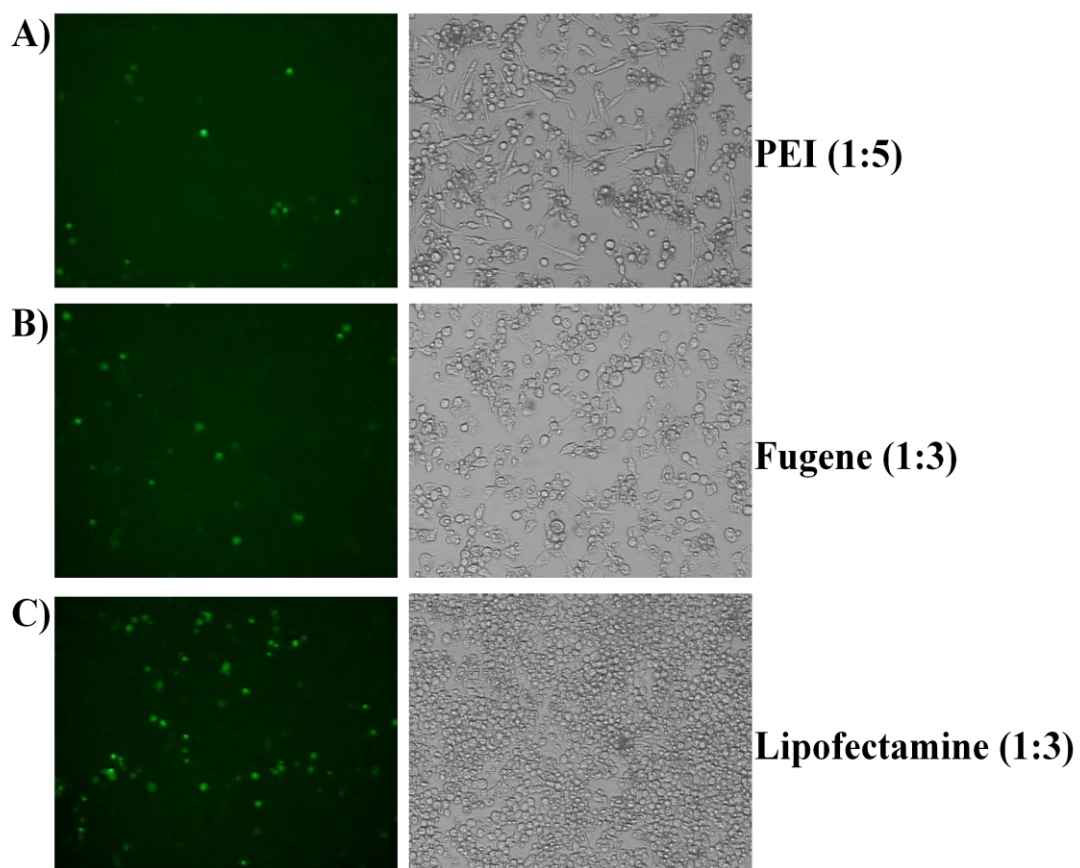


Figura 11: Ensaio de eficiência de transfecção em macrófagos murinos. Células RAW264.7 foram plaqueadas numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço em placa de 24 poços. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram transfectadas com o plasmídeo pEGFP-N1 e diferentes reagentes de transfecção como mostrado na figura. A) PEI, numa proporção 1:5 (3 μ g DNA - 15 μ l PEI). B) Fugene, numa proporção 1:3 (3 μ g DNA - 9 μ l Fugene). C) Lipofectamine, numa proporção 1:3 (3 μ g DNA - 9 μ l Lipofectamine).

5.5 Efeito de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B em macrófagos murinos

Estudos conduzidos em nosso laboratório têm demonstrado que RasGEF1b exerce um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada por componentes da via de sinalização dos TLRs e alguns dos seus agonistas, como LPS (agonista de TLR4) e poly (I:C) (agonista de TLR3) (Valverde, 2011, dados não publicados - anexo; Carolina D. Rocha, manuscrito em preparação). Esses dados indicam que RasGEF1b deva desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune. Portanto, decidimos investigar o papel de RasGEF1b sobre a regulação da ativação de NF- κ B em células imunes. Para isso, nós avaliamos, por ensaios de gene repórter, o efeito da super-expressão de RasGEF1b sobre a atividade transcricional do promotor de E-Selectina (regulado por NF- κ B) induzida pelo LPS em células RAW264.7.

Inicialmente, células RAW264.7 foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-YFP (vetor) ou pFLAG-RasGEF1b e o gene repórter de NF- κ B e foram estimuladas com LPS por diferentes intervalos de tempo. Nas células transfectadas com o vetor, pode ser notada a ativação de NF- κ B induzida por LPS em todos os intervalos de tempo testados, com um pico de ativação após seis horas de estimulação, quando comparado às células não tratadas (sem LPS) (Figura 12). Nas células transfectadas com RasGEF1b, a ativação de NF- κ B induzida por LPS também foi observada nos intervalos de tempo de 3, 6 e 12 horas após estimulação com LPS, com um pico de ativação semelhante ao das células transfectadas com o vetor. Entretanto, ao analisar a ativação de NF- κ B no tempo de 24 horas após tratamento com LPS, é possível notar que essa ativação é prejudicada. Esses dados sugerem que RasGEF1b exerce um papel regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B induzida por LPS em macrófagos RAW264.7. Esse efeito regulatório negativo de RasGEF1b corrobora os resultados de ensaios conduzidos em células HEK293A e HEK293T humanas em nosso laboratório.

Para fornecer evidências adicionais do efeito regulatório negativo de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B induzida por LPS em células RAW264.7, decidimos avaliar o efeito de duas quantidades de RasGEF1b sobre a atividade do NF- κ B após 24 horas de estimulação com LPS. Neste ensaio, as células foram transfectadas com o gene repórter de NF- κ B em combinação com 2 μ g do plasmídeo pFLAG-CMV4 ou 1 e 2 μ g do plasmídeo pFLAG-RasGEF1b, e posteriormente estimuladas com LPS. Como pode ser visualizado na Figura 13, o tratamento com LPS resultou na ativação de NF- κ B nas

células transfectadas com o vetor. Em contraste, a ativação de NF- κ B induzida por LPS foi prejudicada quando as células RAW264.7 foram transfectadas com 1 e 2 μ g do plasmídeo pFLAG-RasGEF1b, quando comparada às células transfectadas com o vetor (controle) e tratadas com LPS.

