

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Sérgio Queirós Lima

**PAPEL DO FATOR DE TROCA DE NUCLEOTÍDEOS GUANINA RASGEF1B NA  
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SCHLAFEN-4 E SERPINB2 EM MACRÓFAGOS**

Belo Horizonte – Minas Gerais

Maio de 2023

Sérgio Queirós Lima

**PAPEL DO FATOR DE TROCA DE NUCLEOTÍDEOS GUANINA RASGEF1B NA  
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SCHLAFEN-4 E SERPINB2 EM MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte – Minas Gerais

Maio de 2023

043

Lima, Sérgio Queirós.

Papel do fator de troca de nucleotídeos guanina RASGEF1B na regulação da expressão de SCHLAFEN-4 e SERPINB2 em macrófagos [manuscrito] / Sérgio Queirós Lima. – 2023.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Aristóbolo Mendes da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fatores de Troca do Nucleotídeo Guanina. 3. Proteínas ras. 4. Macrófagos. 5. Expressão Gênica. I. Silva, Aristóbolo Mendes da. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

### ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE SERGIO QUEIROS LIMA

Às **nove horas e trinta minutos** do dia **24 de maio de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PAPEL DO FATOR DE TROCA DE NUCLEOTÍDEOS GUANINA RASGEF1B NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SCHLAFEN-4 E SERPINB2 EM MACRÓFAGOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	Aprovado
Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior	USP-Ribeirão Preto	Aprovado
Dr. Breno de Mello	UFOP	Aprovado
Dr. Luciano dos Santos Aggum	UFMG	Aprovado
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado:        Aprovado       

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 24 de maio de 2023.**

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva (Orientador) \_\_\_\_\_

Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior \_\_\_\_\_

Dr. Breno de Mello \_\_\_\_\_

Dr. Luciano dos Santos Aggum \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge \_\_\_\_\_

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



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 08:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 08:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aristobolo Mendes da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, Usuário Externo**, em 27/05/2023, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior, Usuário Externo**, em 17/07/2023, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 17/07/2023, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2334888** e o código CRC **B92AB0E1**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Aristóbolo pela fundamental orientação, confiança e paciência ao longo de todos esses anos, que foram essenciais para a conclusão desse trabalho. Acima de tudo pela transmissão de conhecimento e na formação científica e profissional.

Ao programa de pós-graduação em biologia celular e seu corpo docente e discente, funcionários, e coordenadores que fizeram parte dessa trajetória e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. A CNPq, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCTV), projeto CAPES-Vale do Rio Doce, CAPES e FAPEMIG que financiaram e possibilitaram a realização desta tese.

Aos membros da banca Erika Jorge, Luciano Capetinni, Breno de Melo, Ulisses Lopes e suplentes, Geraldo Passos e Ana Lucia Godard por gentilmente cederem o seu tempo e certamente contribuírem com o trabalho. Aos professores que participaram da banca de qualificação Viniciu Ribas e Marcelo Luizon por e contribuírem igualmente com sugestões, conhecimentos e discussões científicas.

Aos colegas de trabalho do que passaram pelo LGI como a Isadora, Felipe Leão, Breno, Heliana, Giovanni e Alice, e aos que ajudaram neste momento final como Cícera, Michaela, Davi e Ana Clara. A professora Luciana Andrade por ter permitido o uso da sala de cultura de células, e aos seus alunos do LBCM como Jorge, Ana Elisa, Fabio, Anny, Nathalia e Luiza por proporcionarem um ambiente de trabalho amigável e colaborativo. Ao professor Rodolfo Cordeiro por ceder o espaço do biotério.

A minha família, aos colegas de Belo Horizonte e companheiros de república como o Anderson Santos e Thalles Borges, por tornarem essa viagem interessante.

## RESUMO

*Slfn4* e *Serpinb2* são genes expressos em macrófagos que podem ter seus níveis de mRNA aumentados em resposta à estimulação por agonistas inflamatórios de receptores do tipo Toll. Em análises de sequenciamento global de RNAs, um cluster contendo *Slfn4* e *Serpinb2* indica que a expressão desses encontra-se reduzida na ausência do fator de troca de nucleotídeos guanina RasGEF1b em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos estimulados com LPS. No entanto, não se encontra completamente estabelecido como a expressão de *Slfn4* é regulada em macrófagos condições de repouso ou inflamatórias, enquanto que *Serpinb2* não possui evidências conclusivas. Ademais, permanece por ser estabelecida a caracterização do promotor de *Slfn4* com os seus sítios de ligação para fatores de transcrição e sua consequente ativação transcricional, e o papel de RasGEF1b sobre a regulação transcricional de *Serpinb2*. Baseado nesses questionamentos, nós testamos a hipótese que o RasGEF1b regula a expressão de *Slfn4* e *Serpinb2* em macrófagos. Análises por RT-qPCR confirmam que os níveis do *Slfn4* e *Serpinb2* são reduzidos em macrófagos RasGEF1b-KO não tratados ou tratados com LPS, e o efeito da ausência de RasGEF1b sob a expressão gênica observada em células não estimuladas é mantido após o tratamento com LPS. A expressão de *Slfn4*, *Serpinb2* e genes do cluster também foram reduzidos em níveis basais em macrófagos RAW264.7 silenciados para RasGEF1b tratados e não tratados com LPS. Porém, em *Ch25h* foi identificado o efeito reverso. Análises dos motivos de ligação para fatores de transcrição específicos na região promotora putativa de *Slfn4*, *Serpinb2* e de genes do mesmo cluster revelaram a presença dos motivos para os fatores reguladores IRFs, AP-1, STATs, ATF e GATA. De acordo, os níveis de *Slfn4* e *Serpinb2* em macrófagos de RasGEF1b-KO ativados com LPS e IFN mantiveram-se em níveis reduzidos e comparáveis aos de células não estimuladas. A super expressão de RasGEF1b induziu a atividade transcricional de *Serpinb2*, enquanto a mesma foi reduzida em macrófagos RAW264.7 silenciados para RasGEF1b. A mutação nos sítios de ligação para os fatores de transcrição CEBP e AP-1 reduziu a atividade de luciferase do promotor de *Serpinb2* em células HEK293 super expressando RasGEF1b por 24 horas, mas não em 48 horas para o sitio mutado de CEBP. Nossos resultados sugerem que RasGEF1b facilita a transcrição gênica de *Slfn4* e *Serpinb2* em níveis suficientes para permitir sua expressão em níveis máximos após a ativação celular por agentes inflamatórios.

Palavras-chaves: RasGEF1b, Schlafen-4, Serpinb2, macrófagos

## ABSTRACT

*Slfn4* and *Serpina2* are genes expressed in macrophages that can have their mRNA levels increased in response to stimulation by inflammatory agonists of Toll-like receptors. In analyzes of global sequencing of RNAs, a cluster containing *Slfn4* and *Serpina2* indicates that their expression is reduced in the absence of the guanine nucleotide exchange factor RasGEF1b in stimulated mouse bone marrow-derived macrophages with LPS. However, it is not fully established how *Slfn4* expression is regulated in macrophages at rest or under inflammatory conditions, while *Serpina2* lacks conclusive evidence. Furthermore, the characterization of the *Slfn4* promoter with its binding sites for transcription factors and its consequent transcriptional activation, and the role of RasGEF1b on the transcriptional regulation of *Serpina2* remains to be established. Based on these questions, we tested the hypothesis that RasGEF1b regulates the expression of *Slfn4* and *Serpina2* in macrophages. RT-qPCR analyzes confirm that *Slfn4* and *Serpina2* levels are reduced in untreated or LPS-treated RasGEF1b-KO macrophages, and the effect of the absence of RasGEF1b on gene expression observed in unstimulated cells is maintained after LPS treatment. Expression of *Slfn4*, *Serpina2*, and cluster genes were also reduced from baseline levels in LPS-treated and untreated RAW264.7 macrophages silenced to RasGEF1b. However, at *Ch25h* the reverse effect was identified. Analysis of the binding motifs for specific transcription factors in the putative promoter region of *Slfn4*, *Serpina2* and genes from the same cluster revealed the presence of motifs for the interferon regulatory factors IRFs, AP-1, STATs, ATF and GATA. Accordingly, *Slfn4* and *Serpina2* levels in RasGEF1b-KO macrophages activated with LPS and IFN remained at low levels, comparable to those of unstimulated cells. Overexpression of RasGEF1b induced transcriptional activity of *Serpina2*, whereas it was reduced in RAW264.7 macrophages silenced for RasGEF1b. Mutation in the binding sites for the CEBP and AP-1 transcription factors reduced the luciferase activity of the *Serpina2* promoter in HEK293 cells overexpressing RasGEF1b for 24 hours, but not at 48 hours for the mutated CEBP site. Our results suggest that RasGEF1b facilitates gene transcription of *Slfn4* and *Serpina2* at sufficient levels to allow their expression at maximum levels after cellular activation by inflammatory agents.

Keywords: RasGEF1b; Schlafen-4; Serpin2; macrophages



## ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína Ativadora 1 (*Activator protein 1*)

BMDMs – macrófagos derivados de medula óssea (*Bone marrow derived Macrophages*)

BSA – Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

C/EBP – Proteínas de ligação ao *enhancer* CCAAT (*CCAAT/enhancer binding protein*)

cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)

DAMP – Padrões moleculares associados ao dano (*Damage-Associated Molecular Patterns*)

DMEM – Meio Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco Modified Eagle's Media*)

DMSO – Dimetilsulfóxido (*Dimethylsulphoxide*)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfato (*Deoxynucleotides Triphosphate*)

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid*)

GAPs – Proteínas ativadoras de GTPases (*GTPase-activating proteins*)

GDP – Guanosina difosfato (*Guanosine diphosphate*)

GEFs – Fatores de troca de nucleotídeos guanina (*Guanine-nucleotide Exchange factors*)

GTP – Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)

H3K27ac – Histona H3 acetilada na lisina 27 (*histone H3 lysine 27 acetylation*)

H3K4me3 – Histona H3 trimetilada na lisina 4 (*histone H3 lysine 4 trimethylation*)

HEK – Célula embrionária de rim humano (*Human Embryonic Kidney 293 cell*)

IFN – *Interferon*

ISG – Genes estimulados por Interferon (*Interferon stimulated genes*)

ISRE – Elemento de resposta estimulado pelo Interferon (*Interferon stimulated response element*)

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

LPS – Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharide*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

MyD88 – Proteína de Resposta primária de diferenciação mielóide (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*)

NF-kB – Fator nuclear KappaB (*nuclear fator kappaB*)

PBS – Salina tamponade em fosfato (*phosphate-buffered saline*)

PCR – Reação de cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

Ras – Sarcoma de rato (rat sarcoma)

RasGEF – Fatores de troca de nucleotídeos guanina das proteínas Ras (*ras associated GEFs*)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute culture medium*

Slfn – *Schlafen*

Sp1 – Proteína de especificidade 1 (*Specificity protein 1*)

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

TSS – Sítio de início de transcrição (*transcription start site*)

## **ENDEREÇOS ELETRÔNICOS**

### **Blastn**

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

### **CIS-BP**

<http://cisbp.cabr.utoronto.ca/>

### **EPD promoter**

[https://epd.epfl.ch/mouse/mouse\\_database.php?db=mouse](https://epd.epfl.ch/mouse/mouse_database.php?db=mouse)

### **MEME**

<https://meme-suite.org/meme/>

### **mVISTA**

<https://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>

### **Primer3Plus**

<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

### **Primer Bank**

<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

### **rVISTA**

<https://rvista.dcode.org/>

### **TFbind**

<https://tfbind.hgc.jp/>

### **TOMTOM**

<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>

### **UCSC Genome Browser**

<https://genome.ucsc.edu/>

**Microsatellite Repeats Finder**

[http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/microsatellites/?info](http://insilico.ehu.es/mini_tools/microsatellites/?info)

**Pscan**

(<http://159.149.160.88/pscan/>).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Lista de iniciadores utilizados para amplificação e as condições termocíclicas utilizadas, em cada reação.

**Tabela 2:** Lista e descrição dos plasmídeos utilizados para transfecção.

**Tabela 3:** Lista de fatores de transcrição com maior probabilidade de ligação no DNA dos genes do cluster.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Organização da família Schlafen em murinos.

**Figura 2:** Cluster dos genes de expressão reduzida em BMDMs de camundongos WT e RasGEF1b-KO não estimulados (untreated) ou estimulados com LPS por 4h (LPS-treated), apontados pelo RNA-seq.

**Figura 3:** Análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR de *Slfn4* em BMDM's comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em 4 e 8 horas.

**Figura 4:** Análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR de (A) *Ch25h*, (B) *Selp*, (C) *Cd38* em BMDM's comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em 2 e 4 horas.

**Figura 5:** Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A) *Slfn4*, (B) *Cd38*, (C) *Selp* e (D) *Ch25h* comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em horas 18 horas.

**Figura 6:** Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A) *Rasgef1b* (B) *Cd38*, (C) *Slfn4* e (D) *Ch25h* comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (sh-RasGEF1b) e selvagem (sh-Control) tratados com LPS em horas 4 horas.

**Figura 7:** Identificação de motifs de ligação para fatores de transcrição para os genes do cluster de indicados pelo RNA-seq.

**Figura 8:** Análise de expressão de BMDMs estimulados com interferon beta.

**Figura 9:** Análise de expressão de BMDMs estimulados com interferon-gama.

**Figura 10:** Análise de expressão de mRNA por RT-qPCR de *Slfn4* em diversos tempos em BMDMs de camundongos WT e deficientes de RasGEF1b estimulados com LPS e tratados com actinomicina D.

**Figura 11:** Identificação de regiões da cromatina acessíveis e os fatores de transcrição ligadas identificadas por ChIP-seq.

**Figura 12:** Alinhamento da sequência de 1764pb do *Mus musculus* com *Ratus norvegicus* usando o (A) Blastn (discontiguous megablast) e o (B) mVISTA.

**Figura 13:** Alinhamento das regiões conservadas de 1764pb do *Mus musculus* com *Ratus norvegicus* usando o Blastn (discontiguous megablast).

**Figura 14:** Sequência de 1764pb do *Mus musculus* com a identificação dos sítios de ligação para os fatores de transcrição apontados pelo TFbind, TOMTOM e CIS-BP (em negrito) e a região de microssatélite indicada pela Microsatellite Repeats Finder (em azul).

**Figura 15:** (A) O segmento de 1764pb (-1670pb/+94pb) da região não-codificadora de *Sfn4* foi clonado entre os sítios de MluI e XhoI do (B) plasmídeo pGL3-basic.

**Figura 16:** Análise da região de 1764pb de *Sfn4* em células HEK293 tratadas com IFN-A1.

**Figura 17:** Expressão de *Serpinb2* em macrófagos estimulados com LPS.

**Figura 18:** Identificação de regiões da cromatina acessíveis e os fatores de transcrição ligadas identificadas por ChiP-seq para *Serpinb2*.

**Figura 19:** Ativação da região promotora de *Serpinb2* em células HEK293 super expressando RasGef1b.

**Figura 20:** Ativação da região promotora de *Serpinb2* com a mutação nos sítios de ligação para os fatores de transcrição em células HEK293 superexpressando RasGEF1b.

**Figura 21:** Ativação do promotor de *Serpinb2* em macrófagos silenciados pra RasGEF1b e tratadas com LPS e PMA.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. A superfamília das Ras-GTPases.....	18
1.2. A Proteína Schlafen.....	21
1.3. O gene Serpinb2.....	24
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Animais e genotipagem.....	29
4.2. Cultivo de células imortalizadas.....	29
4.3. Geração de células RAW264.7 que expressam shRNA para RasGEF1b.....	30
4.4. Obtenção, cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e tratamentos.....	31
4.5. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	31
4.6. Oligonucleotídeos e condições termocíclicas.....	32
4.7. PCR quantitativo (RT-qPCR).....	33
4.8. Enriquecimento de motivos de DNA.....	33
4.9. Análise da provável região promotora de Slfn4.....	33
4.10. Transformação bacteriana.....	34
4.11. Obtenção de DNA plasmidiano em pequena (miniprep) e média escala (midiprep).....	37



4.12. Transfecções.....	37
4.13. Obtenção do extrato celular e ensaio de gene repórter.....	37
4.14. Análises estatísticas.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Expressão de Slfn4 e de outros genes do cluster em macrófagos desprovidos de RasGEF1b.....	39
5.2. Análise in-silico dos genes do cluster e estímulos com IFN-tipo I e II.....	43
5.3. Análise In-Silico de Slfn4.....	49
5.4. Ativação transcricional de Serpinb2 em macrófagos desprovidos de RasGEF1b.....	57
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIA.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Um das primeiras respostas do processo inflamatório é através da imunidade inata com células especializadas como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos e células *Natural Killer*, sendo umas das primeiras barreiras quando há um corpo estranho ou endotoxinas presentes no organismo. Alguns dos principais mecanismos realizados pelas células para defender o organismo é através da fagocitose, liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias e ativação de proteínas do sistema complemento (CRUVINEL *et al.*, 2010). Moléculas e drogas sintéticas são usadas em experimentos para simularem e estimular inflamações em organismos ou tipos celulares, e assim estabelecer fundamentos biológicos para potenciais terapias (LU, Yong Chen; YEH; OHASHI, 2008; MEDZHITOV; HORNG, 2009).

A administração de LPS (do inglês, *Lipopolysaccharides*), que são compostos da parede celular de bactérias gram-negativas, simula a infecção por patógenos e dispara a inflamação através de receptores do tipo Toll (TLRs), induzindo a expressão de citocinas proinflamatórias e de maturação funcional de antígenos apresentados às células do sistema imune inato (LUH; CHIANG, 2007; MARKOVIC *et al.*, 2009; MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005; MEI *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2017). O TLR4 é uma das moléculas mais conhecidas e sensíveis ao LPS localizadas na membrana celular das células do sistema imune inato (KARNATI; PASUPULETI, 2015; LU, Yong Chen; YEH; OHASHI, 2008; ROGER *et al.*, 2005). As vias de sinalização ativadas por LPS/TLR4 são divididas em duas, a dependente e a independente de MyD88 (do inglês, *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*). A primeira via é responsável principalmente pela expressão de citocinas proinflamatórias, e a outra via medeia a indução de interferons (IFNs) do tipo I e os ISG's (do inglês, *Interferon-Stimulated Genes*) (KARNATI; PASUPULETI, 2015; LU, Yong Chen; YEH; OHASHI, 2008). Ao final de cada cascata de sinalização, se encontram fatores de transcrição que irão regular a expressão de vários genes, promovendo um fenótipo no organismo. A regulação da expressão gênica em macrófagos ativados ou não é um processo complexo guiado por uma infinidade de mecanismos envolvendo diferentes componentes celulares que ainda permanecem inexplorados.