Portanto, esses resultados sugerem que RasGEF1b regula negativamente a ativação de NF- κ B em macrófagos estimulados com agonistas de TLRs, sobretudo o LPS.

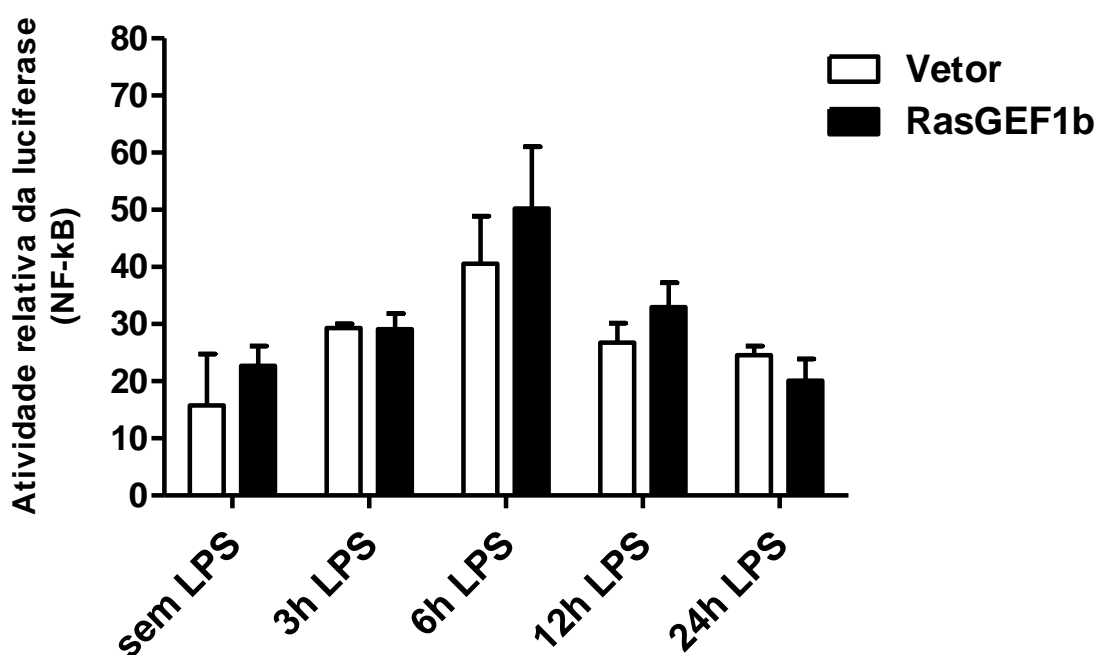


Figura 12: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito da super-expressão de RasGEF1b sobre a cinética de ativação de NF- κ B induzida por agonista de TLR4 em células RAW264.7. As células foram co-transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) em combinação com o plasmídeo vetor pcDNA3.1-YFP (1,5 μ g) ou pcDNA3.1-Flag-RasGEF1b (1,5 μ g). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem estimulação ou estimuladas com LPS (1 μ g/ml) nos tempos indicados na figura. Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. *P < 0.05.

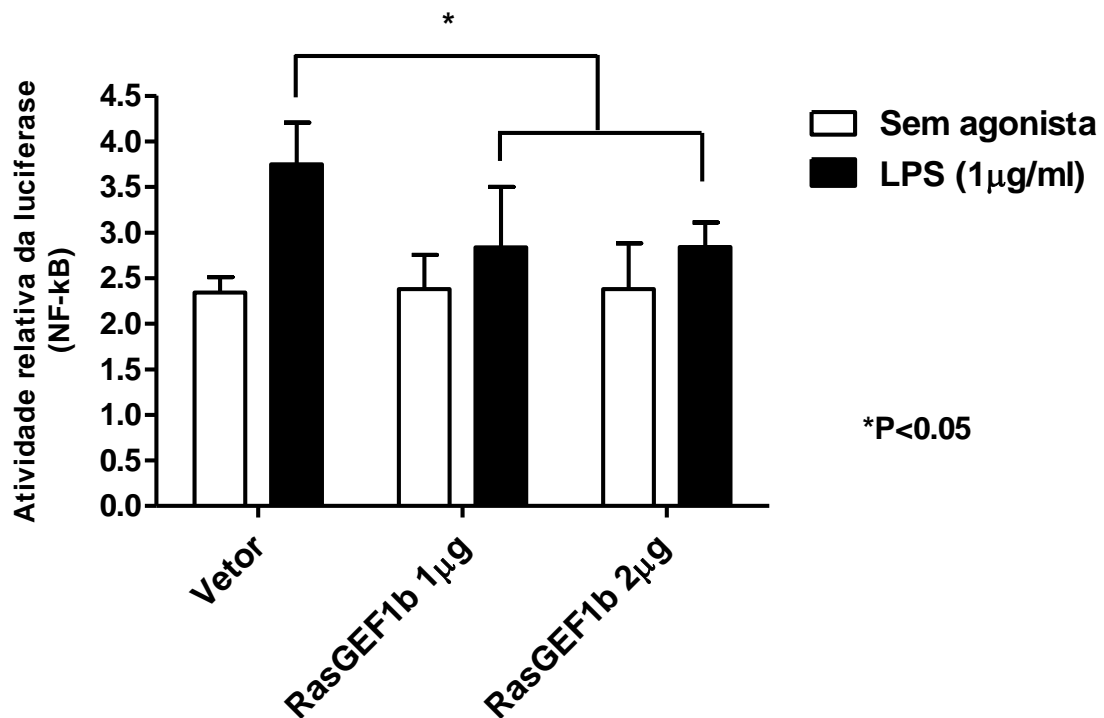


Figura 13: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito de quantidades crescentes de RasGEF1b sobre a ativação de NF-κB induzida por agonista de TLR4 em células RAW264.7. As células foram co-transfectadas com pGL3-E-Sel (400 ng), pRL-TK (100 ng) em combinação com 1 ou 2 µg do plasmídeo vetor pFlagCMV4 ou pFLAG-RasGEF1b. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram deixadas sem tratamento ou estimuladas com LPS (1µg/ml) por 24 horas. Ao final da estimulação, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. *P < 0.05.

5.6 Expressão de RasGEF1b em células HEK293A

Nos ensaios de gene repórter descritos anteriormente, avaliamos o efeito do ganho-de-função de RasGEF1b em células RAW264.7. Nosso próximo passo foi conduzir estudos para avaliar o efeito da perda-de-função de RasGEF1b nessas células. Nesse sentido, decidimos avaliar o silenciamento de RasGEF1b utilizando os plasmídeos pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 e pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93, que contém inserto de RNA de curta sequência tipo grampo para o gene RasGEF1b humano e murino, respectivamente. Considerando que células HEK293A apresentam uma alta permissividade em ensaios de transfecção, decidimos primeiramente validar a eficácia de silenciamento dos shRNAs 63 e 93 sobre os níveis de RasGEF1b murino quando transfectados nessas células. Para isso, as células HEK293A foram co-transfectadas transientemente com o plasmídeo pFLAG-RasGEF1b-YFP em combinação com os plasmídeos pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 e pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93.

De acordo com o resultado mostrado na Figura 14, os níveis de expressão do RasGEF1b murino foram drasticamente reduzidos quando as células foram transfectadas com o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93 em diferentes quantidades. O resultado mostra também que a transfecção do plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA63 em quantidades equivalentes ao do plasmídeo contendo o shRNA93 não resultou em silenciamento da expressão de RasGEF1b murino, confirmando a eficácia e o efeito específico do shRNA93.

O resultado demonstra então que o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93 pode ser considerado uma ferramenta eficaz e adequada para promover o silenciamento de RasGEF1b, de maneira transiente, nas células-alvo. Ainda, estudos funcionais poderiam ser conduzidos nos macrófagos murinos utilizando o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93 com o intuito de avaliar o efeito da perda-de-função de RasGEF1b nessas células.

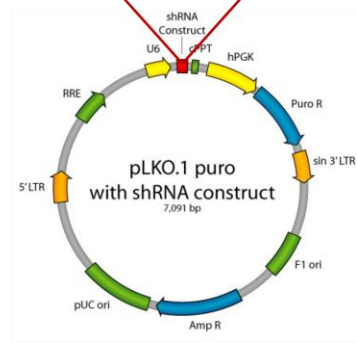
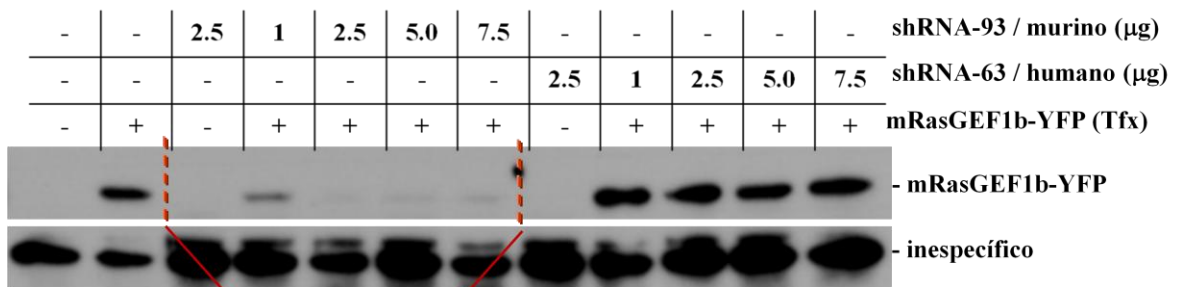


Figura 14: Análise por western-blot da expressão de RasGEF1b em células HEK293A co-transfectadas com pFLAG-RasGEF1b-YFP e shRNAs. Células HEK293A foram co-transfectadas com os plasmídeos pFLAG-RasGEF1b-YFP e shRNAs. Vinte e seis horas após a transfecção, os extratos protéicos foram obtidos e quantificados. Quinze microgramas dos extratos foram submetidos à SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana PVDF e analisados utilizando o soro policlonal anti-RasGEF1b (1:1000) gerado em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:2000).

5.7 Expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos infectados com partículas de Lentivírus

Considerando as dificuldades de transfecção das células RAW264.7, nós decidimos primeiramente gerar partículas virais de Lentivírus para ensaios de transdução em macrófagos murinos, objetivando o silenciamento da expressão de RasGEF1b de maneira estável e mais efetiva do que aquela obtida com a transfecção transiente. Dessa maneira, podemos avaliar a perda-de-função de RasGEF1b nos macrófagos através de uma técnica que nos fornece uma maior confiabilidade, já que o silenciamento da proteína alvo, nesse caso o RasGEF1b murino, acontece de uma maneira estável nas células infectadas com as partículas virais e posteriormente selecionadas com o antibiótico Puromicina. Assim, células HEK293T foram co-transfectadas com os plasmídeos para a geração das partículas de Lentivírus e os plasmídeos pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 e pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93. Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante das células HEK293T foi coletado e posteriormente utilizado para a infecção dos macrófagos murinos RAW264.7. As células RAW264.7 infectadas com as partículas virais produzidas em HEK293T foram cultivadas em meio contendo o antibiótico Puromicina, em diferentes concentrações, para selecionar as células nas quais a expressão de RasGEF1b pudesse estar silenciada.

Como pode ser visualizado na Figura 15, não obtivemos sucesso na transdução (infecção) das células RAW264.7 com as partículas de Lentivírus para o silenciamento da expressão de RasGEF1b, de maneira estável. Tanto nas células que não foram infectadas, quanto nas células infectadas com as partículas virais produzidas em HEK293T transfectadas com o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93, o perfil de expressão do mRNA de RasGEF1b é bastante similar. Além disso, nas células RAW264.7 infectadas com as partículas virais produzidas em HEK293T transfectadas com o plasmídeo pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 (shRNA controle), a expressão do mRNA de RasGEF1b é também semelhante, quando comparadas às células infectadas com as partículas virais produzidas em HEK293T transfectadas com o pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93. O GAPDH foi utilizado como um controle quantitativo das amostras analisadas.

Caso o silenciamento de RasGEF1b tivesse ocorrido nas células RAW264.7 infectadas com as partículas de Lentivírus contendo o shRNA93, a expressão do mRNA

de RasGEF1b nessas células teria sido abolida, e isso não ocorreu, de acordo com o resultado (Figura 15).