Ao estudarmos a regulação da expressão de qualquer gene a identificação da cromatina acessível facilita a busca por sítios de ligação para os fatores de transcrição. As regiões da cromatina ativas geralmente possuem marcadores como metilação e acetilação de histonas que [Digite aqui]

indicam promotores e enhancers (KIM; SHIEKHATTAR, 2015; THURMAN *et al.*, 2012). A regulação transcricional em células é importante para manter o estado ativado ou homeostático, funcional e o fenótipo da célula. Esse processo é guiado por mecanismos chave, tais como a modulação epigenética, fatores de transcrição, ligação de cofatores, interações de larga escala, metilação do DNA, edição de RNA e RNAs longo não codificantes (KUZNETSOVA *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2014). Esses mecanismos ajudam a manter a função basal da célula, mesmo quando não há estímulos. O fator de transcrição PU.1 é um exemplo de regulador basal que junto com H3K4me3 contribui para a abertura da cromatina local permitindo a combinação com outros fatores como IRF1, IRF8, SP1 e SP3 (CHEN, Siyuan *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2010; MANCINO *et al.*, 2015). Um experimento usando macrófagos provenientes de camundongos *knockout* para o fator de transcrição ATF3 identificou este fator como um regulador basal, aumentando a expressão para diversos genes em macrófagos tratados ou não com LPS e IFN. Entre esses genes, destacou-se o *Ch25h*, que foi identificado em nossas análises de RNA-seq (LABZIN *et al.*, 2015). O fator de transcrição C/EBP é responsável pela regulação dos genes como  $1\alpha$ -hydroxylase e *Serpinb2*, em macrófagos ativado ou não. Isso foi demonstrado em experimentos nos quais a inibição do fator C/EBP pelo seu dominante negativo LIP, ou mutações no local de ligação do fator no DNA, levaram à redução na expressão desses genes (ESTEBAN; VIDAL; DUSSO, 2004; UDOFA *et al.*, 2013).

A participação de RNAs longos e não codificantes podem regular os genes a nível basal em macrófagos ativado ou não. Por exemplo, o RNA longo não codificante E330013P06 ao ser super expresso em macrófagos RAW264.7 elevou a expressão de genes inflamatórios *Il10*, *Nos2*, *Il6*, *TNF*, *Ccl2* e *Cd36* nas células não ativadas e ativadas por LPS (REDDY *et al.*, 2014). O oncosupressor ARF que faz parte das superfamílias Ras-GTPases, também possui o seu papel na regulação negativa na expressão basal de genes, *Ccl2*, *Ccl17*, *Ccl12*, *Cxcl10*, *Cxcl15*, *Il2rb*, *Il5ra*, *Ltb*, *Tnfrsf1b* e *Xcr1* em macrófagos M2 (HERRANZ *et al.*, 2012)

### 1.1. A superfamília das Ras-GTPases

A regulação da transcrição de um gene ou grupo de genes é o que vai definir o fenótipo de uma célula a um determinado estímulo ou condição (JOHNSON; CHEN, 2012). As vias de sinalização que culminam a expressão gênica podem, em algumas situações, envolver fatores de

[Digite aqui]

troca de nucleotídeos de guanina da proteína Ras (RasGEFs, do inglês *Ras-associated guanine Exchange factor*) que compreendem uma família de proteínas que facilitam a dissociação de GDP das pequenas proteínas RasGTPases (VIGIL *et al.*, 2010; WENNERBERG; ROSSMAN; DER, 2005). As Ras GTPases formam uma superfamília de pelo menos 154 membros em humanos, sendo classificados com base na similaridade das suas sequências, funções e mecanismos bioquímicos, em cinco subfamílias: Ras, Rho, Rab, Arf, e Ran (REINER, 2018; WENNERBERG; ROSSMAN; DER, 2005).

Os RasGEFs realizam a dissociação do GDP e a consequente ativação das proteínas Ras, através da ligação ao GTP (CZIKORA *et al.*, 2017). A ativação inicia cascatas de sinalizações, culminando na regulação de diferentes eventos intracelulares como a transcrição de genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (XIE; OVERBEEK; RENEKER, 2006). Por exemplo, a ativação de GEF-H1 ou RhoGEF em macrófagos é essencial para a detecção de RNA estranho por receptores do tipo RIG-I, levando à fosforilação do fator de transcrição de IRF-3 e indução da expressão de interferon-beta de modo dependente dos sensores de ácido nucléico RIG-I e MDA-5 (CHIANG *et al.*, 2014). RasGRP3, um RasGEF ativador de Ras e Rap1/2, é um importante mediador de sinalização a jusante da sinalização de TLRs. Foi demonstrado que esse GEF de expressão abundante em macrófagos limita a produção de citocinas pro-inflamatórias (especialmente IL-6) em macrófagos ao ativar Rap1 sob condições de baixas concentrações de LPS, indicando seu papel em estabelecer um limite para impedir uma resposta inflamatória descontrolada (TANG *et al.*, 2014). Adicionalmente, experimentos com siRNA e análise de imunoprecipitação de ETS2 mostram que *IL-6* tem a sua expressão aumentada e junto com a imunoprecipitação na região promotora em macrófagos estimulados com LPS (MA *et al.*, 2019).

A regulação transcricional através das RasGTPases também pode ser vista em macrófagos tratados com ZNPs (nanopartículas de óxido de zinco). A ativação de PI3K e RasGTPases aciona a via de sinalização de MAPKs que fosforilam os fatores de transcrição da família NF- $\kappa$ B e as subunidades c-Jun e c-Fos do complexo AP-1, elevando por exemplo a expressão de *COX-2* (ROY *et al.*, 2014). Adicionalmente, a mutação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, NF-IL6 e CRE na região de -327 à +59 do promotor de *COX-2*, reduz a atividade transcricional do gene em macrófagos estimulados com LPS (ROY *et al.*, 2014). O fator de transcrição NF-IL6 pode ser conhecido por C/EBP-beta (AKIRA *et al.*, 1990) que é um pro-oncogênico e também induzido

[Digite aqui]

por macrófagos transformados com Myc/Raf (SEBASTIAN; JOHNSON, 2006), pode afetar a expressão de genes estimulados por LPS como *Serpinb2* (UDOFA *et al.*, 2013) e *IL-6* (SPOONER *et al.*, 2007). O gene *TSCI* que codifica uma proteína supressora de tumores, inibe a polarização de macrófagos M1 através da sinalização RasGTPase/Raf1/MEK-ERK enquanto promove a polarização de macrófagos M2, que está associada à reparação tecidual, por meio do caminho dependente de mTOR e do fator de transcrição C/EBP-beta (WANG *et al.*, 2022). O gene de *IL-6* possui outro fator de transcrição afetado por GTPases, em específico K-Ras, sendo STAT3 que comumente está associado com macrófagos ativados por interferon (GOUGH *et al.*, 2014).

O RasGEF1b que ativa a proteína Ras pertence a um grupo constituído por mais dois membros, RasGEF1a e RasGEF1c, que possuem a mesma estrutura (domínio REM e domínio catalítico CDC25), além de compartilharem relativa similaridade na sequência de aminoácidos (LEÃO *et al.*, 2020). A expressão de RasGEF1b em macrófagos e células dendríticas é dominante e significativamente elevada em relação aos membros 1a e 1b (ANDRADE *et al.*, 2010; LEÃO *et al.*, 2020). Recentemente foi demonstrado que Rap2a é uma GTPase alvo de RasGEF1b, com resultados demonstrando que Rap2a é ativada por LPS em macrófagos e por RasGEF1b em células HEK293. Porém, apesar de ser suficiente, esse GEF é apenas parcialmente necessário para a ativação de Rap2a nos macrófagos ativados por LPS (CARVALHO *et al.*, 2019).

Em camundongos, o perfil de expressão de Ras é mais abundante em cérebro, intestino e pulmões (ANDRADE *et al.*, 2010). Estudos apontam que o gene *RASGEF1B* está em uma região genômica crítica em humanos cuja a haplosuficiência pode estar relacionado ao fenótipo da síndrome da deleção do cromossomo 4q21, caracterizada por dimorfismo facial, restrição do crescimento progressivo, déficit intelectual grave e fala ausente ou severamente atrasada (BONNET *et al.*, 2010; ZARREI *et al.*, 2017).

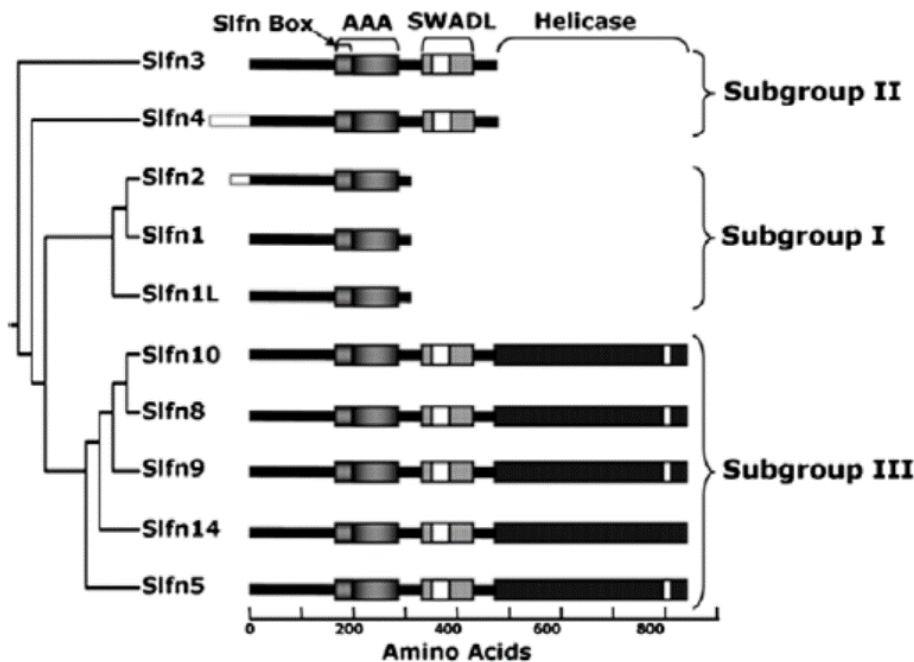
Embora a função e os mecanismos de ação de RasGEF1b sejam obscuras, existem fortes indícios que a molécula possui um importante papel no sistema imune. Recentemente, a caracterização da região promotora do gene, encontrou evidências que a região mínima ativada por TLRs abriga elementos regulatórios de fatores de transcrição críticos e associados à resposta imune, tais como o NF- $\kappa$ B e o Sp-1 (LEÃO *et al.*, 2020). Estudos de sequenciamento global de mRNAs sugerem que o RasGEF1b pode contribuir para a regulação da expressão de um grupo restrito de genes em macrófagos no estado de repouso ou ativados por LPS, incluindo um membro da família

[Digite aqui]

Schlafen, o *Slfn4*, um gene responsivo a interferons e agonistas de TLRs, como LPS (FERNANDES *et al.*, 2023).

## 1.2. A Proteína Schlafen

Os genes da família Schlafen (*Slfn*) foram inicialmente encontrados e descritas por Schwars *et al* (1998) como um grupo diferencialmente expresso no processo de maturação de células timócitos e ativação das células T de camundongos. Por meio de um alinhamento de aminoácidos os autores definiram sete membros baseado no tamanho da molécula e as dividiu em dois grupos, sendo o Slfn1 e 2 as menores, e do Slfn3-7 como os maiores possuindo 200 aminoácidos a mais na extremidade carboxy-terminal (SCHWARZ; KATAYAMA; HEDRICK, 1998). Trabalhos posteriores (GESERICK, 2004; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013a; NEUMANN *et al.*, 2008a; SOHN *et al.*, 2007), apresentaram um reorganização das proteínas Slfn em três grupos baseados nas suas estruturas proteicas e outras características relacionadas a função na resposta biológica da célula. O primeiro subgrupo é formado pelo Slfn1, 1L e 2 com uma massa molecular de 37 à 42 kDa, o segundo subgrupo possui o Slfn3 e 4 com a massa molecular entre 58 e 68 kDa, e o último subgrupo é constituído pelo restante dos membros Slfn com massa molecular de 100 à 104 kDa (**Figura 1**) (GESERICK, 2004; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013a; NEUMANN *et al.*, 2008a).



**Figura 1: Organização da família Schlafen em murinos.** As 10 proteínas Slfn murinas estão alinhadas em uma árvore filogenética à esquerda, que evidentemente divide a família em três subgrupos distintos. As caixas sombreadas representam regiões de alta conservação dentro das proteínas Slfn. O “ Slfn box ” e o domínio AAA divergente caracterizam todas as proteínas Slfn, enquanto o “ SWADL ” e os domínios de DNA / RNA helicase são exclusivos dos subgrupos II e / ou III (GESERICK, 2004; NEUMANN *et al.*, 2008b).

As funções dos Slfns evidenciam fortemente que eles possuem a sua expressão correlacionada com quiescência de células imunes, especificamente na modulação da mielopoiese (DING *et al.*, 2016; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013b; MERCHANT; DING, 2017; VAN ZUYLEN *et al.*, 2011). Os membros da família de Slfn tem sua expressão induzida por interferons que podem ser produzidos em resposta, por exemplo, a DAMP’s de bactérias, vírus, fungo e parasitas. O reconhecimento de DAMP’s por receptores do tipo Toll inicia diversas cascatas de sinalização. Dentre estes receptores, destacam-se o TLR-3 e 4, que quando ativados por via independente de Myd88, modulam a resposta do sistema imune à uma inflamação e a indução de interferons (LU, Yong Chen; YEH; OHASHI, 2008). Os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e IRFs (fator regulador de IFNs) fazem parte da modulação do sistema imune e levam à expressão de IFNs, que por sua vez induzem a expressão de outros genes responsivos aos IFNs (ISGs, do inglês *IFN-stimulated genes*), incluindo *Slfn4* (DING *et al.*, 2016; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013b; MERCHANT; DING, 2017).

[Digite aqui]

*Slfn4* tem sido implicado como uma das principais moléculas envolvidas na regulação da mielopoiese durante a diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea, assim como um marcador de uma população de células supressoras de origem mielóide sobre a mucosa gástrica (MDSC, do inglês *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) (DING *et al.*, 2016; VAN ZUYLEN *et al.*, 2011). Uma análise de microarranjo de tecido gástrico de camundongos desprovidos de Gli1 – um fator de transcrição da via de sinalização Hedhehog – infectados com *Helicobacter felis*, identificou *Slfn4* como um fator alvo e posteriormente sendo confirmado por imunoprecipitação da cromatina (EL-ZAATARI *et al.*, 2013). O mesmo grupo de pesquisa realizou experimentos com células mielóides peritoneais de camundongos desprovidos de Gli1 e trataram com *H. felis*, recombinante de rSHH ou ambos, e interferon alfa. Os resultados mostraram que a expressão de *Slfn4* foi consideravelmente prejudicada, não obtendo a sua expressão máxima quando comparada com os camundongos selvagens (DING *et al.*, 2016). O uso de RNA de interferência de *Slfn4* em MDSC SLFN4<sup>+</sup> reduziu significativamente os níveis dos mRNAs de *Arg1* e *Nos2* (MERCHANT; DING, 2017), reforçando a possível função imunossupressora. Este conjunto de dados reforça a possível função de *Slfn4* como modulador e marcador de células de origem mielóides, diante de uma infecção.

Por ser um gene responsivo a IFNs tipo I, *Slfn4* pode potencialmente desempenhar algum papel nas respostas às infecções bacterianas e virais. Consistente com essa observação, a expressão de *Slfn4* é aumentada em macrófagos em resposta à estimulação por LPS (VAN ZUYLEN *et al.*, 2011), e dados de transcriptoma publicados por outros relataram níveis elevados do mRNA de *Slfn4* em BMDMs após infecção com vírus Sendai (TYNER *et al.*, 2005), e nos pulmões de camundongos infectados com vírus influenza A/PR/8/34 (ENGLER *et al.*, 2005).

O *Slfn12* e *12L* são preditos como homólogos funcionais de *Slfn4* em humanos, pois apresentam motivos semelhantes em suas sequências de aminoácidos. Em um trabalho recente que acompanhou por 13 anos indivíduos com metaplasia intestinal cujas lesões progrediram para câncer gástrico identificou que os níveis de *Slfn5* aumentaram significativamente (MERCHANT; DING, 2017). *Slfn12L* e *Slfn5* foram mais expressos em células mielóides e células T, assim como ocorre com *Slfn4* em camundongos (COMPANIONI NÁPOLES *et al.*, 2017). Reunindo esses dados é possível prever que indivíduos com inflamação gástrica possuem maior probabilidade de desenvolver metaplasia (COMPANIONI NÁPOLES *et al.*, 2017; MERCHANT; DING, 2017).

[Digite aqui]



Entretanto os mecanismos de como os genes da família Schlafen são regulados no contexto inflamatório, não são claras.

### 1.3. O gene *Serpinb2*

O SerpinB2, também conhecido como inibidor do ativador do plasminogênio tipo 2 (PAI-2, do inglês *Plasminogen activator inhibitor 2*), está envolvido em muitos processos celulares dentro do sistema imune entre eles, imunomodulação da imunidade inata e adaptativa, regulador de autofagia em macrófagos (GEIGER; WAHLMÜLLER; FURTMÜLLER, 2015; SCHRODER; MAJOR; SUHRBIER, 2011). Por estar envolvido nestes processos celulares também é estimulado por diversos agentes externos como ligantes de TLR, infecções bacterianas, virais e parasitárias, e citocinas. O tratamento de células THP-1 e U937 com phorbol myristate acetate (PMA), um ativador de proteína quinase C (PKC) que geralmente é usado para diferenciação e indutor de proliferação celular, induz a expressão de *SERPINB2* com a progressão do tempo (SCHUSTER; MEDCALF; KRUIHOF, 1993). A região promotora de *SERPINB2* responsiva a PMA possui dois sítios para a ligação do complexo AP-1 e quando o sítio mais a montante é mutado, a ativação por luciferase é prejudicada (STRINGER; UDOFA; ANTALIS, 2012). O complexo AP-1 é formado por uma família de fatores de transcrição Fos e Jun estes fatores são ativados pela início da sinalização TLR (HU *et al.*, 2007). Adicionalmente a super expressão da subunidade Fos-B pode causar a redução da atividade de *SERPINB2* (STRINGER; UDOFA; ANTALIS, 2012).

O alinhamento da região 5' de *Serpinb2* com o *SERPINB2* mostrou regiões conservadas entre eles, com a identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição E BOX, PU.1, Oct-1, C/EBP, CRE e AP-1 dentro do segmento de -539pb à +92pb de murino. Ao avaliar a atividade de luciferase do promotor pra cada sítio mutado, C/EBP, CRE e AP-1 foram os que tiveram a menor atividade em macrófagos em níveis basais e tratados com LPS (UDOFA *et al.*, 2013). Ao investigar a importância de C/ebp-beta sobre a indução de *Serpinb2* em macrófagos peritoneais silenciados para *Cebpb* e tratados com LPS, há uma redução da expressão de *Serpinb2* (UDOFA *et al.*, 2013). O fator de transcrição C/EBP e o complexo AP-1 são moléculas ativadas por LPS/TLR induzindo a expressão de genes inflamatórios e citocinas (GANGWANI; KUMAR; BUCH, 2015; LIU, Xuefang *et al.*, 2018; LU, Yong-Chen *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2001). Portanto, ambos fatores de transcrição C/ebp-beta e AP-1 possuem papéis relevantes na ativação do *Serpinb2* em

[Digite aqui]

camundongos e humanos. No entanto, ainda não está muito claro qual é o mecanismo exato pelo qual esses fatores de transcrição atuam.

A regulação transcricional de *Serpinb2* vai além de fatores de transcrição mas também por vias epigenéticas ou de RNAs não codificantes (ncRNAs). Um cluster de quatro ncRNAs nomeados 772, 773, 774 e 571 são encontrados a aproximadamente 21 kb de *SERPINB2*. Esses quatro ncRNAs estão dentro de duas regiões caracterizadas como enhancers apontados pelo marcadores epigenéticos de H3K4me1 e me2, H3K27ac em monócitos estimulados com LPS. Tanto a superexpressão ou knockdowns dos quatro ncRNAs alteram de forma diretamente proporcional a expressão de *SERPINB2* por meio da interação de proteínas pausa-liberação (NELF e CDK9) e recrutamento de fatores de transcrição (c-Jun) (SHII *et al.*, 2017).

A indução da expressão de *Serpinb2* é mais relevante em BMDMs, macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato e células dendríticas quando estimulados por agonistas de TLR, como LPS, CpG e Poly(I:C) (SCHRODER *et al.*, 2010). Embora não haja evidências na literatura de que o gene seja induzido por citocinas como IFN do tipo I, existem dados que sugerem que ele possa ser reprimido por IFN do tipo II (IFN-gama), bloqueando a ligação de STAT3, proteína c-Jun do complexo AP-1, p300, o componente MED1 e CDK8 (KANG *et al.*, 2019, 2017). Adicionalmente existem experimentos em camundongos knockout de *Serpinb2* mostrando que a transferência de macrófagos peritoneais residentes (RPMs) sem *SerpinB2* tratados com OVA e LPS resultou em um número significativamente maior de células T secretoras de IFN-gama específicas para OVA, em comparação com a transferência de RPMs tratados de maneira semelhante de camundongos normais, indicando que *Serpinb2* pode afetar a secreção de IFN do tipo II (SCHRODER *et al.*, 2010). O *Serpinb2* também exerce função no aumento da secreção da citocina C5a e diminuição de IL-10 em camundongos knockout para *Serpinb2* infectados com de *Pneumococcal meningitis*, além de aumentar a hemorragia no cérebro (TESKE *et al.*, 2022).

Os macrófagos peritoneais residentes (RPMs) expressam constitutivamente *Serpinb2*. Essa população de células é formada por duas subpopulações conhecidas como macrófagos peritoneais largos (LPMs) e pequenos (SPMs) (ROSAS *et al.*, 2014; SCHRODER *et al.*, 2010; SCHRODER; MAJOR; SUHRBIER, 2011). Macrófagos peritoneais residentes de animais no knockout para o gene aumentam a migração sobre o matrigel, provavelmente pela inibição dependente de uPA que

[Digite aqui]

é uma molécula chave para a degradação extracelular possibilitando o deslocamento de macrófagos e monocitos (FLEETWOOD *et al.*, 2014; SCHRODER *et al.*, 2019). Assim como RPMs, a atividade migratória é aumentada e a fagocitose é reduzida em BMDMs de camundongos knockout para *Serpib2* estimulados com CCL2 e LPS/IFN-gama, respectivamente para cada experimento (SEN *et al.*, 2020).

Em uma análise de dados de microarranjo de cDNA de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos knockout para GATA6 a expressão de *Serpib2* foi reduzida sugerindo que o fator induz a expressão do gene (ROSAS *et al.*, 2014). Ao buscar fatores regulatórios utilizando uma lista de genes diferencialmente expressos (DEGs) de RPMs de camundongos *Serpib2*<sup>R380A</sup> (mutado na região ativa) e de camundongos selvagens que migraram no matrigel, foram encontrados diversos fatores de transcrição associados à regulação positiva e negativa, bem como à polarização M1, especialmente ligados à resposta de interferon. Entre eles estão os IRFs (IRF1, 3, 7 e 5), os STATs (STAT1 e 6) e os membros da família de NF-κB (SCHRODER *et al.*, 2019).

Sendo assim, a regulação transcricional de *Serpib2* ainda é obscura em macrófagos pois o gene é responsivo a uma variedade de funções dentro da homeostase e no processo inflamatório. A busca por fatores de transcrição em macrófagos depende do estímulo dado a célula dificultando a busca por um elemento chave para a transcrição. A descoberta por meio do RNA-seq que indica a expressão reduzida do gene em BMDMs knockout para RasGEF1b tratados ou não com LPS, é uma novidade e mais um ponto para ser investigado e complementar o que se sabe sobre o gene.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os macrófagos são células especializadas do sistema imunológico que desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase dos tecidos, no combate a infecções e na regulação das respostas imunológicas. A regulação da expressão gênica nestas células é importante porque determina os programas moleculares que controlam a função, o comportamento, e pode ajudar a identificar novos alvos terapêuticos a fim de desenvolver tratamentos mais eficazes. Além disso, os perfis de expressão gênica nos macrófagos podem ser usados como biomarcadores para prever a progressão de doenças e a resposta à terapia, podendo melhorar assim o diagnóstico e prognóstico de muitas doenças. Ademais, ao estudar a expressão gênica nos macrófagos, podemos ter uma compreensão melhor de como ela é regulada por moléculas de função ainda [Digite aqui]

desconhecida e podem melhorar nossa compreensão das bases moleculares de regulação gênica. Em geral, o estudo da regulação de expressão de genes nos macrófagos tem um grande potencial para melhorar a saúde pública e avançar nossa compreensão da biologia.

Análises de transcriptoma revelam que a expressão de *Slfn4* é reduzida em macrófagos desprovidos de RasGEF1b em estado de repouso e ativados com LPS (FERNANDES *et al*, 2023). Adicionalmente, nossos dados de RT-qPCR confirmam a expressão reduzida de *Slfn4*, *Serpinb2* e de genes do cluster, permitindo inferir a existência de elementos regulatórios (motivos) e fatores de transcrição em comum que regulam a transcrição em macrófagos estimulados com LPS para este grupo seletivo de genes. Portanto, a caracterização da região promotora de *Slfn4* e o estudo da atividade da região regulatória de *Serpinb2* poderá auxiliar na investigação por quais mecanismos RasGEF1b está regulando a expressão, junto com os demais genes do cluster apontados pelo RNA-seq no contexto inflamatório. Logo, nós hipotetizamos que RasGEF1b regula a expressão e ativação transcricional de *Slfn4* e *Serpinb2* em macrófagos em repouso e ativados na resposta imune.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo principal é investigar o papel do fator RasGEF1b na regulação transcricional basal e induzida de *Slfn4* e *Serpinb2* em macrófagos.

#### 3.2. Objetivos específicos

1 – Determinar os níveis de mRNA de *Serpinb2*, *Slfn4* e de genes do cluster em BMDM's de camundongos do tipo selvagem e desprovidos de RasGEF1b tratados e não tratados com LPS, IFNs do tipo I e IFN-II.

2 – Conduzir análises *in silico* da sequência nucleotídica a montante da sequência codificadora de *Slfn4*, *Serpinb2* e de genes do mesmo cluster, indicados pelo RNA-seq, para a identificação de fatores de transcrição em comum associados ao estado ativado e inativado de macrófagos.

3 – Identificar, por meio de análises *in silico*, a região promotora putativa de *Slfn4* e determinar os sítios de ligação para possíveis fatores de transcrição responsáveis pelo estado basal e ativado de macrófagos

4 – Avaliar a região promotora putativa de *Slfn4* através de ensaios de luciferase a sua atividade transcricional após estimulação com IFN tipo I.

5 – Avaliar o efeito da superexpressão de RasGEF1b sobre a atividade transcricional da região promotora de *SerpinB2* sem e com mutações em sítios de ligação para fatores de transcrição, utilizando ensaios de gene repórter.

6 – Determinar por ensaios de gene repórter a atividade transcricional da região promotora de *Serpinb2* em macrófagos RAW264.7 silenciados de RasGEF1b antes e após a estimulação com LPS.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais e genotipagem

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) foram providos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, UFMG). Camundongos deleção ubíqua de RasGEF1b (RasGEF1b-KO) com background de C57BL/6 foram gerados pelo cruzamento de camundongos de *Rasgef1b<sup>flox/flox</sup>* com camundongos transgênicos CMV-Cre (FERNANDES *et al*, 2023). Foram utilizados animais com idade de 8 a 12 semanas, machos ou fêmeas, para os experimentos. O manuseio dos animais para a obtenção de células da medula óssea para a diferenciação em BMDMs está de acordo com certificados aprovados pelo comitê de ética no uso de animal (CEUA) da UFMG (Nº dos protocolos: 155/2019 e 64/2019).

Para o monitoramento do genótipo dos animais utilizados nos experimentos, foram realizadas PCRs a partir do DNA genômico obtido da cauda dos animais. Brevemente, um pequeno fragmento da cauda (2-5 mm) foi incubado em tampão de digestão (5mM EDTA, pH 8,0; 200mM NaCl; 100mM Tris, pH 8; 0,2% SDS; 0,4mg/mL de proteinase K, LGC Biotecnologia). Após a incubação *overnight* a 55°C, a proteinase K foi inativada a 85°C por 15 minutos, seguido de centrifugação em 16.000 g por 15 minutos. A fase aquosa da amostra foi submetida à precipitação com isopropanol (Sigma – Aldrich), centrifugada a 16.000g por 10 minutos para a obtenção do sedimento de DNA. Em seguida, o sedimento foi lavado em etano 70% (Sigma – Aldrich), centrifugado a 16.000 g por 5 minutos e por fim solubilizado em água livre de DNase à 55°C por 2 horas. O DNA foi então armazenado a -20°C até o uso.

### 4.2. Cultivo de células imortalizadas

Foram usadas nesse trabalho as linhas de células de embrião de rim humano HEK293, fibroblastos murinos L929 e macrófagos murinos RAW264.7. Para o cultivo das células, elas eram retiradas do nitrogênio ou -80°C, descongeladas imediatamente em banho de água a 37°C e transferidas para tubos de centrifuga de 15mL contendo 5mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco), em seguida centrifugadas por 200g por 5 minutos. Posteriormente, o meio era desprezado para a eliminação de DMSO (Dimetilsufóxido) proveniente do meio de congelamento, e o sedimento ressuscitado em 6mL de meio DMEM suplementado [Digite aqui]

com 10% de soro fetal bovino (Gibco – USA) e antibiótico (100µg/mL estreptomicina / 100U/mL penicilina – Gibco – USA). As células eram então transferidas para garrafas de superfície tratada para cultura de células (T25 – Sarstedt) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem a subconfluência (entre 80-90%) era realizada a passagem para uma garrafa de maior área (T75 – Biofil) para a manutenção da cultura. Para a realização das passagens, o meio era desprezado e a monocamada de células era lavada com PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) duas vezes. Em seguida, 1mL de tripsina (0,5%) era adicionado, e a garrafa era incubada a 37°C por 1 à 5 minutos. Posteriormente, 5mL de meio DMEM completo fresco era adicionado e as células eram ressuspendidas em um volume total de 6mL. Parte da suspensão era desprezada e o restante era completado em um volume final para 12mL. Para a manutenção das linhagens o estoque era constantemente renovado através do congelamento das culturas. Ao atingirem entre 80 a 90% de confluência, as células eram lavadas com PBS e tripsinizadas como já descrito, e eram ressuspendidas em meio de congelamento 90% de soro fetal bovino 10% de DMSO (Hybri-Max, Sigma). Um mililitro dessa suspensão era adicionado em criotubo (Corning) e transferido para um freezer -80°C.

As células L929 eram cultivadas para a obtenção do sobrenadante rico em M-CSF (do inglês, *Macrophage colony-stimulating factor*) usado na suplementação dos meios de diferenciação e manutenção de BMDM's. Quando as células atingiam a subconfluência, elas eram mantidas por 10 dias em cultura com 30 mL de meio DMEM completo. Em seguida, o sobrenadante era coletado, centrifugado a 400 x g, 4°C por 10 minutos, filtrado em filtro estéril de 0.22µm e congelados em -80°C até serem usados.

As células utilizadas eram frequentemente submetidas a testes de detecção de contaminação por *Mycoplasma ssp.* através de PCR para amplificação do rRNA 16s conservado entre as espécies de *Mycoplasma* (VAN KUPPEVELD *et al.*, 1994). Usando os oligonucleotídeos senso GPO3, 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' e antisenso MGSO, 5'-TGCACCATCTGTCCTCTGTAAACCTC-3'.

#### 4.3. Geração de células RAW264.7 que expressam shRNA para RasGEF1b

Células RAW264.7 estavelmente silenciadas de RasGEF1b foram geradas e caracterizadas por Cícera A. C. Santos (doutoranda do PPG-Biologia Celular da UFMG) e encontram-se descritas [Digite aqui]

em (FERNANDES *et al*, 2023). Brevemente, o vetor pLKO.1 lentiviral carregando o shRNA direcionado ao transcrito de RNA mensageiro RasGEF1b de camundongo foi obtido da Sigma (Sigma-Aldrich, EUA). O vetor pLKO.1 shRNA que codifica direcionado ao RNA mensageiro RASGEF1B humano foi utilizado como controle. As preparações de lentivírus foram realizadas como pseudotipos de vírus estomatite vesicular G (VSV-G) pela transfeção de células HEK293T com preparações de plasmídeos livres de endotoxina dos vetores pLKO.1, psPAX2 e pMD2.G na proporção 4:3:1 usando polietilenoimina (PEI). As células RAW264.7 ( $1 \times 10^6$ ) foram transduzidas em uma placa de 6 poços com 1,5 ml do vírus e selecionadas em meio contendo 5,0 µg/ml de puromicina três dias depois.

#### 4.4. Obtenção, cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e tratamentos

BMDM's de camundongos WT e RasGEF1b-KO foram obtidos por diferenciação *ex vivo* de células da medula óssea. As células precursoras da medula foram obtidas do fêmur e tíbia sendo diferenciadas durante sete dias em meio RPMI 1640 com 20% SFB, 30% de sobrenadante de cultura de células L-929 (fonte de M-CSF, do inglês *macrophage-colony stimulating factor*), 2mM de glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 50µM de 2-mercaptoetanol (Vetec). Para os experimentos com BMDMs, as concentrações de SFB e sobrenadante de células L-929 foram reduzidas para 10% e 5%, respectivamente, um dia antes do início dos experimentos. As células eram plaqueadas a  $1 \times 10^6$  células/poço em placas de superfície tratada de 24 poços (Jet Biofil). Após 24 horas de plaqueamento eram feitas as estimulações com 100ng/mL de LPS (O55:B5 – Sigma-Aldrich, EUA), 1000U/ml de IFN-beta e 10ng/mL de IFN-gama (Catálogo: 554587 – BD Pharmigen™). Para o experimento de estabilidade de RNA, BMDMs foram estimulados por 4 horas com LPS e tratados com 5µg/mL de actinomicina D e os dados foram normalizados para porcentagem.

#### 4.5. Extração de RNA total e síntese de cDNA

O meio de cultura dos BMDM's era desprezado, em seguida era adicionado o reagente TRIzol (Invitrogen) e a extração do RNA total seguiu as recomendações do fabricante. A quantificação e a razão 260nm/280nm foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA). O RNA total foi armazenado a -80°C até ser processado. O cDNA foi

[Digite aqui]



preparado com 1µg de RNA total, na presença de oligo-dT12-18 (0,5ug) e 200U da enzima transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Todos os procedimentos foram realizados com material autoclavado, plásticos e reagentes livres de RNase.

#### 4.6. Oligonucleotídeos e condições termocíclicas

Para RT-qPCR e PCR convencional, as sequências dos iniciadores foram obtidas no PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) ou, quando não disponíveis, desenhadas a partir do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os seguintes iniciadores forward e reverso, respectivamente, foram usados (**Tabela 1**):

**Tabela 1:** Lista de iniciadores utilizados para amplificação e as condições termocíclicas utilizadas. em cada reação.

Alvo e Reação	Iniciadores	Sequência 5'→3'	Condições termocíclicas	
rRNA 16	Fwd	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT	94C/5'	(35 ciclos)
( <i>Mycoplasma ssp</i> )	Rev	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	94C/30" 55C/30" 72C/30"	
PCR			72C/5'	
<i>Rasgef1b</i>	Fwd	GCTACAGCGAACGGAAGAA	94C/10" 55C/15" 60C/60"	(40 ciclos)
RT-qPCR	Rev	CTTCACAGGCATGCAGATTTC		
<i>Rpl32</i>	Fwd	GCTGCCATCTGTTTTACGG		
RT-qPCR	Rev	TGACTGGTGCCTGATGAACT		
<i>Slfn4</i>	Fwd	GGCTCCCTGCGTAAAGGAAC		
RT-qPCR	Rev	GGGTAACATATTTTCGCGCTTG		
<i>Serpinb2</i>	Fwd	ATTGGCAGTTATGGTATCACCAC		
RT-qPCR	Rev	GGTGTGTGATTGTTGAGCTG		
<i>Ch25h</i>	Fwd	TGCTACAACGGTTCGGAGC		
RT-qPCR	Rev	AGAAGCCCACGTAAGTGATGAT		
<i>Selp</i>	Fwd	CATCTGGTTCAGTGCTTTGATCT		
RT-qPCR	Rev	ACCCGTGAGTTATTCCATGAGT		
<i>Cd38</i>	Fwd	TCTCTAGGAAAGCCCAGATCG		
RT-qPCR	Rev	GTCCACACCAGGAGTGAGC		
<i>Irf-1</i>	Fwd	CCGAAGACCTTATGAAGCTCTTTG		
RT-qPCR	Rev	GCAAGTATCCCTTGCCATC		

[Digite aqui]

#### 4.7. PCR quantitativo (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o cDNA diluído 1:10 usado como DNA molde juntamente com 5µL do kit *2X SsoAdvanced SYBR Green Mix* (BioRad) e 0,5 µL de cada iniciador a 10mM, e completando a reação com 2µL com Água Ultrapura. As reações eram colocadas em placas de 96 poços (Axygen) e transferidas para o termociclador CFX96 Touch (BioRad). As condições termocíclicas usadas, seguiram as recomendações do fabricante do kit *SYBR Green PCR Master Mix*. A especificidade das reações eram confirmadas pela curva de *melting*. Os dados foram normalizados pelo gene de referência *Rpl32* e os níveis relativos de expressão foram analisados de acordo com a equação de  $2^{-\Delta Cq}$ , onde o  $\Delta Cq = Cq$  (gene alvo) –  $Cq$  (gene normalizador).

#### 4.8. Enriquecimento de motivos de DNA

As sequências de DNA contendo 500 nucleotídeos a montante seguidos de 100 nucleotídeos a jusante do provável sítio de início da transcrição (TSS, do inglês *transcription start site*) das regiões promotoras dos genes foram obtidas do banco de dados EPD promoter (<https://epd.epfl.ch//index.php>). Em seguida, foram realizadas buscas por motivos comuns no grupo das sequências nucleotídicas usando a plataforma MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) tendo como critérios: 1) 5 motivos, 2) zero ou que tenha uma ocorrência por sequência, 3) tamanho mínimo do motivo de 6 nucleotídeos, 4) tamanho máximo do motivo de 20 nucleotídeos, seguido da comparação dos motivos contra banco de dados de motivos conhecidos e classificação usando a ferramenta Tomtom (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>). O enriquecimento dos sítios de ligação para fatores de transcrição (motivos) foi analisado ao usar o banco de dados do catálogo de preferências de ligação de sequência inferida (CIS-BP, do inglês *Catalog of Inferred Sequence Binding Preferences*) (<http://cisbp.cibr.utoronto.ca/>) (WEIRAUCH *et al.*, 2014) e Pscan (<http://159.149.160.88/pscan/>). Também foi usado o *Tfbind* e foram selecionados fatores com score > 90% (<https://tfbind.hgc.jp/>).