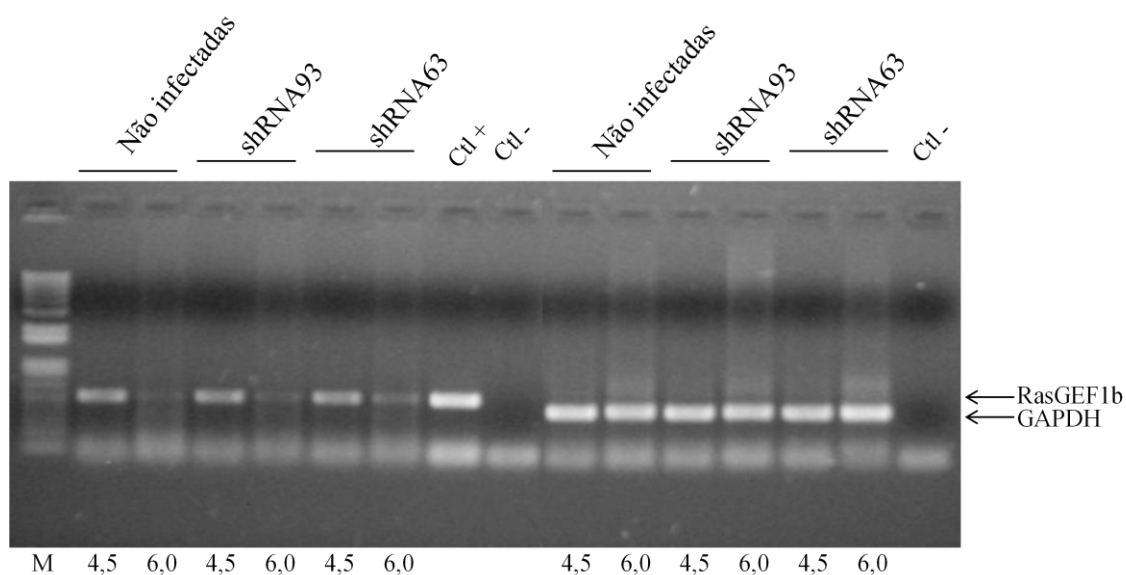


Figura 15: Análise por RT-PCR da expressão de RasGEF1b em macrófagos murinos infectados com partículas de Lentivírus após a seleção com Puromicina. O RNA total foi obtido de células RAW264.7 infectadas previamente ou não com partículas virais e posteriormente selecionadas na presença de puromicina (4,5 e 6,0 µg/ml). Um micrograma do RNA total foi utilizado para a reação de síntese da primeira fita de cDNA, da qual um décimo foi utilizado como molde em reações de RT-PCR para a amplificação específica de fragmentos de cDNAs correspondentes aos mRNAs de RasGEF1b (501bp) e GAPDH (401bp). Após o fracionamento dos produtos de PCR em gel de agarose 1%, corado em solução de brometo de etídeo, as bandas foram visualizadas através de luz ultravioleta e a imagem capturada em câmera CCD.

5.8 Efeito do silenciamento de RasGEF1b sobre a ativação de NF- κ B em macrófagos murinos

Como não obtivemos sucesso na técnica descrita anteriormente, nós decidimos investigar o papel de RasGEF1b em células nas quais a expressão da proteína fosse abolida de maneira transiente. Nesse intuito, foram realizadas transfecções transientes dos macrófagos murinos com os plasmídeos pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 e pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93 e avaliado, por ensaios de gene repórter, o efeito da perda-de-função de RasGEF1b sobre a ativação do promotor de E-Selectina induzida por LPS (agonista de TLR4) ou Pam3CSK4 (P3C) (agonista de TLR2) nas células RAW264.7.

Como demonstrado na Figura 16, a ativação de NF- κ B foi induzida por LPS ou Pam3CSK4 nas células RAW264.7 transfectadas tanto com o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93 quanto nas células transfectadas com o plasmídeo pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63. Entretanto, tal ativação ocorreu de maneira mais significativa nas células transfectadas com o plasmídeo pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93. Portanto, os resultados obtidos a partir desses ensaios corroboram as evidências de que RasGEF1b desempenha um papel na regulação da ativação de NF- κ B induzida por agonistas TLRs, pois quando ocorre o silenciamento de RasGEF1b nas células, a ativação de NF- κ B é significativamente aumentada.

É importante ressaltar que, os resultados obtidos através dos ensaios de gene repórter para avaliar tanto o efeito do ganho quanto da perda-de-função de RasGEF1b, demonstram que essa proteína exerce um papel importante na regulação da ativação de NF- κ B, pois a presença de RasGEF1b nos macrófagos murinos inibe a ativação de NF- κ B, ao passo que, quando a expressão de RasGEF1b é silenciada nessas células, mesmo que transientemente, a ativação de NF- κ B encontra-se elevada.