#### 4.9. Análise da provável região promotora de *Slfn4*

[Digite aqui]

A análise de sequência a montante do TSS visa buscar por elementos regulatórios de ligação a fatores de transcrição que estejam presentes na estrutura do promotor putativo de *Slfn4* (Número de acesso: NC\_000077.5). A região foi selecionada identificando os marcadores epigenéticos de H3K4me3 e H3K9ac, assim como dados de DNase-seq usando a plataforma do UCSC *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/index.html>). Em seguida foi feito um alinhamento da região de 1764pb (-1670pb/+94pb) usando o Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e mVista (<https://genome.lbl.gov/vista/mvista/about.shtml>) para buscar regiões conservadas entre diversas espécies. O rVista (<https://rvista.dcode.org/>) foi usado para comparar motivos conservados para fatores de transcrição no alinhamento das sequências nucleotídicas de *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*. Para a identificação de microsatélites foi usado o programa online Microsatellite Repeats Finder ([http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/microsatellites/?info](http://insilico.ehu.es/mini_tools/microsatellites/?info)) com o comprimento mínimo de repetição tandem de 10, e o restante com as configurações padrão do programa, também foi usado e Tandem Repeats Finder (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

#### 4.10. Transformação bacteriana

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho foram transformados em bactérias quimiocompetentes DH5-alfa para a replicação e posterior obtenção dos mesmos em pequena e média escala. Para tal, as bactérias eram retiradas do freezer -80C e deixadas em gelo para descongelamento. Cem nanogramas de plasmídeo (**Tabela 2**) eram misturados a 100µL da suspensão de bactérias. A amostra era incubada por 30 minutos em gelo, seguido de choque térmico em banho de água a 37C por 45 segundos e 2 minutos em gelo. Em seguida, 1mL de meio Luria Bertani (L.B. Medium – Kasvi) sem antibiótico era adicionado e a amostra era incubada por 1 hora e 37C em shaker orbital (MA410 – Marconi). A amostra era então centrifugada por 15 segundos, 900µL do sobrenadante era descartado e o pellet formado era ressuspensionado nos 100µL de LB líquido restantes, em seguida era plaqueado em placas de petri contendo ágar (Agar – Kasvi) 1,5% preparado em meio LB com 100µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). As placas eram incubadas em estufa a 37C por 16 horas.

Os plasmídios comerciais pFLAG-CMV4 foi adquirido da Sigma, e o pGL3-basic e pRL-TK da Promega, e pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b da GenScript Biotech, USA. O pGL3-Slfn4 (-1670/+94) foi sintetizado pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil). O pGLmP-539, pGLmP-539mC/EBP, pGLmP-539mAP-1a, pGLmP-539mAP-1b e pGLmP-539mCRE foram cedidos [Digite aqui]

cordialmente por Toni M. Antalis. Essas construções foram sequenciadas para confirmar as mutações nos respectivos sítios. O pGL2-561 foi cordialmente cedido por Bryan Williams, The Cleveland Clinic Foundation, USA.

**Tabela 2:** Lista e descrição dos plasmídeos utilizados para transfecção.

Plasmídeos	Descrição
pFLAG-CMV4	Plasmídeo de expressão eucariótica contendo o epítopo FLAG.
pRL-TK	Contém o gene da luciferase de celenterado <i>Renilla</i> sob o controle transcricional do promotor do gene da timidina cinase do vírus HSV-1.
pGL3-basic	Plasmídeo comercial (Promega) contendo o gene da luciferase de vagalume <i>Photinus pyralis</i> , ausente de promotor.
pGLmP-539	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 631 nucleotídeos (-539/+92) da sequência não-codificadora de <i>Serpinb2</i> murino (UDOFA <i>et al.</i> , 2013).
pGLmP-539mC/EBP	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 631 nucleotídeos (-539/+92) da sequência não-codificadora de <i>Serpinb2</i> murino com o sítio de C/EBP mutada (UDOFA <i>et al.</i> , 2013).
pGLmP-539mAP-1a	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 631 nucleotídeos (-539/+92) da sequência não-codificadora de <i>Serpinb2</i> murino com o sítio de AP-1a mutada (UDOFA <i>et al.</i> , 2013).
pGLmP-539mAP-1b	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 631 nucleotídeos (-539/+92) da sequência não-codificadora de <i>Serpinb2</i> murino com o sítio de AP-1b mutada (UDOFA <i>et al.</i> , 2013).
pGLmP-539mCRE	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 631 nucleotídeos (-539/+92) da sequência não-codificadora de <i>Serpinb2</i> murino com o sítio de CRE mutada (UDOFA <i>et al.</i> , 2013).
pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b	Plasmídeo de expressão eucariótica de RasGEF1b (NM_145839) foi clonado no pcDNA3.1+-DYK contendo o epítopo FLAG no N-terminal DYKDDDDK.
pGL3-Slfn4 1670/+94)	(- Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA de 1764 nucleotídeos (-1670/+94) da sequência não-codificadora de <i>Slfn4</i> murino.
pGL2-561	Contém o gene da luciferase de vagalume sob o controle transcricional de um segmento de DNA da sequência não codificadora -134pb à +1pb de <i>Ifit1</i> (BANDYOPADHYAY <i>et al.</i> , 1995).

#### 4.11. Obtenção de DNA plasmidiano em pequena (miniprep) e média escala (midiprep)

As colônias de bactérias DH5-alfa transformadas eram selecionadas das placas de petri e individualmente inoculadas em tubos de polipropileno (15mL) contendo 5 mL de meio LB com ampicilina a 100µg/mL. Os tubos eram incubados sob agitação a 37°C por 16 horas. Para a extração dos plasmídeos em pequena escala o “Plasmid Mini Purification Kit” (Mebeq Bioscience) era utilizado de acordo com o protocolo do fabricante. Para a obtenção dos plasmídeos em média escala eram utilizados os kits “GenElute™ HP Plasmid Midiprep” (Sigma-Aldrich) e “GenElute™ Endotoxin-Free Plasmid Midiprep” (Sigma-Aldrich), sendo que este último usado para a obtenção de DNA plasmidiano livre de endotoxinas de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.12. Transfecções

Células HEK293 e RAW264.7 foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, no dia seguinte as transfecções eram realizadas quando as células apresentavam confluência 80-90%. Quatrocentos nanogramas do plasmídeo pGLmP-539 e pGL3-*Sifn4* foram transfectados juntamente com 100ng do plasmídeo pRL-TK que promove a expressão constitutiva da luciferase da *Renilla*, usado como normalizador nos ensaios de gene repórter. Um micrograma e três microgramas do plasmídeo de RasGEF1b foram transfectados para avaliar a ativação do promotor pGLmP-539. A quantidade de DNA transfectado era mantida constante pela transfecção do plasmídeo pFLAG-CMV4 (vetor vazio) nas células que não recebiam plasmídeos de expressão citados. As transfecções foram realizadas através do método catiônico por meio do uso do reagente polyethyleneimine (PEI) na proporção 5:1 (µL de PEI : µg de DNA/poço). A mistura era vigorosamente vortexada por 10 segundos e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Eram adicionados 200µL de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% penicilina/streptomicina, e o volume total de 300µL da mistura era adicionado a cada poço. As placas eram incubadas em estufa, e a transfecção ocorria por 18 horas até a obtenção do extrato para ensaio de gene repórter.

#### 4.13. Obtenção do extrato celular e ensaio de gene repórter

Para a obtenção do extrato celular e leitura de gene repórter, o meio de cultura de cada poço foi aspirado por sucção a vácuo e adicionado 200µL de tampão de lise passiva (PLB 1X, do inglês *Passive Lysis Buffer*) (Promega). A placa era incubada a temperatura ambiente em um shaker [Digite aqui]

orbital por 15 minutos, posteriormente era armazenada no -20C até o momento da leitura da luminescência. Para tal, as amostras eram descongeladas e dez microlitros dos extratos de HEK293 ou RAW264.7 eram adicionados em uma placa opaca de cor branca (FluoroNunc, Nunc, EUA). Em seguida, 40µL do reagente “LARII” (Promega) foi acrescentado e as amostras foram lidas no aparelho no LuminoSkan (Thermo Scientific). Após a leitura da luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*), a placa foi retirada do aparelho e adicionado 40µL do reagente “Stop & Glo” (Promega) para a leitura da luciferase de *Renilla* em cada poço. A atividade relativa da luciferase de cada repórter transfectado era determinada e normalizada pela razão do valor da leitura luciferase do vagalume sobre o valor da leitura da luciferase da *Renilla* (dada pelo plasmidio pRL-TK) ou pela quantidade de proteína por µg/µL de extrato celular obtido para cada amostra através de ensaios de Bradford usando o *Bio-Rad protein assay reagent*.

#### 4.14. Análises estatísticas

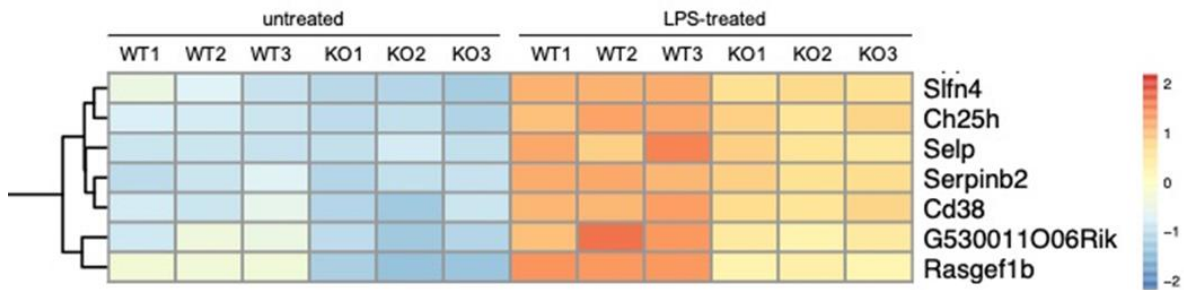
Os dados foram expressos com média ± desvio padrão. Os experimentos de RT-qPCR foram realizadas com triplicata biológica. Para os ensaios de gene repórter foram realizadas duplicatas ou triplicatas técnicas. Cada vial de células descongeladas era considerada uma replica biológica e as quantidades de experimentos independentes variaram entre 1 à 5. As comparações entre dois grupos foram feitas usando o teste T de Student. Resultados com significância estatística foi determinada como \* p <0,05, \*\* p <0,01 e p <0,001. Todas as análises estatísticas e plotagem gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPrism 7.0.

## 5. RESULTADOS

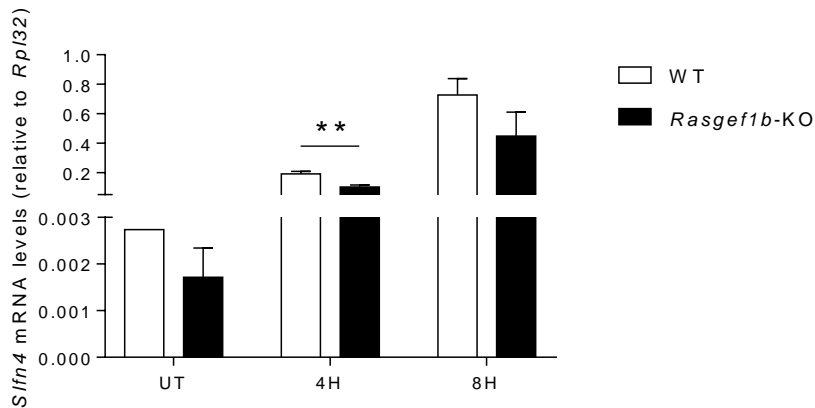
### 5.1. Expressão de *Slfn4* e de outros genes do cluster em macrófagos desprovidos de RasGEF1b

Um cluster formado por um conjunto de sete genes cuja expressão encontra-se reduzida em macrófagos deficientes do fator RasGEF1b estimulados com LPS foi identificado em análises de transcriptoma (**Figura 2**) (FERNANDES *et al.*, 2023). Conforme descrito, as análises indicaram que o *Slfn4* foi o gene cuja expressão foi mais significativamente reduzida (2,12 vezes, FDR  $9.33 \times 10^{-25}$ ) em seguida ao *Rasgef1b* (FDR  $1.3 \times 10^{-84}$ ). Interessante, a expressão de *Slfn4* foi encontrada também reduzida significativamente em macrófagos RasGEF1b-KO não estimulados. Assim, ao examinar no trabalho desta tese os níveis do mRNA por RT-qPCR, nós verificamos que as diferenças de expressão de *Slfn4* (**Figura 3**) e de outros genes do cluster no intervalo de até 4 horas após a estimulação com LPS (**Figura 4A-D**) apresentam uma tendência similar aos dados do sequenciamento de mRNA. Nós examinamos também os níveis de mRNA em resposta à estimulação com LPS em 18 horas. Os resultados (**Figura 5A-D**) mostram que os níveis de mRNA de todos os genes avaliados foram elevados nos macrófagos derivados dos dois genótipos após a estimulação. Porém, os níveis do mRNA dos genes avaliados encontram-se reduzidos nos macrófagos RasGEF1b-KO tratados ou não com LPS (**Figura 4 e 5A-D**).

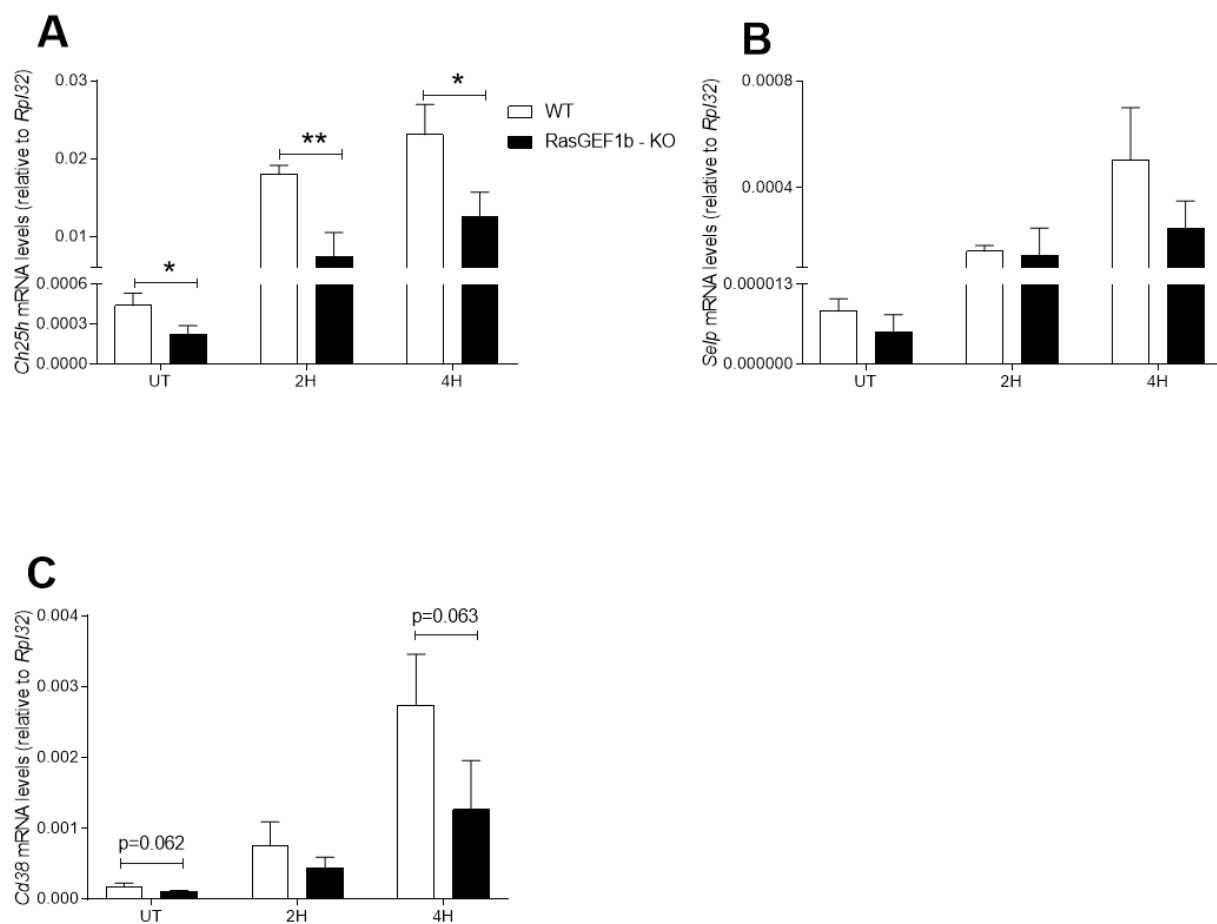




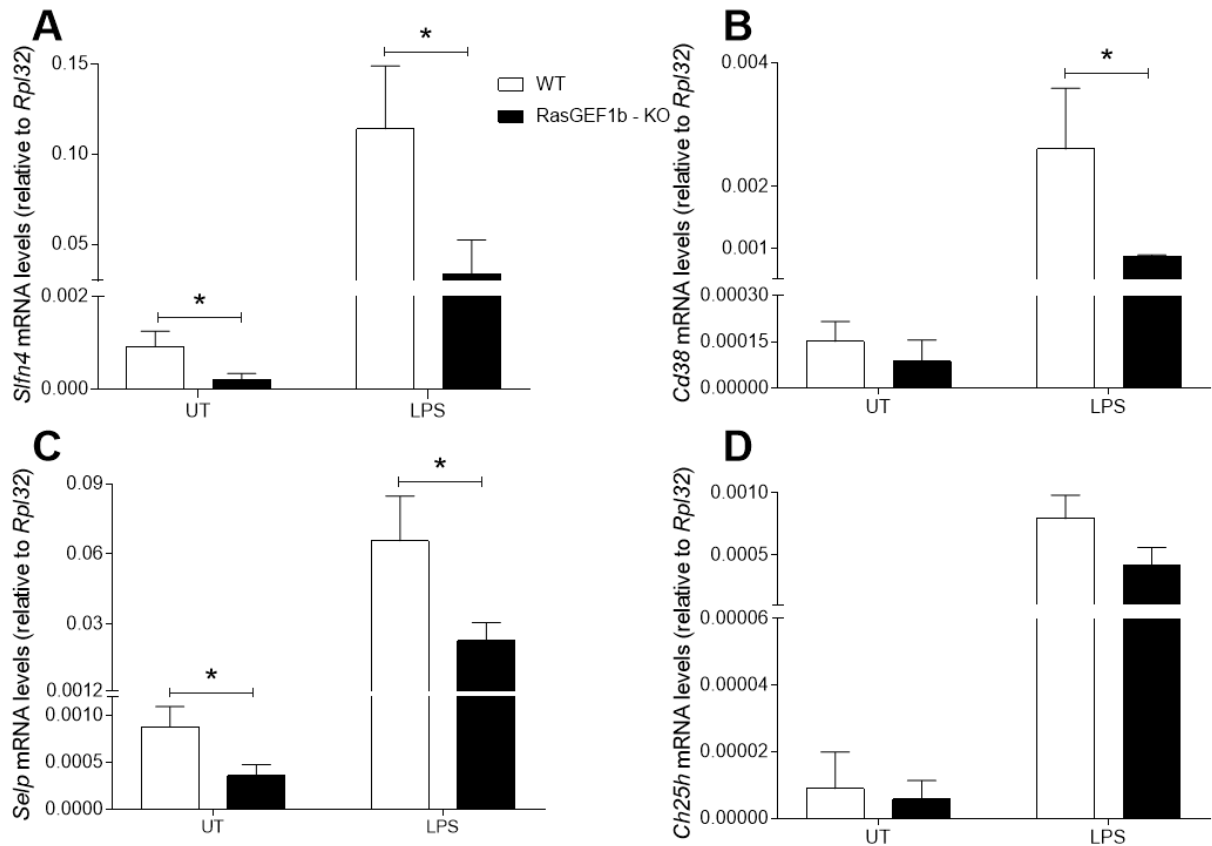
**Figura 2:** Cluster dos genes de expressão reduzida em BMDMs de camundongos WT e RasGEF1b-KO não estimulados (untreated) ou estimulados com LPS por 4h (LPS-treated), apontados pelo RNA-seq. Foi utilizado 100ng/mL de LPS. n = 3. (Figura adaptada de FERNANDES et al., 2023)



**Figura 3:** Análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR de *Slfn4* em BMDM's comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em 4 e 8 horas. As células foram estimuladas com 100ng/mL ou não (UT-untreated). Normalizado pelo *Rpl32*. Barras representam média e +/- desvio padrão. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, determinado pelo teste t-student não pareado. n = 3 replicatas biológicas.

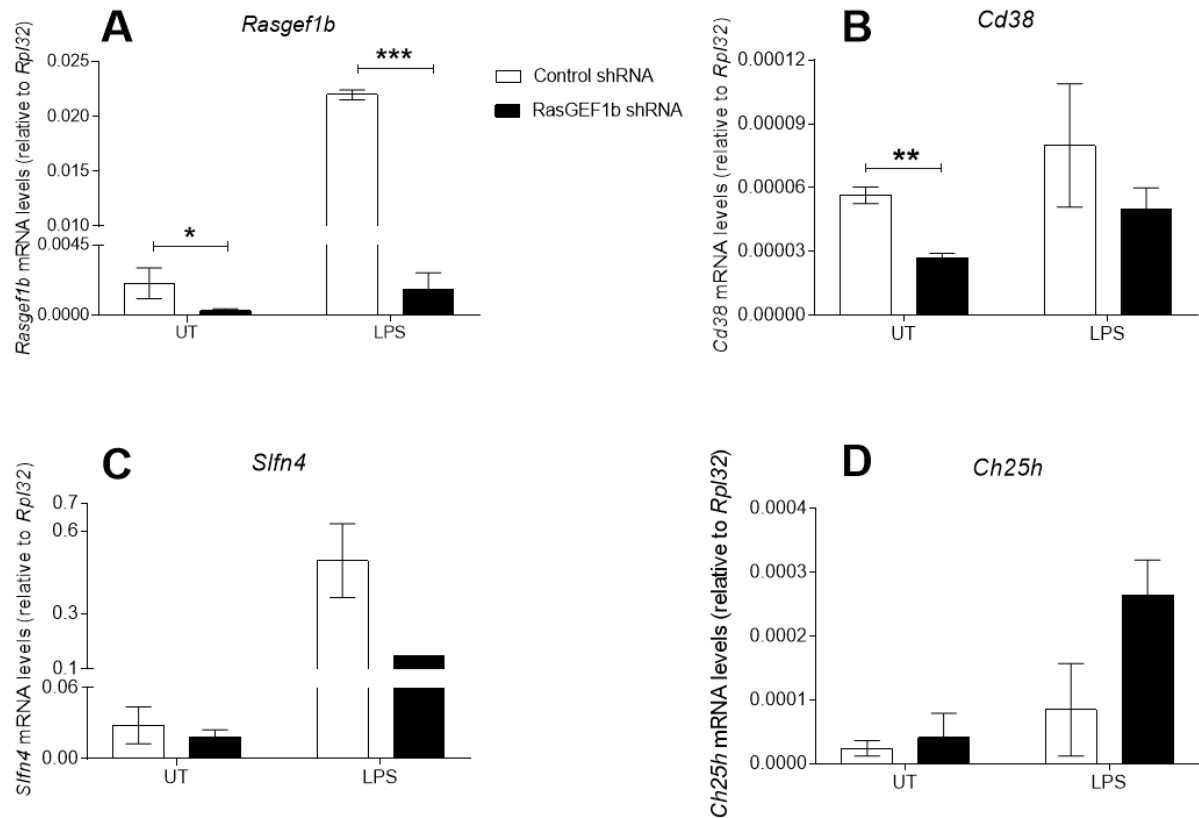


**Figura 4:** Análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR de (A) *Ch25h*, (B) *Selp*, (C) *Cd38* em BMDM's comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em 2 e 4 horas. As células foram estimuladas com 100ng/mL ou não (UT-untreated). Normalizado pelo *Rpl32*. Barras representam media e +/- desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , determinado pelo teste t-student não pareado.  $n = 3$  replicatas biológicas.



**Figura 5: Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A) *Slfn4*, (B) *Cd38*, (C) *Selp* e (D) *Ch25h* comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) tratados com LPS em horas 18 horas. As células foram estimuladas com 100ng/mL ou não (UT-untreated). Normalizado pelo *Rpl32*. Barras representam média e +/- desvio padrão. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, determinado pelo teste t-student não pareado. n = 3 replicatas biológicas.**

O papel de RasGEF1b foi também avaliado em macrófagos RAW264.7 silenciados pela tecnologia de shRNA. Examinamos os níveis de expressão de dois genes do cluster, além de *Slfn4* e *RasGEF1b*, em macrófagos estimulados com LPS por 4 horas. Os resultados mostraram que os níveis de expressão de *Rasgef1b* confirmam o silenciamento do gene. Os demais genes, incluindo *Slfn4* e *Cd38*, apresentaram um perfil comparável ao encontrado em BMDMs, sendo que os níveis de expressão foram menores nos macrófagos não tratados e estimulados com LPS, exceto para *Ch25h* (Figura 6).



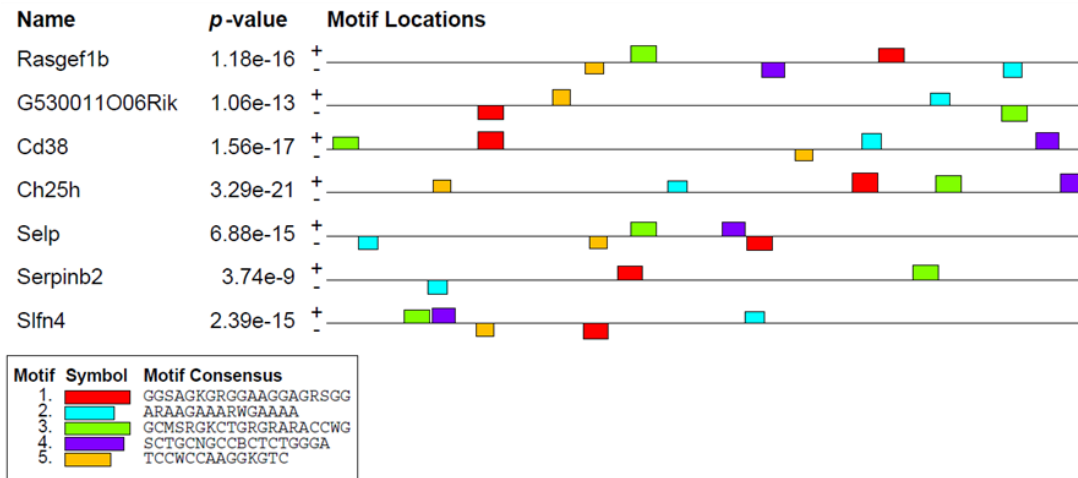
**Figura 6:** Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A) *Rasgef1b* (B) *Cd38*, (C) *Slfn4* e (D) *Ch25h* comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (sh-*RasGEF1b*) e selvagem (sh-*Control*) tratados com LPS em horas 4 horas. As células foram estimuladas com 100ng/mL ou não (UT-untreated). Normalizado pelo *Rpl32*. Barras representam media e +/- desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , determinado pelo teste t-student não pareado.  $n = 3$  replicatas biológicas.

## 5.2. Análise in-silico dos genes do cluster e estímulos com IFN-tipo I e II

Dado o perfil de expressão similar de *Slfn4* com os demais genes do cluster analisados nos macrófagos *RasGEF1b*-KO não tratados ou estimulados com LPS, nós hipotetizamos que suas regiões promotoras abrigam elementos regulatórios para fatores de transcrição específicos em comum. As análises in silico revelaram cinco motivos únicos de ligação para fatores de transcrição específicos com scores significativos ( $p$  value  $< 0.005$ ) (**Figura 7A**). O programa TOMTOM identificou uma lista de fatores de transcrição com alta probabilidade de se ligar a esses motivos, entre eles: IRF-1, IRF-2, IRF-7, IRF-9, STAT-3, STAT-1::STAT-2, SPIB e GATA-1 (**Figura 7B**). Uma busca adicional foi realizada usando o programa PSCAN para -1000pb a montante das sequências codificadoras e com o banco de dados TRANSFAC selecionado. Foram encontrados [Digite aqui]

57 sítios de ligação em comum com  $p < 0.1$ , entre eles podemos destacar OCT-1, NFKAPPAB65, CEBP, STAT5A, POU3F2, GATA2, STAT1, ATF, CREL, GATA1, CEBPB, CREB, AP1 (**Tabela 3**). Enquanto os fatores GATA-1 e SPIB – pertencente a família de fatores ETS, e ATF indicados pelos programas TOMTOM e PSCAN medeiam a regulação inicial de genes durante o desenvolvimento hematopoiético e resposta basal a estímulos em macrófagos (GUPTA *et al.*, 2010; LABZIN *et al.*, 2015), o IRF-1 tem sido implicado na regulação da expressão de genes tanto em nível basal quanto induzida por interferons (IFNs) em macrófagos (LANGLAIS; BARREIRO; GROS, 2016). Portanto, nós decidimos conduzir um experimento em que BMDMs do tipo selvagem e RasGEF1b-KO foram tratados com IFN-beta (IFN do tipo I) ou IFN-gama (IFN do tipo II) em diferentes intervalos de tempo para examinar os níveis do mRNA de *Slfn4*, *Ch25h* e *Cd38*. Os resultados mostram que o IFN-beta induziu de modo significativo a expressão de *Slfn4* nos macrófagos do tipo selvagem e *knockout*. No entanto, os níveis do mRNA de *Slfn4* encontram-se reduzidos nos macrófagos *knockouts* tanto em estado estacionário quanto estimulado por IFN, porém essa diferença não é suportada estatisticamente nos tempos mais tardios (**Figura 8A**). Entretanto, *Cd38* e *Ch25h* não foram induzidos mas continuaram sendo menos expressos quando comparados com o selvagem (**Figura 8B e C**). Em macrófagos estimulados com IFN-gama, nós observamos que a expressão de *Slfn4* encontra-se significativamente reduzida nas células *knockouts* em níveis comparáveis àqueles das células não tratadas (**Figura 9A**). Adicionalmente, a expressão de *Ch25h* e *Cd38* apesar de as diferenças entre os genótipos não serem significantes estatisticamente, os camundongos *knockouts* permaneceram com uma baixa expressão sendo que em 24 horas essas diferenças aumentam (**Figura 9B e C**). Esses resultados prontamente sugerem que RasGEF1b contribui para manter a ativação transcricional basal de *Slfn4* em macrófagos e tornar possível a elevação em níveis máximos nas células ativadas por agentes inflamatórios.

A



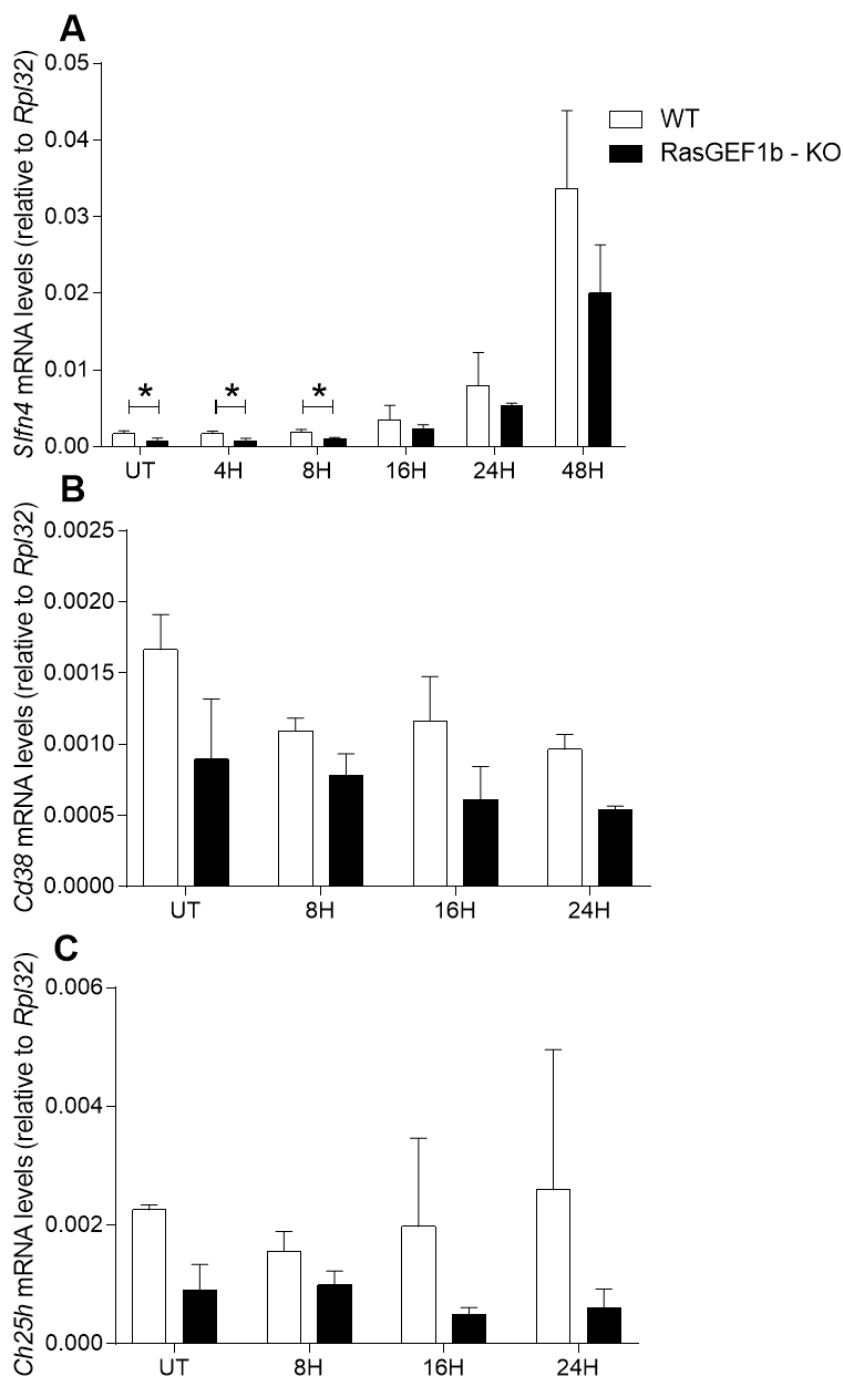
B

Database	ID	Alt. ID	Preview	Matches	List
query_motifs	1	GGSAGKGRGGAAGGAGRSGG		18	MA1262.1 (ERF7), MA1272.1 (ERF9), MA1246.1 (LBP), MA0472.1 (ERF5), MA1279.1 (ERF104), MA0273.1 (RREB1), MA0516.1 (SE2), MA1228.1 (AT4G18450), MA1381.1 (AT3G46070), MA1233.1 (AT1G71450), MA0083.1 (Su(H)), MA0992.1 (ERF4)
query_motifs	2	ARAAGAAARWGAAAA		42	MA1268.1 (AT1G69570), MA0527.1 (blnc-1), MA1277.1 (Adef1), MA1274.1 (QBP2), MA1281.1 (AT5G02460), MA1278.1 (COG1), MA1272.1 (AT3G38810), MA1267.1 (AT5G66940), MA1278.1 (QBP1), MA0277.1 (AZF1), MA1270.1 (AT3G45610), MA0050.2 (RF1)
query_motifs	3	GCMSRGKCTGRGRARACCCWG		2	MA0056.1 (MZE1), MA0057.1 (MZE1(unc2))
query_motifs	4	SCTGCNGCCBCTCTGGGA		9	MA0355.1 (BHD1), MA0362.1 (BDS2), MA0144.2 (STAT2), MA0992.1 (ERF4), MA0456.1 (qa), MA0332.1 (MET29), MA0499.1 (Mvd1), MA1225.1 (ERF5), MA1006.1 (ERF6)
query_motifs	5	TCCWCCAAGGKGTCT		8	MA0456.1 (qa), MA0192.1 (schJan1), MA0116.1 (Znf423), MA0059.1 (MAX:MYC), MA0009.2 (T), MA0342.1 (MSB4), MA0266.1 (RGM1), MA0159.1 (BARA:RXRA)

**Figura 7: Identificação de motivos de ligação para fatores de transcrição para os genes do cluster de indicados pelo RNA-seq.** Esquema comparando as regiões +500pb e -100pb dos genes *Rasgef1b*, *Ch25h*, *Selp*, *Serpinb2*, *Cd38*, *Slfn4* e *G530011O06RIK* identificando a localização dos sítios de ligação para fatores de transcrição usando o MEME (A) e quais fatores para os sítios de ligação usando o TOMTOM (B).

**Tabela 3:** Lista de fatores de transcrição com maior probabilidade de ligação no DNA dos genes do cluster. A região de -1000pb a montante da região codificadora foi analisada pelo programa PSCAN e selecionado fatores de transcrição com p-value < 0.1 relacionados a regulação imune e basal. Foi selecionado o banco de dados TRANSFAC e o matrix ID representa o código de identificação.