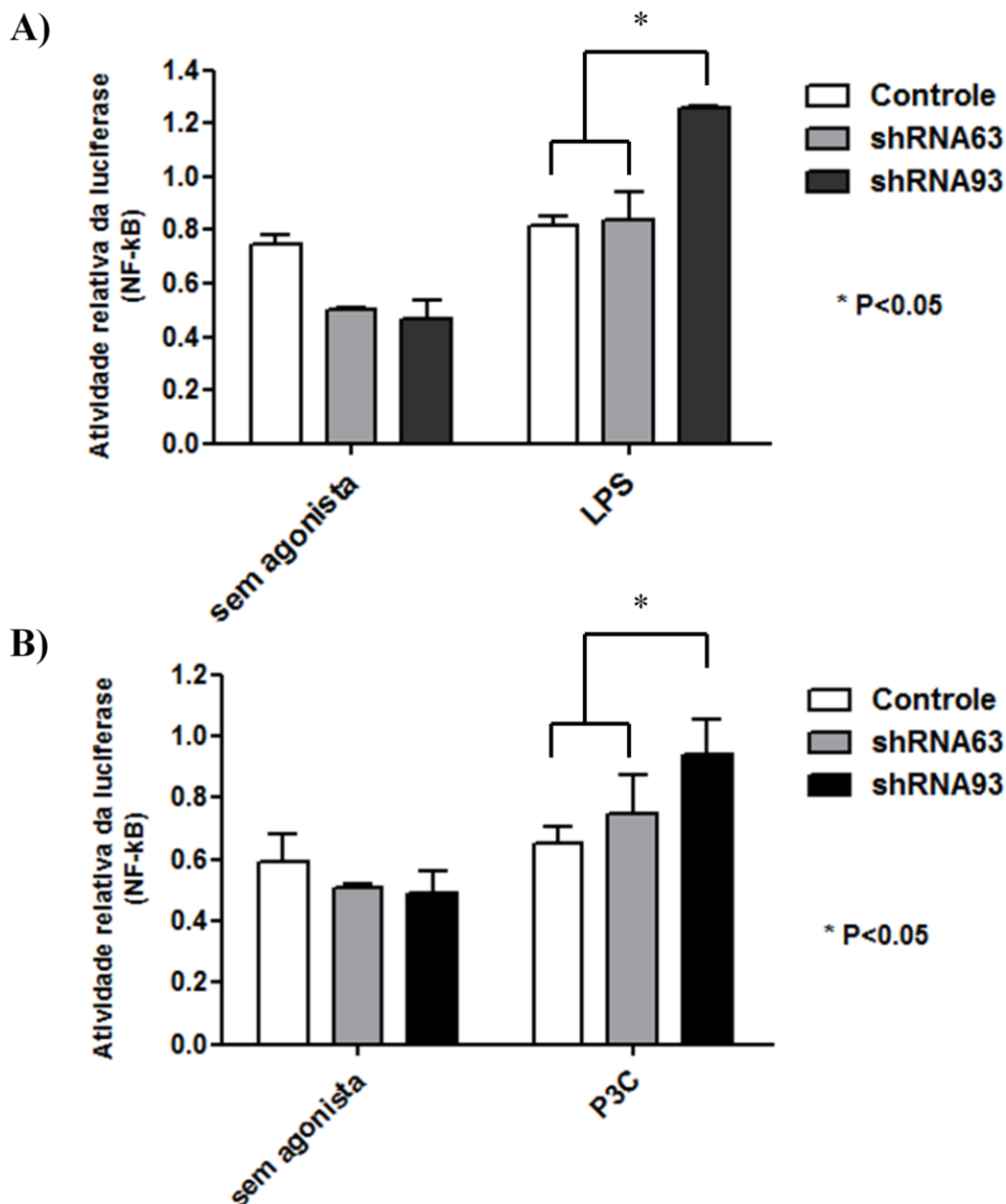


Figura 16: Análise, por ensaio de gene repórter, do efeito do silenciamento de RasGEF1b sobre a ativação de NF-κB induzida por agonistas de TLRs em células RAW264.7. As células foram co-transfectadas com pGL3-E-Sel (75 ng), pRL-TK (25 ng) em combinação com 200 ng dos plasmídeos pLKO.1-hRasGEF1b-shRNA63 ou pLKO.1-mRasGEF1b-shRNA93. Trinta e seis horas após a transfecção, as células foram deixadas sem tratamento (sem agonista) ou estimuladas com agonistas de TLRs por 24 horas. A) LPS (1μg/ml) e B) Pam3CSK4 (P3C) (100 ng/ml). Ao final das estimulações, os extratos celulares foram obtidos para determinar a atividade luciferase em luminômetro. Os resultados estão expressos pela razão da atividade da luciferase obtida do plasmídeo pGL3-E-Sel sobre a atividade do gene repórter do vetor pRL-TK. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. *P < 0.05.

6. DISCUSSÃO

RasGEF1b, um membro da família dos fatores de troca de nucleotídeos guanina, foi descrito inicialmente como um dos primeiros exemplos de um GEF cuja expressão é induzida por agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs) (Ferreira et al., 2002). Andrade e colaboradores (2010) observaram e confirmaram que a expressão de RasGEF1b é induzida na resposta imune inata mediada por TLRs via MyD88 e TRIF. Essas descobertas nos levaram a seguinte pergunta: qual seria a função de RasGEF1b na resposta imune inata? Para responder a essa pergunta, alguns estudos sobre a caracterização funcional de RasGEF1b vêm sendo realizados no Laboratório de Genes Inflamatórios.

Neste presente trabalho, decidimos investigar a expressão proteica de RasGEF1b, assim como os efeitos do ganho e perda-de-função dessa proteína em células do sistema imune inato, especialmente em macrófagos. A maioria dos ensaios foi feita com a linhagem de macrófagos murinos RAW264.7, pois essas células são amplamente utilizadas em estudos relacionados com a resposta inflamatória (Olsson & Sundler, 2006; Ramana et al., 2006), por expressarem diversos receptores do tipo Toll, como TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, dentre outros (Applequist et al., 2002).

Primeiramente, observamos que macrófagos murinos RAW264.7 apresentam algum nível de expressão basal de RasGEF1b. Porém, ocorre um aumento da expressão dessa proteína nas células após a estimulação com agonistas TLRs, como LPS e poly (I:C). A expressão do mRNA e da proteína RasGEF1b também foram analisadas nas células THP-1, uma linhagem de promonócitos humanos. Nessas células ocorre a expressão do mRNA e da proteína em resposta a estimulação com agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4. Esses resultados sugerem que RasGEF1b deva desempenhar alguma função em células da resposta imune inata. Além disso, é importante ressaltar que a análise por western-blot da expressão de RasGEF1b nas células THP-1 estimuladas com LPS demonstra pela primeira vez que o anticorpo utilizado reage também com a proteína RasGEF1b humana. Esse resultado era de certa maneira previsível, pois, em um estudo conduzido por Silveira (2006), foi observado que a proteína RasGEF1b murina apresenta alta homologia, ao nível da sequência de aminoácidos (97,6 %), com a proteína humana. Os poucos aminoácidos (12 dos 473 aa) que são divergentes representam substituições conservativas.

Uma vez que analisamos a expressão de RasGEF1b nos macrófagos murinos RAW264.7 estimulados com agonistas de TLRs, decidimos iniciar estudos funcionais de modo a fornecer evidências do papel de RasGEF1b nessas células. Entretanto, essas células apresentam uma baixa permissividade em ensaios de transfecção. Com o intuito de solucionar esse problema, conduzimos um ensaio para avaliarmos qual reagente de transfecção poderia ser utilizado nos estudos funcionais. Dentre os reagentes testados, ficou estabelecido que a Lipofectamine 2000 deveria ser utilizada, pois esse reagente foi o que demonstrou menor toxicidade às células e uma melhor eficácia.

Valverde (2011) demonstrou, através de ensaios de gene repórter, em uma linhagem de células epiteliais humanas, HEK293T, que RasGEF1b exerce um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada pelos componentes da via de sinalização de TLRs, como Mal/Tirap e TAK1/TAB1. Rocha et al (manuscrito em preparação) também tem demonstrado, através de ensaios de gene repórter, em células HEK293A, que RasGEF1b exerce um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada por agonistas de TLRs, como LPS (agonista de TLR4), poly (I:C) (agonista de TLR3) e Pam3CSK4 (agonista de TLR2). Esses dados sugerem que a proteína RasGEF1b desempenha um importante papel regulatório na ativação de componentes celulares e conseqüentemente no estabelecimento e controle adequado de uma resposta imune celular. Portanto, decidimos investigar o papel de RasGEF1b sobre a regulação da ativação de NF- κ B em macrófagos murinos.