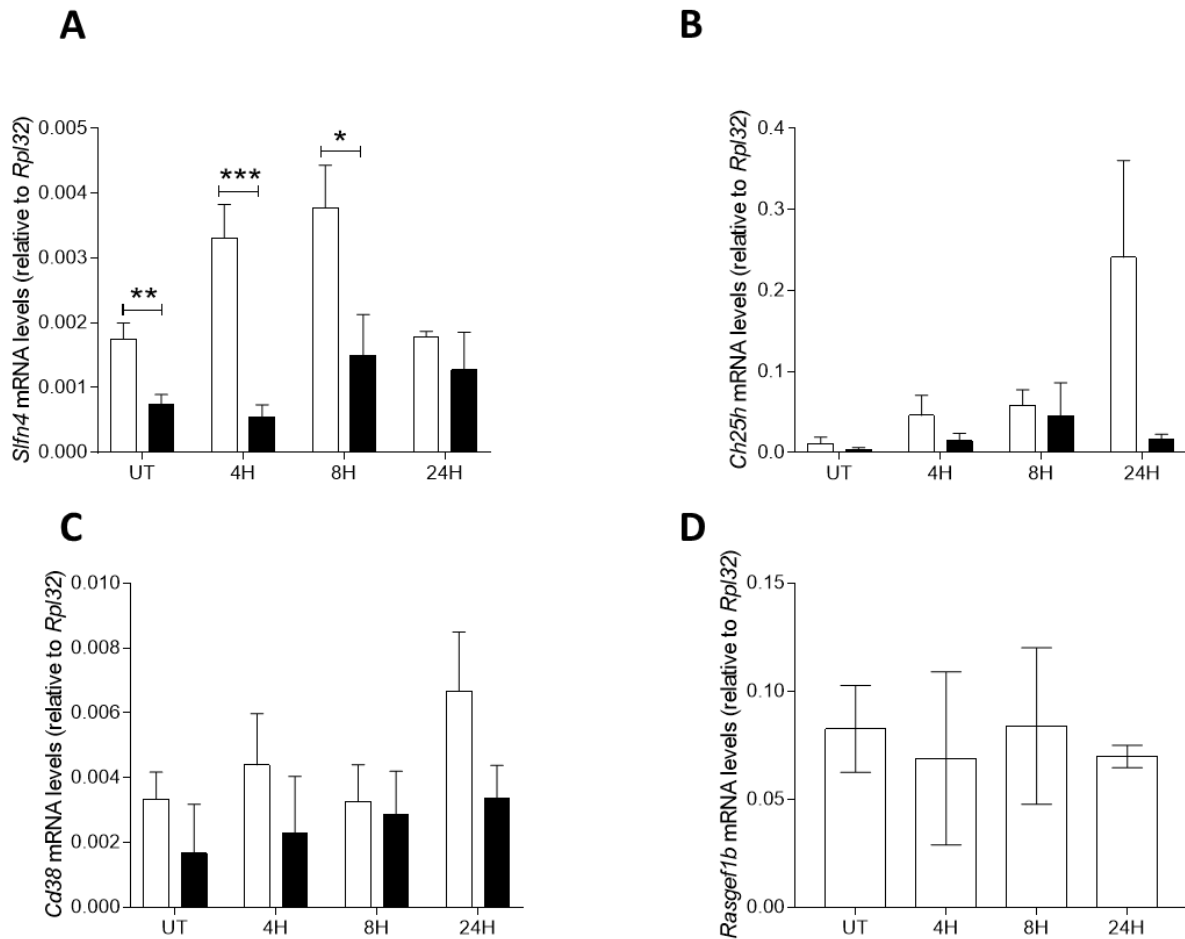
Transcription factor	Matrix ID	Z-score	P-value	Standard deviation
OCT1	M00135	277342	0,002773	0,0206656
OCT1	M00161	226208	0,011835	0,0514213
OC	M00210	222188	0,013131	0,0657597
NFKAPPAB65	M00052	222191	0,013137	0,0469399
ATF	M00017	170076	0,044471	0,0538859
GATA2	M00348	169165	0,045345	0,0366429
NFKAPPAB	M00054	167634	0,046815	0,050391
CREL	M00053	162002	0,052585	0,0502637
GATA1	M00347	160832	0,053873	0,0290258
CEBPB	M00117	156193	0,05913	0,0331093
CREB	M00178	153284	0,062628	0,0551323
OCT1	M00195	152867	0,063144	0,0496903
GATA3	M00350	15229	0,063865	0,0521092
CEBP	M00190	149375	0,067592	0,0390259
STAT4	M00498	149321	0,067668	0,0195363
AP	M00199	14865	0,068558	0,0401163
CREB	M00177	148194	0,069148	0,049915
GATA1	M00346	139857	0,080939	0,058522
STAT5A	M00499	210313	0,017723	0,00671815



**Figura 8: Análise de expressão de BMDMs estimulados com interferon beta.** Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A)*Slfn4*, (B)*Cd38* e (C)*Ch25h* em BMDM's de camundongos selvagens (WT) e deficientes de *Rasgef1b* (*Rasgef1b*-KO) estimulados com IFN-beta em diferentes intervalos de tempos. Barras representam média e +/- desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  determinado pelo teste T de Student não pareado.  $n = 3$  réplicas biológicas.

[Digite aqui]



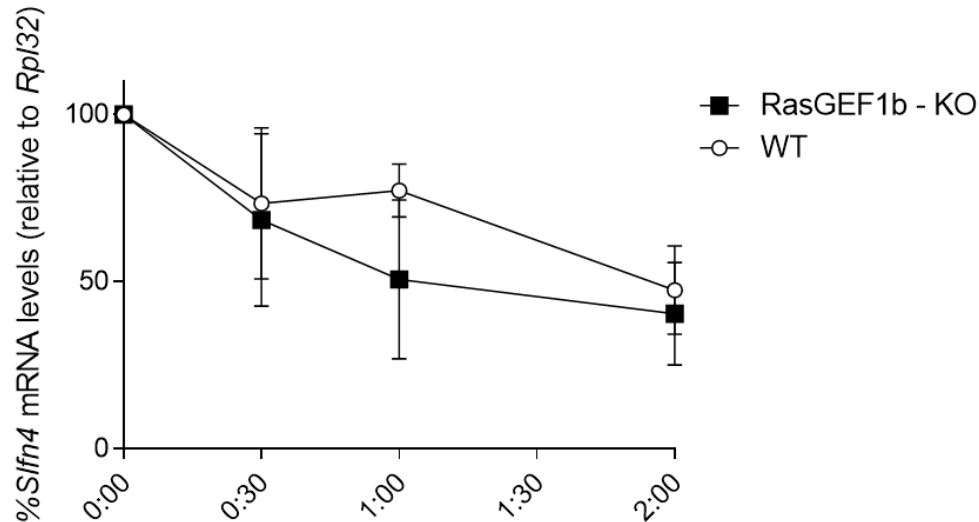


**Figura 9: BMDMs estimulados com interferon-gama.** Análise da expressão de mRNA por RT-qPCR de (A)*Sfn4*, (B)*Ch25h*, (C)*Cd38* e (D)*Rasgef1b* em BMDM's de camundongos selvagens (WT) e deficientes de *Rasgef1b* (*Rasgef1b*-KO) estimulados com IFN-gama (10ng/mL) ou não (UT) em diferentes intervalos de tempos. Barras representam media e +/- desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  determinado pelo teste T de Student não pareado.  $n = 3$  réplicas biológicas.

Um dos caminhos para a regulação dos níveis de mRNA de um gene pode ser relacionada com a estabilidade do RNA. A inibição da síntese de RNA pela ligação da actinomicina D no DNA pode ser usada nesses casos, uma vez que as moléculas de RNA existentes nas células não são substituídas por novas recém sintetizadas. Portanto, realizamos um experimento em BMDMs knockout para RasGEF1b e selvagens pré-estimulados com LPS por 4 horas e em seguida tratamos com actinomicina D. Nossos resultados mostram que não há diferenças estatísticas entre os dois genótipos ao longo do tempo de 2 horas, excluindo a possibilidade de RasGEF1b estar envolvido

[Digite aqui]

nesta via (**Figura 10**). Sendo assim, a outra possibilidade de estudar a regulação do *Slfn4* é a busca por fatores de transcrição na região promotora que possibilitam a transcrição do gene.



**Figura 10:** Análise de expressão de mRNA por RT-qPCR de *Slfn4* em diversos tempos em BMDMs de camundongos WT e deficientes de *RasGEF1b* estimulados com LPS e tratados com actinomicina D. As células foram estimuladas com 100ng/mL de LPS. Normalizados pelo *Rpl32*. Os resultados são apresentados em porcentagem versus o tempo em horas:minutos. Barras representam média e +/- desvio padrão. N = 3 réplicas biológicas.

### 5.3. Análise In-Silico de *Slfn4*

Regiões da cromatina acessível e modificações pos-traducionais de nucleossomos como metilação e acetilação de histonas são utilizadas para predizer regiões regulatórias transcricionais, como os promotores e enhancers (KIM; SHIEKHATTAR, 2015; THURMAN *et al.*, 2012). Através do banco de dados ENCODE identificamos marcadores epigenéticos de regiões transcricionalmente ativas como H3K4me3 e H3K9ac, e a ocupação constitutiva da RNA polimerase II para BMDMs, e uma variedade de células envolvidas no sistema imune como linfócitos B e Treg (**Figura 11A**). Também foram realizadas análises de ChiP-seqs para fatores regulatórios usando a ferramenta ReMap Atlas do Genome Browser. O ReMap Atlas integra os bancos de dados do GEO, ArrayExpress e ENCODE, para uma variedade de células e tratamentos, entre elas os BMDMs. Usando essa ferramenta é possível observar uma densidade de fatores de transcrição relacionados a resposta inflamatória como IRF, STAT, CEBP e JUN, dentro das regiões

transicionalmente ativas com H3K4me3, H3K4me1 e H3K27a (**Figura 11B**). Essa região de 1764pb (-1670pb à +94pb) foi selecionada como uma região promotora putativa do *Sfn4*.



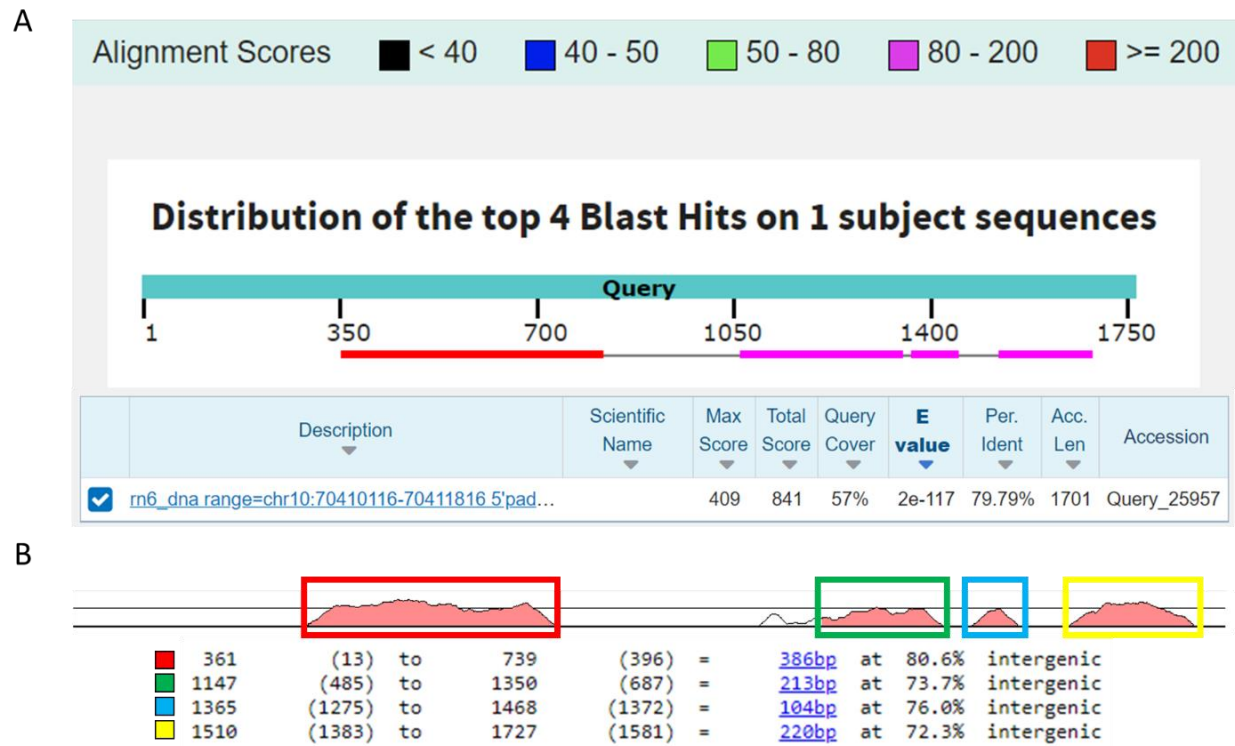
**Figura 11: Identificação de regiões da cromatina acessíveis e os fatores de transcrição ligadas identificadas por ChIP-seq para *Sfn4*.** As Faixas de ChIP-seq (A) antiH3K4m1, H3K4m3 e H3K27a e

[Digite aqui]

RNA polimerase II publicamente disponíveis provenientes do banco de dados ENCODE/LICR; e ReMAP (B) para fatores de transcrição comumente associados a resposta imune são mostradas para BMDM's ao longo da região 5' não traduzida de *Slfn4* utilizando-se o navegador de genomas UCSC. Os trechos escuros mostram a região enriquecida para cada um dos marcadores investigados.

Para encontrar sítios conservados de ligação para fatores de transcrição, realizamos uma análise de Blastn usando a região promotora putativa de -1670pb e +94pb (1764pb) do *Slfn4* (Número de acesso: NC\_000077.5). Ao comparar o alinhamento da sequência de *Slfn4* com as demais, apenas o *Slfn4* de *Ratus norvegicus* apresentou identidade significativas de 83.18% (**Figura 12A e 13**). O alinhamento da sequência de 1764pb de rato e camundongo com mVISTA (**Figura 12B**) reforçou um padrão de regiões conservadas encontradas no Blastn. Posteriormente, foram encontrados 80 sítios conservados entre as duas espécies usando o rVISTA com scores acima de 90%. Entre os sítios para os fatores de transcrição conhecidos para macrófagos ativados e não ativados identificados, foram o STAT, IRF, SP, ISRE, NFkappaB e AP-1 com scores de 95%, 90%, 100%, 90%, 95% e 100%, respectivamente (**Tabela 3**). A busca por elementos regulatórios na região promotora 1764pb de *Slfn4* em camundongo usando TFbind, TOMTOM e CIS-BP, identificou fatores como: C/EBP (-1514/-1500, -1321/-1307, -1122/-1108, -333/-320), NF-KappaB (-1381/-1371), SP-1 (-1312/-1302, -1097/-1087, -282/-272), STAT-3 (-413/-395), STAT-1 (-299/-291), IRF-1/2 (-238/-223), ISRE (-236/-221), IRF-1/7 (-166/-151) e AP-1 (-72/-61, -44/-33) (**Figura 14**).

Alem da busca de motivos de ligação para fatores de transcrição ao longo da sequencia de 1764pb de *Slfn4*, também foi encontrada regiões de repetições GT identificadas como microssatélites usando o GenomeBrowser (**Figura 11A**). As repetições GT em camundongos está localizado -937pb à -546pb com o tamanho de 394pb na região promotora. Esse microssatélite também é encontrado em ratos com o tamanho de 74 pb, localizado a -1120pb à -1194pb. A conservação das sequencias repetitivas é encontrada dentro das duas regiões conservadas indicadas pelo alinhamento do Blastn (**Figura 13**).



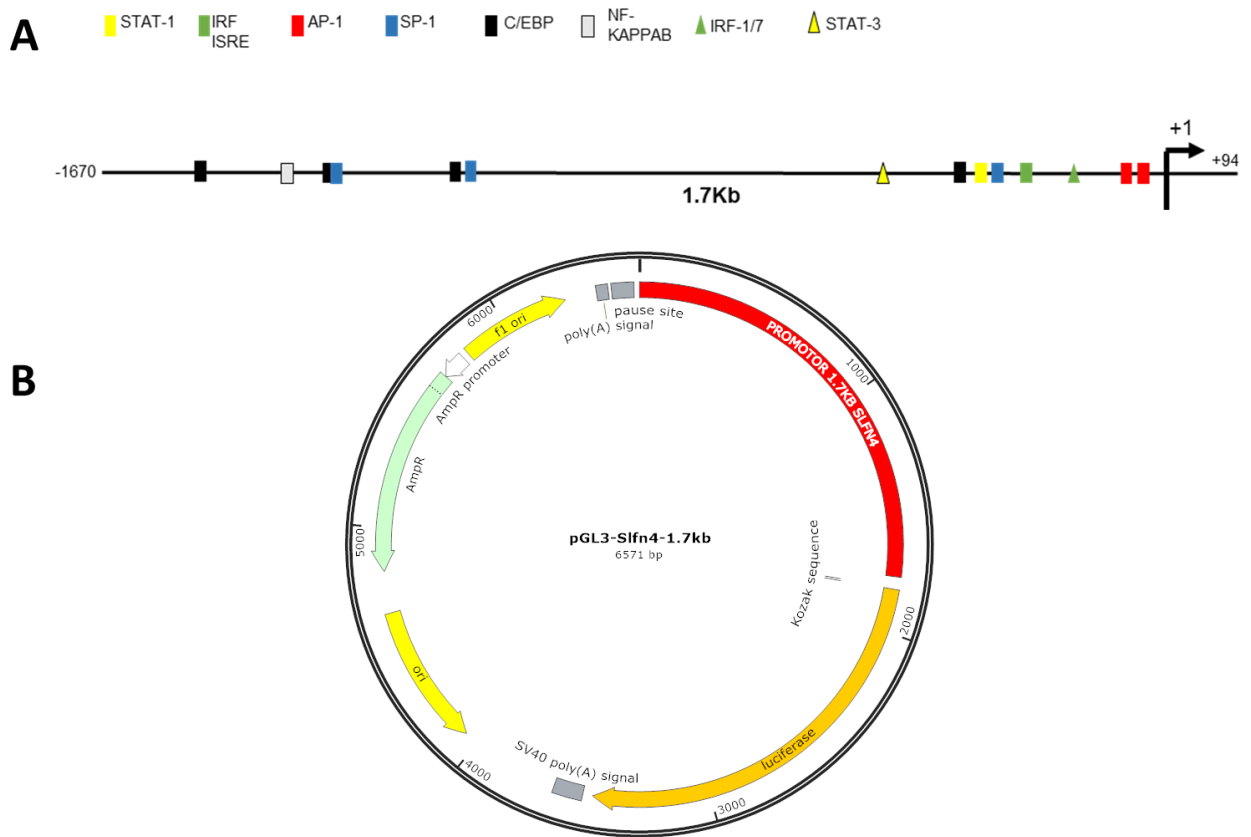
**Figura 12:** Alinhamento da sequência de 1764pb do *Mus musculus* com *Ratus norvegicus* usando o (A) Blastn (discontiguous megablast) e o (B) mVISTA.



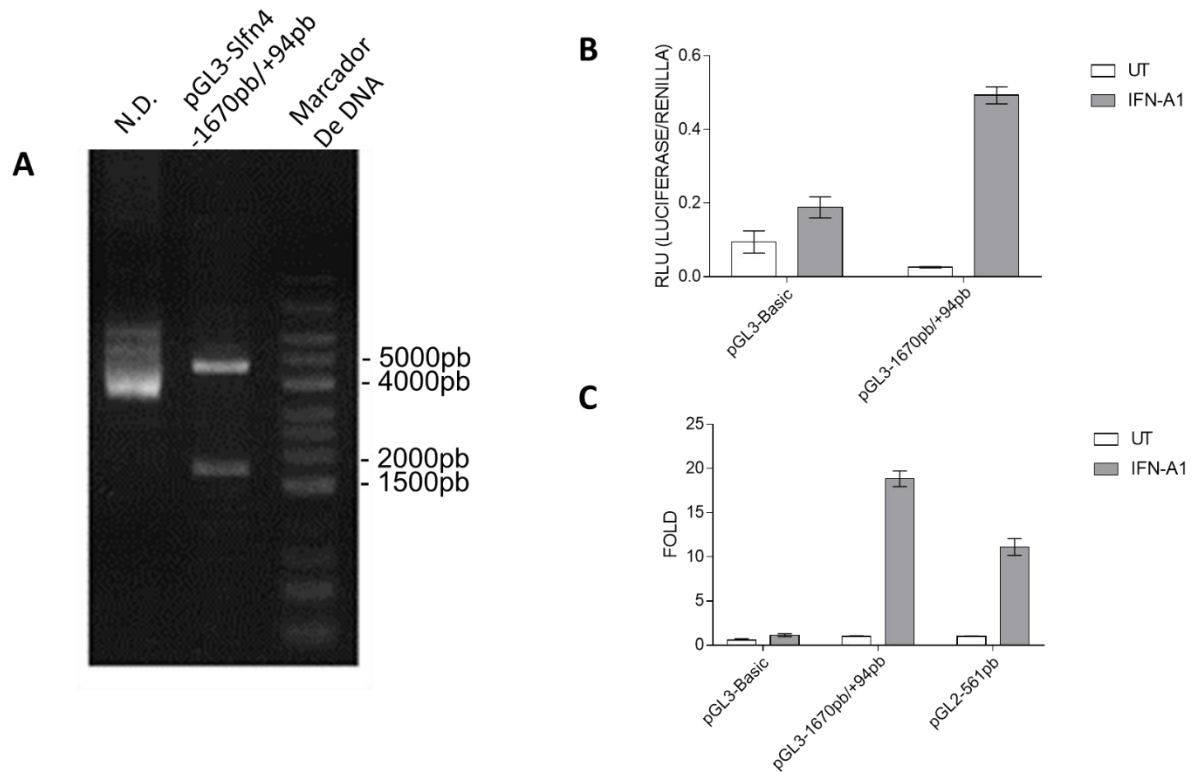


O segmento de DNA compreendendo (-1670pb a +94pb) de *Slfn4* (**Figura 15A**) foi clonada no plasmídeo pGL3-basic (**Figura 15B**) e confirmada pela digestão de XhoI e SacI, linearizando o plasmídeo e liberando o inserto de 1764pb (**Figura 16A**). A atividade dessa região foi analisada através de transfecção transiente e ensaio de gene repórter em células HEK293 estimulados com IFN-A1. A construção pGL3-1670pb/+94pb apresentou uma atividade 20 vezes maior quando comparadas com as não tratadas (**Figura 16B-C**). Entretanto, uma caracterização dos efeitos de RasGEF1b sobre a atividade transcricional dessa região ainda é necessária.