Nossos resultados, observados através de ensaios de gene repórter em células RAW264.7, para avaliar tanto o efeito do ganho quanto da perda-de-função de RasGEF1b, indicam que essa proteína exerce um papel importante na regulação da ativação de NF- κ B mediada por agonistas de TLRs, como LPS e Pam3CSK4. Quando RasGEF1b está presente nas células, principalmente nos tempos mais tardios de estimulação com os agonistas TLRs, a ativação de NF- κ B é inibida, ao passo que, quando a expressão de RasGEF1b é silenciada nas células, mesmo que transientemente, a ativação de NF- κ B encontra-se elevada. Ainda, os resultados obtidos através dos ensaios de gene repórter sugerem que RasGEF1b possa ter um papel importante na resolução da resposta inflamatória, numa fase mais tardia do processo, por regular negativamente a ativação do NF- κ B e impedir que ele permaneça ativado, prevenindo assim, uma ativação persistente desse fator de transcrição e conseqüentemente o surgimento de uma doença inflamatória crônica.

Estudos recentes têm mostrado que várias proteínas podem regular a ativação de NF- κ B. Cui et al (2010) demonstraram que a proteína NLRC5, um membro da família de proteínas NOD, atua como um potencial regulador negativo da ativação de NF- κ B. NLRC5 inibe a resposta de NF- κ B ao interagir com IKK α e IKK β , levando ao bloqueio da fosforilação dessas cinases. NLRX1, outro membro da família de proteínas NOD, também regula negativamente a ativação de NF- κ B na via de sinalização de TLRs. Após a estimulação com LPS em vários tipos celulares, NLRX1 é rapidamente ubiquitinado e dissociado de TRAF6, e então se liga ao complexo IKK, resultando na inibição da fosforilação de IKK α e IKK β e ativação de NF- κ B (Xia et al., 2011). Outras proteínas, como TRIM30 α e A20 também regulam negativamente a ativação de NF- κ B mediada por TLRs (Shi et al., 2008; Boone et al., 2004).

Andrade e colaboradores (2010) demonstraram que RasGEF1b interage com a proteína Ras e se localiza predominantemente em endossomos primários. Entretanto, o papel desse GEF em células do sistema imune, principalmente em macrófagos, ainda precisa ser esclarecido. Outros GEFs já foram identificados e tiveram seus papéis estabelecidos em vários tipos celulares. ArhGEF5, por exemplo, foi identificado como um importante fator na quimiotaxia de leucócitos, na linhagem de macrófagos murinos RAW264.7. ArhGEF5 ativou fortemente RhoA e RhoB GTPases, importantes na regulação da migração de leucócitos (Wang et al., 2009). Priatel et al (2002) mostraram em células T que RasGRP1 ativa Ras, sendo crucial para o desenvolvimento e diferenciação dessas células.

Considerando que estudos funcionais poderiam ser realizados objetivando o silenciamento da expressão de RasGEF1b de maneira estável e mais efetiva do que aquela obtida com a transfecção transiente em macrófagos murinos, iniciamos procedimentos para a geração de partículas virais de Lentivírus para os ensaios de transdução (infecção) das células RAW264.7.

Ao final do procedimento da geração de partículas virais de Lentivírus em células HEK293T e infecção subsequente dos macrófagos RAW264.7 com as partículas de Lentivírus, não obtivemos sucesso no silenciamento da expressão de RasGEF1b de maneira estável nas células RAW264.7. Algumas considerações podem ser feitas por não ter sido observado o silenciamento da proteína alvo (RasGEF1b): 1) não foi realizada a titulação das partículas virais coletadas no sobrenadante das células HEK293T. 2) as células RAW264.7 infectadas com as partículas virais não expressavam uma proteína repórter, como por exemplo GFP, que permitisse a

visualização e seleção daquelas que possivelmente estivessem com a expressão de RasGEF1b silenciada. 3) a taxa de infecção das células transduzidas com as partículas virais não foi avaliada. Portanto, mais estudos são necessários para promover o silenciamento de RasGEF1b de maneira estável, pois assim o seu papel poderá ser melhor estudado e compreendido, sobretudo em macrófagos.

Outras estratégias poderiam ser utilizadas na realização de estudos funcionais a fim de determinar o papel de uma proteína, como nesse caso, RasGEF1b. Dentre essas estratégias, podemos citar a geração de animais geneticamente modificados, como os *camundongos nocauteados*. Esses animais possuem o gene-alvo, que codifica a proteína de interesse, permanentemente inativado, de maneira específica em alguns tecidos e/ou células, ou em todo o genoma do animal. É importante mencionar que durante a realização deste trabalho, camundongos com *nocaute* condicional de RasGEF1b apenas em células da linhagem mielóide foram gerados (camundongos *rasgef1b^{fl/fl}-LysMcre*), e que os macrófagos obtidos de medula óssea desses animais são as primeiras células nas quais estudos funcionais estão prestes a ocorrer (Aristóbolo M. Silva, comunicação pessoal). Ainda, estudos conduzidos *in vitro*, em células do sistema imune expressando estavelmente o RasGEF1b ou com sua expressão silenciada, permitiriam a avaliação do papel desse GEF na via de sinalização do NF- κ B, bem como a determinação dos níveis secretados de mediadores inflamatórios, como citocinas e óxido nítrico (NO) nessas células.

Enfim, estudos funcionais poderão contribuir para o entendimento da função de RasGEF1b na regulação da resposta imune inata e também no estabelecimento de medidas preventivas ou intervenções terapêuticas para doenças cuja patogênese esteja relacionada com ativação exacerbada de NF- κ B como, por exemplo, doenças inflamatórias crônicas e o câncer.

7. CONCLUSÕES

Podemos fazer algumas conclusões após a finalização desse trabalho:

1. As análises da expressão proteica de RasGEF1b em macrófagos murinos, e a expressão do mRNA e da proteína RasGEF1b em promonócitos humanos, sugerem que RasGEF1b deva desempenhar alguma função em células do sistema imune inato.
2. RasGEF1b exerce um efeito regulatório negativo sobre a ativação de NF- κ B mediada por agonistas de TLRs, como LPS e Pam3CSK4 em macrófagos murinos.
3. Mais estudos são necessários para promover o silenciamento de RasGEF1b de maneira estável, pois assim o seu papel poderá ser melhor estudado e compreendido, sobretudo em macrófagos.

8. REFERÊNCIAS

Ahearn, I. M., K. Haigis, et al. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(1): 39-51.

Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2(8): 675-80.

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

Albiger, B., S. Dahlberg, et al. (2007). Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261(6): 511-28.

Anderson, K. V., G. Jurgens, et al. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42(3): 779-89.

Andrade, W. A., A. M. Silva, et al. (2010). Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. *Genes Immun* 11(6): 447-57.

Applequist, S. E., R. P. Wallin, et al. (2002). Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14(9): 1065-74.

Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, et al. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 369-78.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1): 1-5.

Boguski, M. S. & F. McCormick (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366(6456): 643-54.

Boone, D. L., E. E. Turer, et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5(10): 1052-60.

Bos, J. L., H. Rehmann, et al. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129(5): 865-77.

- Bowtell, D., P. Fu, et al. (1992). Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(14): 6511-5.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Broek, D., T. Toda, et al. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48(5): 789-99.
- Burstein, E. S. & I. G. Macara (1992). Interactions of the ras-like protein p25rab3A with Mg²⁺ and guanine nucleotides. *Biochem J* 282 (Pt 2): 387-92.
- Caloca, M. J., J. L. Zugaza, et al. (2003). Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. *J Biol Chem* 278(35): 33465-73.
- Castellano, E. & E. Santos (2011). Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2(3): 216-31.
- Cherfils, J. & P. Chardin (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24(8): 306-11.
- Coleman, D. E. & S. R. Sprang (1998). Crystal structures of the G protein Gi alpha 1 complexed with GDP and Mg²⁺: a crystallographic titration experiment. *Biochemistry* 37(41): 14376-85.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5): 355-66.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004(250): RE13.
- Cui, J., L. Zhu, et al. (2010). NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. *Cell* 141(3): 483-96.
- Diez, D., F. Sanchez-Jimenez, et al. (2011). Evolutionary expansion of the Ras switch regulatory module in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 39(13): 5526-37.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(1): 11-22.
- Farnsworth, C. L., N. W. Freshney, et al. (1995). Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376(6540): 524-7.

- Ferreira, L. R., E. F. Abrantes, et al. (2002). Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. *J Leukoc Biol* 72(6): 1215-27.
- Feuerstein, J., R. S. Goody, et al. (1987). Preparation and characterization of nucleotide-free and metal ion-free p21 "apoprotein". *J Biol Chem* 262(18): 8455-8.
- Friday, B. B. & A. A. Adjei (2008). Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14(2): 342-6.
- Ghosh, S. & M. S. Hayden (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-48.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51): 6680-4.
- Gulbins, E., K. M. Coggeshall, et al. (1994). Activation of Ras in vitro and in intact fibroblasts by the Vav guanine nucleotide exchange protein. *Mol Cell Biol* 14(2): 906-13.
- Harhaj, E. W. & V. M. Dixit (2011). Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21(1): 22-39.
- Harvey, J. J. (1964). An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204: 1104-5.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5418): 1313-8.
- Ioannou, S. & M. Voulgarelis (2010). Toll-like receptors, tissue injury, and tumourigenesis. *Mediators Inflamm* 2010.
- Janeway, C. A., Jr. & R. Medzhitov (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- John, J., H. Rensland, et al. (1993). Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J Biol Chem* 268(2): 923-9.
- John, J., R. Sohmen, et al. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* 29(25): 6058-65.
- Karin, M. & F. R. Greten (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5(10): 749-59.

- Kawai, T. & S. Akira (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13(11): 460-9.
- Kawai, T. & S. Akira (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373-84.
- Kirsten, W. H. & L. A. Mayer (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39(2): 311-35.
- Kovalenko, A., C. Chable-Bessia, et al. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424(6950): 801-5.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388(4): 621-5.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1): 16-34.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6): 973-83.
- Lemmon, M. A., K. M. Ferguson, et al. (1996). PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85(5): 621-4.
- Manavalan, B., S. Basith, et al. (2011). Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol* 2: 41.
- Martegani, E., M. Vanoni, et al. (1992). Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* RAS activator. *EMBO J* 11(6): 2151-7.
- Martinez, F. O. (2011). Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol* 41(6): 1531-4.
- Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27: 451-83.
- Martinez, F. O., A. Sica, et al. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-61.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.

Mauro, C., F. Pacifico, et al. (2006). ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and cooperates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem* 281(27): 18482-8.

McGettrick, A. F. & L. A. O'Neill (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol* 22(1): 20-7.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640): 394-7.

Metchnikoff, E. (1905). *Immunity in the Infectious Diseases*. New York: Macmillan

Mosser, D. M. & J. P. Edwards (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-69.

Natoli, G. & S. Chiocca (2008). Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci Signal* 1(1): pe1.

Nisole, S., J. P. Stoye, et al. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3(10): 799-808.

Olsson, S. & R. Sundler (2006). The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 43(6): 607-12.

Opiari, A. W., Jr., M. S. Boguski, et al. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 265(25): 14705-8.

Pan, M. H., H. M. Hong, et al. (2011). Se-methylselenocysteine inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and iNOS induction in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 55(5): 723-32.

Pluddemann, A., S. Mukhopadhyay, et al. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol Rev* 240(1): 11-24.

Priatel, J. J., S. J. Teh, et al. (2002). RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17(5): 617-27.

Quilliam, L. A., R. Khosravi-Far, et al. (1995). Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays* 17(5): 395-404.

Quilliam, L. A., J. F. Rebhun, et al. (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 391-444.

- Ramana, K. V., A. A. Fadl, et al. (2006). Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J Biol Chem* 281(44): 33019-29.
- Robinson, L. C., J. B. Gibbs, et al. (1987). CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 235(4793): 1218-21.
- Schindler, U. & V. R. Baichwal (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14(9): 5820-31.
- Sen, R. & D. Baltimore (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5): 705-16.
- Shi, M., W. Deng, et al. (2008). TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol* 9(4): 369-77.
- Shifera, A. S. (2010). Proteins that bind to IKKgamm (NEMO) and down-regulate the activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 396(3): 585-9.
- Shou, C., C. L. Farnsworth, et al. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine nucleotide releasing factor for Ras p21. *Nature* 358(6384): 351-4.
- Siebenlist, U., K. Brown, et al. (2005). Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5(6): 435-45.
- Silveira, T. N. Expressão da proteína recombinante RasGEF1b: um novo fator de troca de nucleotídeos guanina associado à proteína Ras induzido pelo *Trypanosoma cruzi*. 2006. 92 p. Mestrado [Dissertação em Ciências da Saúde]. Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2006.
- So, E. Y. & T. Ouchi (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci* 6(7): 675-81.
- Someya, A., J. Moss, et al. (2010). The guanine nucleotide exchange protein for ADP-ribosylation factor 6, ARF-GEP100/BRAG2, regulates phagocytosis of monocytic phagocytes in an ARF6-dependent process. *J Biol Chem* 285(40): 30698-707.
- Someya, A., M. Sata, et al. (2001). ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5): 2413-8.
- Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66: 639-78.