**Figura 15:** (A) O segmento de 1764pb (-1670pb/+94pb) da região não-codificadora de *Slfn4* foi clonado entre os sítios de *MluI* e *XhoI* do (B) plasmídeo pGL3-basic. No esquema está indicada a posição dos principais sítios de ligação para fatores de transcrição associados a resposta imune identificados in silico em relação a TSS (seta; +1).



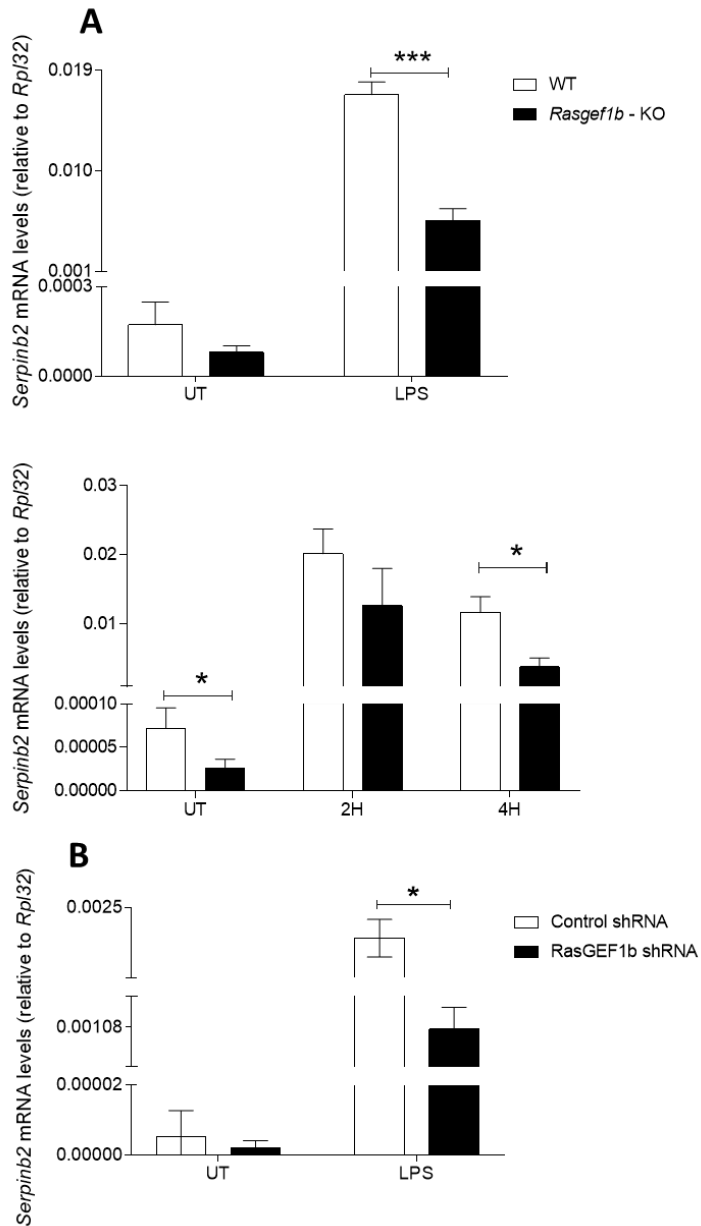
**Figura 16: Análise da região de 1764pb de *Slfn4* em células HEK293 tratadas com IFN-A1.** (A) Confirmação do tamanho do plasmídeo pGL3-basic (4818pb) contendo a região promotora 1764pb de *Slfn4* através da digestão de *XhoI* e *SacI*. A amostra foi fracionada em gel de agarose 0.9% contendo brometo de etídio para diagnóstico. Marcador de DNA: 1kb DNA ladder plus (Invitrogen). N.D. = Não digerido. (B) e (C) Células HEK293 foram cotransfectadas com pGL3-basic, pGL3-*Slfn4* (-1670pb/+94pb) e pGL2-561 juntamente com pRL-TK durante 24 horas. Em seguida as células foram estimuladas com IFN-A1 (1000U/mL) ou não (UT) por 18 horas. O plasmídeo pGL2-561 contendo a região promotora do gene *Ifit1* (-134pb/+1pb) foi usado como controle positivo para o estímulo de IFN-A1. Os lisados foram coletados e a atividade de luciferase medida em luminômetro. Os resultados são representados pela atividade relativa de luciferase do vagalume (B) e o fold comparando com as células não tratadas para os seus respectivos plasmídeos (C) normalizado pela atividade da luciferase da *Renilla* (pRL-TK), e o número de vezes comparados com o não tratado de cada plasmídeo.

#### 5.4. Ativação transcrional de *Serpinb2* em macrófagos desprovidos de RasGEF1b

Em seguida ao *Slfn4*, a expressão de *Serpinb2* foi identificada com alta significância estatística (FDR  $6,4 \times 10^{-9}$ ) dentre os genes diferencialmente expressos e de função conhecida no transcriptoma de macrófagos RasGEF1b-KO tratados com LPS (FERNANDES *et al.*, 2023). Nossos resultados de RT-qPCR confirmam a expressão reduzida de *Serpinb2* em BMDMs e células

[Digite aqui]

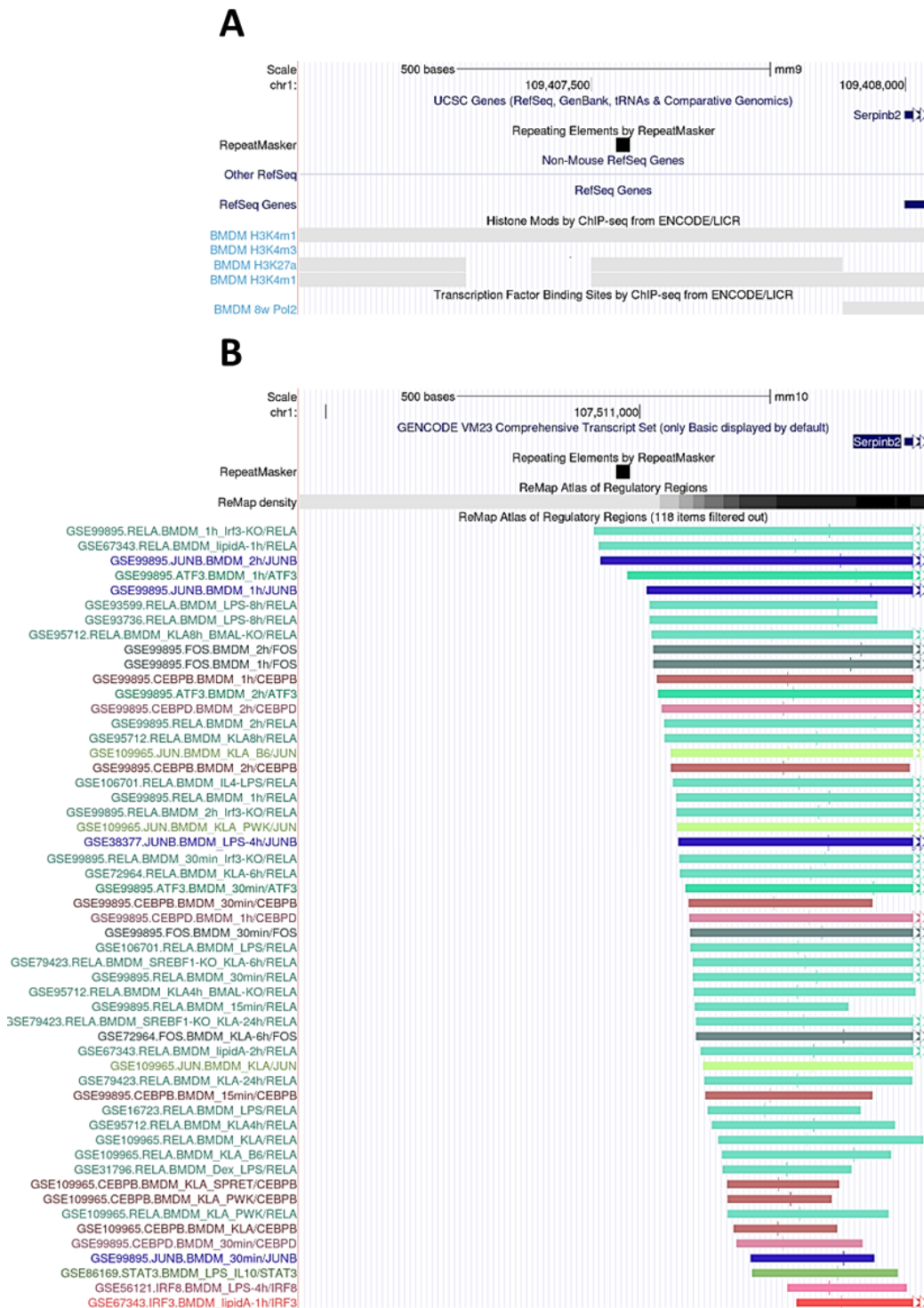
RAW264.7 com RasGEF1b *knockout* ou silenciados respectivamente nos estados não ativados e ativados por LPS (**Figura 17**).



**Figura 17: Expressão de *Serpinb2* em macrófagos estimulados com LPS.** (A) Análise dos níveis de mRNA por RT-qPCR de *Serpinb2* em BMDM's comparando os grupos desprovidos de *Rasgef1b* (RasGEF1b-KO) e selvagem (WT) em 4, 8 e 18 horas de estímulo com LPS. (B) Células RAW264.7 com shRNA controle e shRNA RasGEF1b em horas 4 horas tratados com LPS ou não (UT). Foi usado 100ng/mL de LPS em todas as células tratadas. Os dados foram normalizados pelo *Rpl32*. Barras representam média e +/- desvio padrão. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, determinado pelo teste t-student não pareado. n = 3 replicatas biológicas.

[Digite aqui]

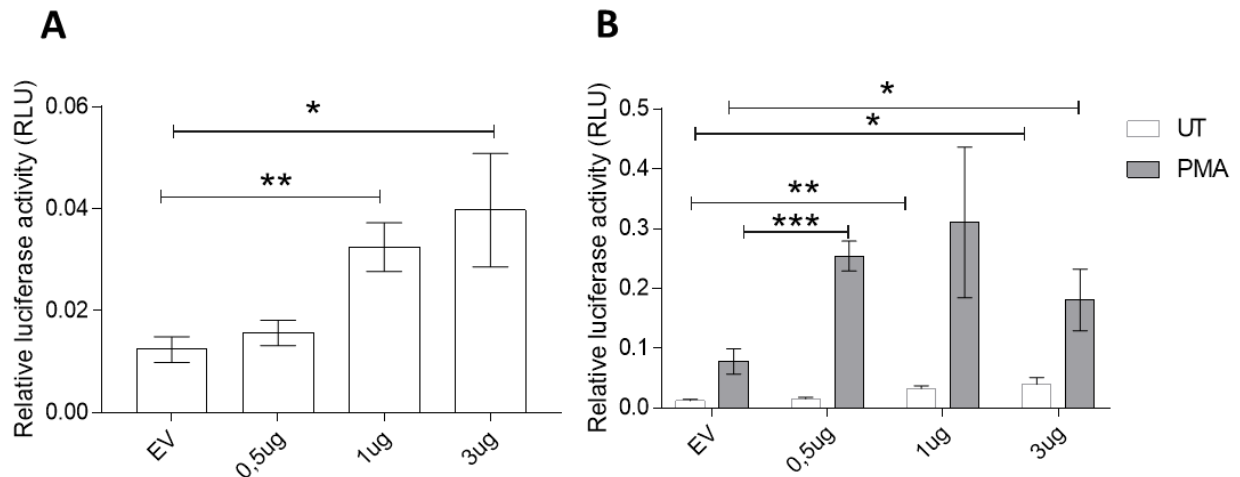
Para avaliar, portanto, a capacidade do RasGEF1b em ativar a região promotora de *SerpinB2*, nós buscamos identificar a região da cromatina acessível de BMDMs através dos marcadores H3K4m1, H3K4m3 e H3K27a, posteriormente usando a ferramenta ReMAP também disponível no Genome Browser identificamos os principais fatores de transcrição relacionados a resposta inflamatória em experimentos de ChiPSeq, como STAT, IRF, C/EBP, RELA, ATF e as subunidades do complexo AP-1, FOS, JUN e JUNB (**Figura 18**).



**Figura 18: Identificação de regiões da cromatina acessíveis e os fatores de transcrição ligadas identificadas por ChIP-seq para *Serpinb2*.** Faixas de ChIP-seq (A) antiH3K4m1, H3K4m3 e H3K27a e RNA polimerase II publicamente disponíveis provenientes do banco de dados ENCODE/LICR; e (B) ReMAP para fatores de transcrição comumente associados a resposta imune são mostradas para BMDM's ao longo da região 5' não traduzida de *Sfn4* utilizando-se o navegador de genomas UCSC. Os trechos escuros mostram a região enriquecida para cada um dos marcadores investigados.

[Digite aqui]

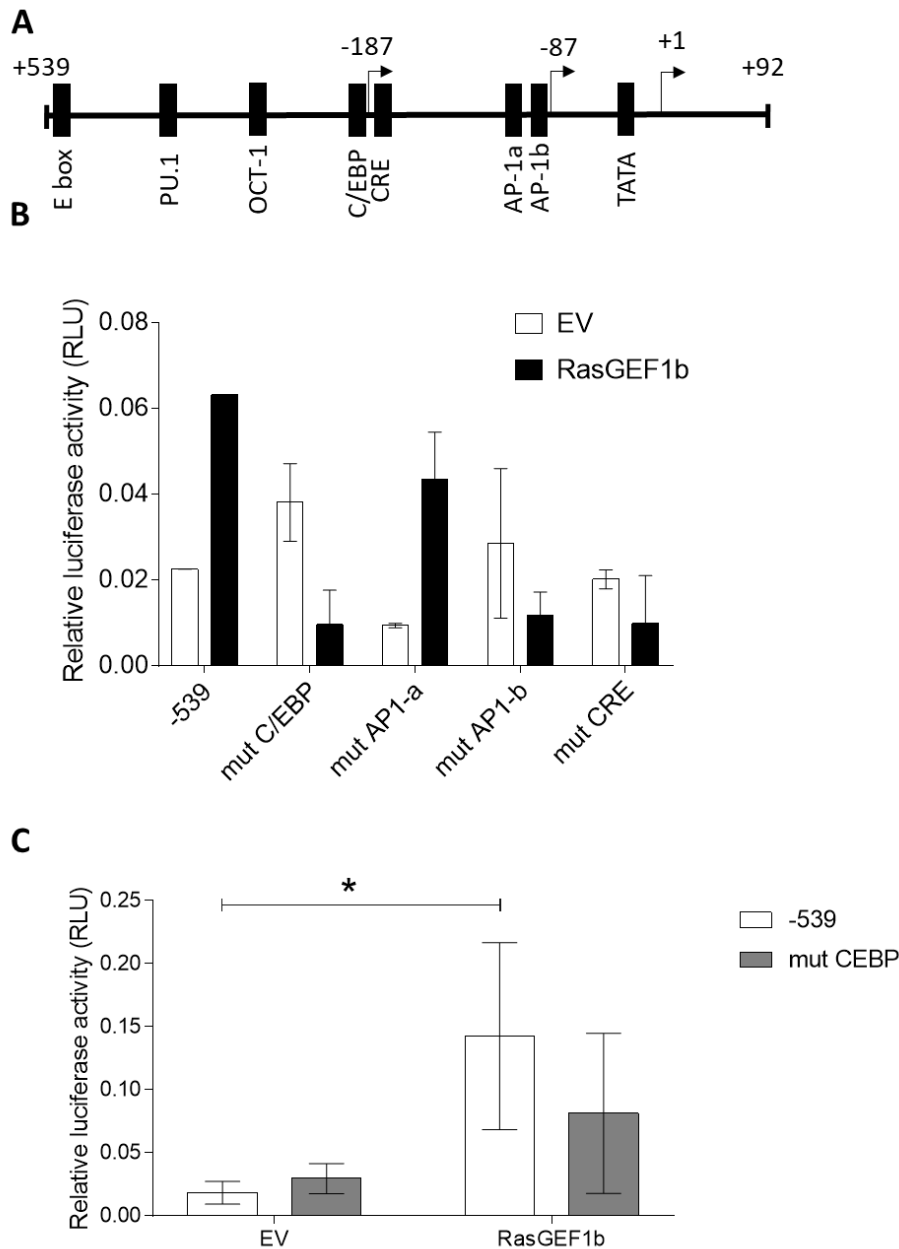
A região promotora de -539 de *Serpina2* já foi clonada e caracterizada (UDOFA *et al.*, 2013) contendo elementos regulatórios críticos para ativação transcricional de *Serpina2*. O plasmídeo pGLmP-539 foi transfectado em células HEK293 juntamente com quantidades crescentes de pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b. Os resultados demonstram que tanto a menor quanto a maior quantidade de pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b transfectadas foram suficientes para ativar a região promotora de *Serpina2* (**Figura 19A**). Em paralelo, estímulos com Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) que induz a atividade do região promotora de *Serpina2* foram realizados junto com as quantidades maiores de pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b. Os nossos resultados mostram um aumento da atividade da região promotora, entretanto em 3µg de pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b em conjunto com PMA há uma redução da atividade transcricional (**Figura 19B**).



**Figura 19: Ativação da região promotora de *Serpina2* em células HEK293 super expressando RasGef1b.** (A) Células HEK293 foram cotransfectadas com pGLmP-539pb, pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b nas concentrações de 0,5µg, 1µg ou 3µg, ou com o vetor vazio pFLAG-CMV4 (EV) para equiparação da quantidade de DNA transfectado durante 48 horas sem estímulos (UT) e com (B) PMA. Os resultados são apresentados como valores relativos da atividade de luciferase do vagalume normalizado pela atividade de luciferase por lisado de proteína. Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 4 experimentos (A) e 1 experimento (B) independentes. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  determinado por teste T de student não pareado.

A região promotora de *Serpina2* contendo as regiões mutadas nos sítios de ligações para os fatores de transcrição (**Figura 20A**) também foram avaliadas quanto ao efeito de RasGEF1b. As mutações nos sítios C/EBP, AP1-b e CRE apresentaram uma baixa atividade de luciferase quando comparada com o promotor sem mutações em 24 horas de transfecção (**Figura 20B**). Sabendo que [Digite aqui]

o promotor -539 é regulado por CEBP, avaliamos a atividade de luciferase em células HEK293 transfectadas com pGL3-539 ou com mut CEBP, juntamente com 3 $\mu$ g de pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b por 48 horas. Nossos resultados mostram que apesar de não ser significativo estatisticamente, o plasmídeo contendo a mutação no sitio de CEBP é ativado por RasGEF1b entretanto há uma é observado uma redução quando comparado com o -539 (**Figura 20C**).