Stilo, R., E. Varricchio, et al. (2008). A20 is a negative regulator of BCL10- and CARMA3-mediated activation of NF-kappaB. *J Cell Sci* 121(Pt 8): 1165-71.

Takagi, M. (2011). Toll-like Receptor. *J Clin Exp Hematop* 51(2): 77-92.

Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81(1): 153-208.

Takeda, K. & S. Akira (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1): 1-14.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76.

Tarang, S., A. Sodhi, et al. (2007). Differential expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with cisplatin. *Int Immunol* 19(5): 635-43.

Tilstra, J. S., C. L. Clauson, et al. (2011). NF-kappaB in Aging and Disease. *Aging Disease* 2(6): 449-65.

Valverde, T. M. RasGEF1b: localização celular de seus domínios e papel regulador negativo sobre ativação de NF-kappaB. 2011. 89 p. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular]. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

van Dam, T. J., J. L. Bos, et al. (2011). Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small Gtpases* 2(1): 4-16.

Vetter, I. R. & A. Wittinghofer (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294(5545): 1299-304.

Vigil, D., J. Cherfils, et al. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10(12): 842-57.

Wang, D., J. Lou, et al. (2010). Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(31): 13806-11.

Wang, Z., Y. Kumamoto, et al. (2009). Regulation of immature dendritic cell migration by RhoA guanine nucleotide exchange factor Arhgef5. *J Biol Chem* 284(42): 28599-606.

Wei, W., R. D. Mosteller, et al. (1992). Identification of a mammalian gene structurally and functionally related to the CDC25 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15): 7100-4.

Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118(Pt 5): 843-6.

Xia, X., J. Cui, et al. (2011). NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF-kappaB signaling by targeting TRAF6 and IKK. *Immunity* 34(6): 843-53.

Xu, H., H. An, et al. (2003). Ras participates in CpG oligodeoxynucleotide signaling through association with toll-like receptor 9 and promotion of interleukin-1 receptor-associated kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 complex formation in macrophages. *J Biol Chem* 278(38): 36334-40.

Ye, X. & T. J. Carew (2010). Small G protein signaling in neuronal plasticity and memory formation: the specific role of ras family proteins. *Neuron* 68(3): 340-61.

Zhang, B., Y. Zhang, et al. (2005). Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase evidence for a GTP/GDP displacement model. *Biochemistry* 44(7): 2566-76.

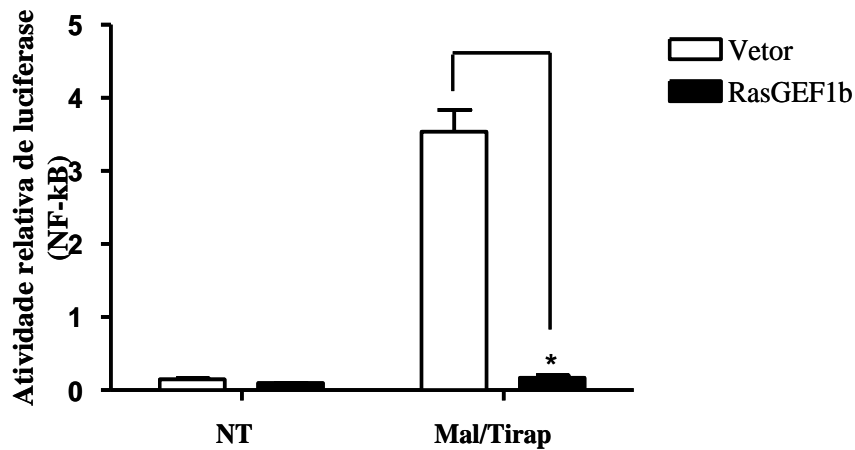
Zhang, J., B. Stirling, et al. (2006). Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J Clin Invest* 116(11): 3042-9.

Zhang, S. Q., A. Kovalenko, et al. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12(3): 301-11.

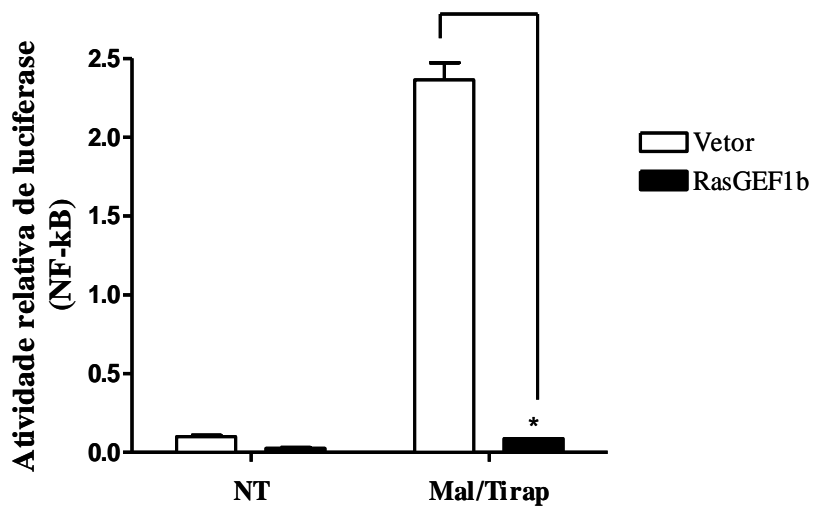
Zheng, Y. & L. A. Quilliam (2003). Activation of the Ras superfamily of small GTPases. Workshop on exchange factors. *EMBO Rep* 4(5): 463-8.

9. ANEXO

A



B



Análise da atividade transcricional de E.Selectina quando superexpresso RasGEF1b induzido por Mal/Tirap. Células HEK293T foram co-transfectadas por 22 horas com os seguintes plasmídeos: 0,4 μ g do plasmídeo repórter E.Selectina-luc (NF- κ B), 4 μ g do vetor pEF-BOS, 4 μ g do pFLAG-RasGEF1b, 0,5 ou 1 μ g de pFlag-Mal/Tirap e 0,1 μ g do plasmídeo normalizador pRL-TK (A) Análise da atividade de luciferase (NF- κ B) mediada por RasGEF1b via Mal/Tirap (0,5 μ g). (B) Análise da atividade de luciferase (NF- κ B) mediada por RasGEF1b via Mal/Tirap (1 μ g). Os valores são expressos como média \pm D.P.; * $P < 0,05$. (Resultado reproduzido com permissão de Aristóboło Silva e Thalita Valverde).