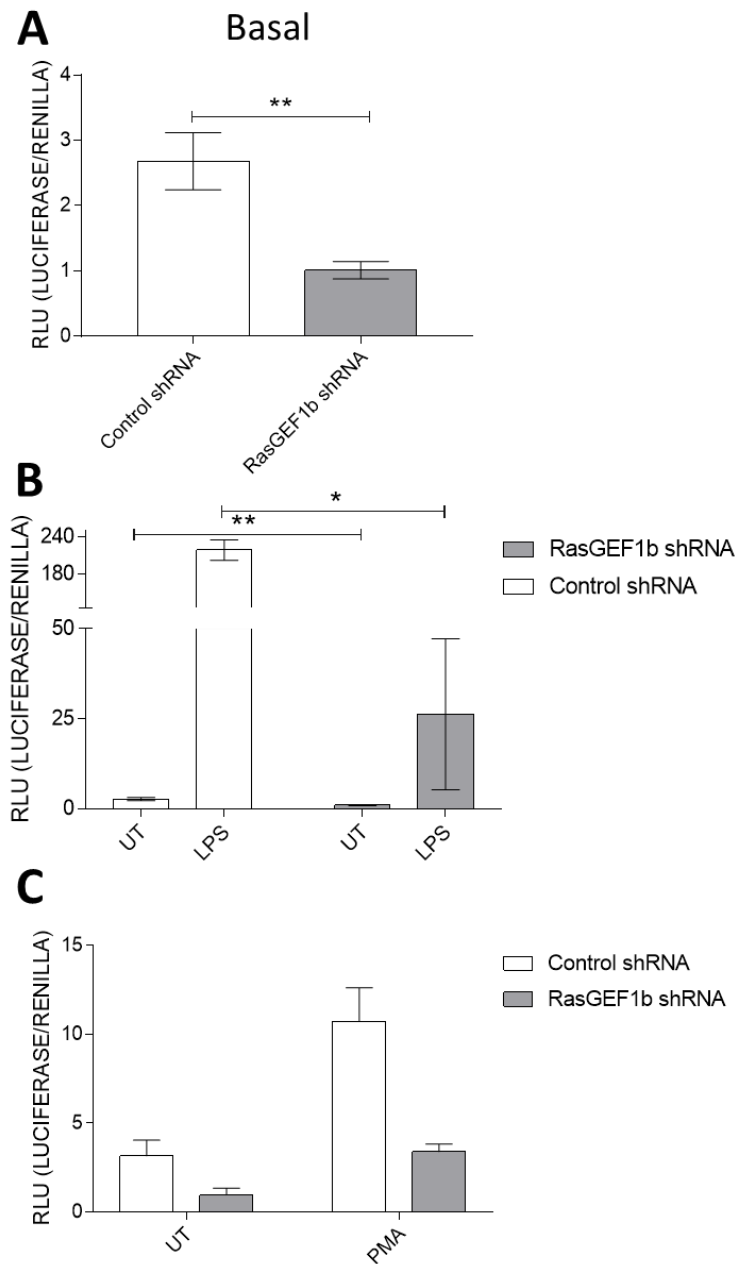


**Figura 20: Ativação da região promotora de *Serpinb2* com a mutação nos sítios de ligação para os fatores de transcrição em células HEK293 superexpressando RasGEF1b.** (A) Esquema da região promotora de -539 à +92 de *Serpinb2* contendo as regiões E-Box, PU.1, OCT-1, CEBP, AP-1a, AP-1b e CRE. (B) Células HEK293 foram transfectadas com pGL3-539pb ou com os mutantes CEBP, AP-1a, AP-1b e CRE, e cotransfectadas com pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b na concentração de 3 $\mu$ g ou com o vetor vazio pFLAG-CMV4 (EV) para equiparação da quantidade de DNA por 24 horas. (C) Células HEK293 foram cotransfectadas com pGL3-539pb ou com o mutante para CEBP, com pcDNA3.1-FLAG-RasGEF1b na concentração de 3 $\mu$ g ou com o vetor vazio pFLAG-CMV4 por 48 horas. Os resultados são apresentados como valores relativos da atividade de luciferase do vagalume normalizado pela atividade por  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína. Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 1 experimento com duplicata técnica (B) e 4 experimentos independentes com duplicata técnica. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  determinado por teste T de student não pareado.

[Digite aqui]



Para avaliar a atividade de *Serpinb2* em macrófagos e assim avaliar o controle de RasGEF1b em células silenciadas para o gene as células foram transfectadas com a construção repórter do promotor de -539 e estimuladas por 18 horas com LPS. Os resultados mostram o knock-down de RasGEF1b em macrófagos RAW264.7 resultou em uma atividade significativamente reduzida de luciferase tanto em células não tratadas como aquelas tratadas com LPS ou PMA, quando comparada com as células RAW264.7 shRNA controle (**Figura 21**).



**Figura 21: Ativação do promotor de *Serpinb2* em macrófagos silenciados pra RasGEF1b e tratadas com LPS e PMA.** Células Raw264.7 com shRNA controle e shRNA RasGEF1b cotransfectadas com pGL3-539 e pRL-TK durante 24 horas, e então (A) não tratadas ou (B) tratadas com 100ng/mL de LPS ou com (C) 100 $\mu$ M de PMA 18 horas ou não (UT). Os resultados são apresentados como valores relativos da atividade de luciferase do vagalume normalizado pela atividade de luciferase de *Renilla* (pRL-TK). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de três experimentos independentes para os não tratados e tratados com LPS, e um experimento com duplicata técnica para PMA. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  determinado por teste T de student não pareado.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi compreender o papel do RasGEF1b na regulação da expressão de *Slfn4*, *Serp1b2* e de genes do cluster em macrófagos ativados ou não por LPS. Estudos de RNA-seq de BMDM's WT e RasGEF1b-KO em repouso ou tratados com LPS sugerem que o GEF desempenha uma função sobre a expressão gênica, porém sobre um número limitado de genes (FERNANDES *et al.*, 2023) onde um cluster de seis genes teve a expressão reduzida em mais de duas vezes nos macrófagos knockouts tratados com LPS, incluindo *Slfn4* e *Serp1b2*.

Os seis genes do cluster, além de RasGEF1b, possuem a sua expressão diferenciada para cada população de macrófagos. Por exemplo, ao montar um perfil de expressão gênica para as populações de macrófagos peritoneais, do baço, do pulmão e micróglia os genes *Slfn4*, *Cd38*, *Selp* e *Serp1b2* ocorrem preferencialmente nos macrófagos peritoneais, já *Rasgef1b* e *Ch25h* são encontrados preferencialmente no pulmão (GAUTIAR *et al.*, 2012). De modo interessante, esses seis genes são acompanhados por uma frequência alta de associação com C/EBP, ao comparar com genes que tiveram a expressão elevada em relação a células dendríticas (GAUTIAR *et al.*, 2012). Em macrófagos peritoneais tratados com KLA (do inglês, *Kdo2 lipid A*), um agonista específico para o TLR4, foi identificado por RNA-seq que *Rasgef1b* e *Ch25h* apresentaram expressão elevada em macrófagos estimulados por 1h e que pertencem a um grupo de genes que possuem um enriquecimento de motivos para NF- $\kappa$ B, AP-1/CREB e SRF (ESCOUBET-LOZACH *et al.*, 2011). Esses três fatores possuem papéis cruciais para ativação do promotor de TLR4 em macrófagos (ROGER *et al.*, 2005), L-selectina em linfócitos (DANG; RAFFLER; LEY, 2009), IL-12 em células RAW (MASUMI *et al.*, 2002), e estão associados à expressão de genes estimulados por TNF, interferons, e LPS em macrófagos (PARK, Sung Ho *et al.*, 2017). Também, podem estar relacionados com uma contribuição de ligação constitutiva de PU.1 e IRF-8 que facilita o rápido recrutamento de IRF-3, por exemplo, ativação do promotor de IFN-beta (LI *et al.*, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2019; SIN *et al.*, 2012). Entretanto, em nossos resultados encontramos a expressão oposta de *Ch25h* em macrófagos silenciados para RasGEF1b quando comparados com BMDMs, e essa diferença pode estar relacionado pelo fator de transcrição ATF3 que regula negativamente este gene em níveis basais e ativados por LPS e IFN beta (LABZIN *et al.*, 2015). Em nossas análises in silico é encontrado sítio de ligação de ATF em comum para os sete genes do cluster. Este conjunto de fatores de transcrição citados possuem papéis na transcrição basal e na resposta imune de

[Digite aqui]

macrófagos, sendo a maioria encontrada nas regiões putativas dos seis genes comentados inicialmente.

Em nossas análises *in silico* identificamos sitio de ligação para a família de IRFs nos genes do cluster apontados pelo RNA-seq. Este fator de transcrição é um fator fortemente responsivo a estímulos por interferon, principalmente por interferon gama. Em análises de cromatina aberta, foi identificado um único sítio para IRF1/8 na posição -28pb relativa ao TSS de *Slfn4* (LANGLAIS; BARREIRO; GROS, 2016). Em seguida no mesmo trabalho, foi mostrado que a mutação de IRF-8 ou a deleção de IRF-1 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos altera a expressão do gene a níveis basais e em resposta à estimulação com interferon gama quando comparado com o de animais selvagem, corroborando com trabalhos anteriores (GESERICK, 2004; LANGLAIS; BARREIRO; GROS, 2016).

Nas nossas análises *in silico* de *Slfn4* encontramos uma região com repetições em tandem de GT, uma região similar é encontrada em ratos porem mais a montante, sendo classificadas como microsatelites. A localização de microsatelites em promotores e enhancers pode afetar a interação de proteínas regulatórias com o DNA, por exemplo, através da modulação da cromatina formando de uma morfologia z-DNA permitindo que um fator de transcrição ou enhancer que estavam separados pela região repetitiva interaja com proteína regulatório do outro lado (BAGSHAW, 2017). Adicionalmente, existem evidencias sugerindo uma associação entre os microsatelites e os marcadores epigeneticos H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3 e H3K9ac regulando a expressão de genes (BAGSHAW, 2017; GYMREK *et al.*, 2015). Algo similar é visto na região de 1764pb de *Slfn4* onde é observada a sobreposição do pico de atividade de H3K4me1 com o microssatélite. Entretanto, se a presença dessa região repetitiva em conjunto com RasGEF1b afeta a regulação transcricional, precisa ser estudada.

Os genes da família *Schlafen* são responsivos a estímulos com interferon tipo I e tipo II (DING *et al.*, 2016; GESERICK, 2004; KATSOUOLIDIS *et al.*, 2009; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013b; VAN ZUYLEN *et al.*, 2011), corroborando com os sítios de STAT, IRF e ISRE encontrados na região promotora putativa de *Slfn4*. Os sítios conservados de AP-1, SP-1 e IRF-1 entre o camundongo e rato, junto com os nossos dados de estímulo por interferon gama e literatura (GESERICK, 2004; LANGLAIS; BARREIRO; GROS, 2016) sejam possíveis alvos que contribuem para a regulação da expressão de *Slfn4*. As regiões encontradas podem auxiliar no [Digite aqui]

esclarecimento na regulação da expressão do gene em macrófagos, e o papel do RasGEF1b nos diferentes contextos citados anteriormente.

Igualmente ao *Sfn4*, os genes *Ch25h* e *Cd38* também são estimulados por interferon (BAUVOIS *et al.*, 1999; BLANC *et al.*, 2013; GLARÍA; VALLEDOR, 2020; LABZIN *et al.*, 2015; PARK, Kiwon; SCOTT, 2010). Entretanto, por não observarmos expressão de *Ch25h* em nossos experimentos seja porque o gene tem seu pico de expressão em 6 horas de estímulo com IFN-beta e gama em BMDMs (BLANC *et al.*, 2013), visto que este tempo não foi avaliado neste trabalho. Já para o *Cd38*, as diferenças podem ser devidas as técnicas usadas para medir a expressão em vista que elas foram feitas com fluorescência e analisadas por FACSsort permitindo analisar a expressão a nível de proteína e não de RNA (MUSSO *et al.*, 2001) ou que seja necessária doses maiores (LEE *et al.*, 2012).

Assim como *Sfn4*, o *IFIT1* em macrófagos é responsivo à infecção viral e à estimulação com IFNs tipo I e II (CHEN *et al.*, 2022; JOHN *et al.*, 2018, DING *et al.*, 2016; LIU, FURAO *et al.*, 2017; MAVROMMATIS; FISH; PLATANIAS, 2013b; VAN ZUYLEN *et al.*, 2011). Ao transfectar o segmento de -1670pb à +94pb de *Sfn4*, e usando o promotor de *IFIT1* (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1995) como controle positivo em células HEK293 tratadas com interferon tipo I, a atividade de luciferase de *Sfn4* foi maior quando comparada com *IFIT1*. A diferença demonstrada pelo ensaio de luciferase de região de *Sfn4* e *IFIT1* estudada neste trabalho precisa ser mais explorada, visto que os promotores possuem estruturas genômicas diferentes e foi realizado apenas um experimento com duplicatas técnicas. Sendo assim, a caracterização e a função de RasGEF1b sobre a região promotora de *Sfn4* ainda precisa ser melhor estudada, diferente de *Serpinb2* que já possui a sua região promotora caracterizada. Ambos os genes são cerca de duas vezes menos expressos como indicado pelo RNA-seq de BMDMs de camundongos deficientes de RasGEF1b, integrando um mesmo grupo e indicando possíveis fatores de transcrição ou vias de sinalização compartilhadas.

A regulação da região -539pb à +92pb de *Serpinb2* por LPS em macrófagos RAW264.7, já foi descrita como o principal segmento ativo em macrófagos. O mesmo segmento transfectado em macrófagos RAW264.7 silenciados para RasGEF1b, teve uma significativa redução da atividade de luciferase em níveis basais, e ainda mais em tratados com LPS. Esse conjunto de dados mostra que RasGEF1b contribui para otimizar a expressão do *Serpinb2*.

[Digite aqui]

No segmento de *Serpinb2* estudado neste trabalho são encontrados sítios de ligação para fatores de transcrição AP-1 e C/EBP-beta, que ao serem mutados comprometem a atividade de luciferase em macrófagos níveis basais tratados com LPS, indicando que o gene é regulado por estes dois fatores (UDOFA *et al.*, 2013). Ao transfectarmos este segmento com os respectivos sítios individualmente mutados com células HEK293 transfectadas com RasGEF1b, há uma redução da atividade de luciferase quando comparados com o segmento não mutado. A mutação nesses sítios corrobora com os resultados encontrados em murinos e humanos (STRINGER; UDOFA; ANTALIS, 2012; UDOFA *et al.*, 2013). Porém a diferença, de resultados mutante de C/EBP entre os experimentos de 24 e 48 horas de transfecção seja devido ao tempo que a célula ficou expressando RasGEF1b, todavia é necessário mais evidências. Neste trabalho, demonstramos que RasGEF1b regula a expressão de *Slfn4* e *Serpinb2*, e a busca pelo entendimento do eixo RasGEF1b/*Slfn4* e RasGEF1b/*Serpinb2* poderá contribuir para futuros estudos envolvendo a regulação de genes inflamatórios em vários tipos celulares e tecidos.

## 7. CONCLUSÃO

Com base no conjunto de dados apresentados nesse trabalho, concluímos que:

- 1- Os genes *Slfn4*, *Serpib2*, *Cd38*, *Ch25h* e *Selp* possuem uma baixa expressão em BMDM's de camundongos desprovidos de RasGEF1b em níveis basais e nos tempos de 4 e 8 horas de estímulo de LPS.
- 2- Os genes do cluster compartilham de sítios de ligação para os fatores de transcrição STAT, IRF, GATA, ATF e SPIB em nas suas regiões promotoras.
- 3- A região promotora (-1670pb à +94pb) de *Slfn4* possui os sítios de ligação para os fatores de transcrição AP-1, IRF, STAT, C/EBP e ISRE dentro dos segmentos conservados entre camundongos e ratos.
- 4- A região promotora (-1670pb à +94pb) de *Slfn4* é responsiva ao estímulo de IFN.
- 5- RasGEF1b é suficiente para induzir a ativação transcricional de de *Serpib2*.
- 6- A mutação dos C/EBP-beta e AP-1 na região promotora de *Serpib2* (-539pb à +92pb) reduz a ativação transcricional induzida por RasGEF1b.
- 7- A região promotora de *Serpib2* (-539pb à +92pb) tem a atividade reduzida em macrófagos RAW264.7 silenciados com RasGEF1b em níveis basais e estimulados com LPS.

## 8. REFERÊNCIA

- AKIRA, S.; ISSHIKI, H.; SUGITA, T.; TANABE KINOSHITA, O. S.; NISHIO, Y.; NAKAJIMA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **EMBO Journal**, vol. 9, no. 6, p. 1897–1906, 1990. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08316.x>.
- ANDRADE, W A; SILVA, A M; ALVES, Viviane Souza; SALGADO, A P C; MELO, M B; ANDRADE, H M; DALL'ORTO, F V; GARCIA, S A; SILVEIRA, T N; GAZZINELLI, R T. Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. **Genes & Immunity**, vol. 11, no. 6, p. 447–457, 21 Sep. 2010. DOI 10.1038/gene.2009.107. Available at: <http://www.nature.com/articles/gene2009107>.
- BAGSHAW, Andrew T.M. Functional mechanisms of microsatellite DNA in eukaryotic genomes. **Genome Biology and Evolution**, vol. 9, no. 9, p. 2428–2443, 2017. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx164>.
- BANDYOPADHYAY, Sudip K.; LEONARD, George T.; BANDYOPADHYAY, Tanya; STARK, George R.; SEN, Ganes C. Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, no. 33, p. 19624–19629, 1995. DOI 10.1074/jbc.270.33.19624. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.33.19624>.
- BAUVOIS, B.; DURANT, L.; LABOUREAU, J.; BARTHÉLÉMY, E.; ROUILLARD, D.; BOULLA, G.; DETERRE, P. Upregulation of CD38 gene expression in leukemic B cells by interferon types I and II. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, vol. 19, no. 9, p. 1059–1066, 1999. <https://doi.org/10.1089/107999099313299>.
- BLANC, Mathieu; HSIEH, Wei Yuan; ROBERTSON, Kevin A.; KROPP, Kai A.; FORSTER, Thorsten; SHUI, Guanghou; LACAZE, Paul; WATTERSON, Steven; GRIFFITHS, Samantha J.; SPANN, Nathanael J.; MELJON, Anna; TALBOT, Simon; KRISHNAN, Kathiresan; COVEY, Douglas F.; WENK, Markus R.; CRAIGON, Marie; RUZSICS, Zsolts; HAAS, Jürgen; ANGULO, Ana; ... GHAZAL, Peter. The Transcription Factor STAT-1 Couples Macrophage Synthesis of 25-Hydroxycholesterol to the Interferon Antiviral Response. **Immunity**, vol. 38, no. 1, p. 106–118, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.004>.
- BONNET, C; ANDRIEUX, J; BERI-DEXHEIMER, M.; LEHEUP, B.; BOUTE, O; MANOUVRIER, S; DELOBEL, B; COPIN, H; RECEVEUR, A; MATHIEU, M; THIRIEZ, G; LE CAIGNEC, C.; DAVID, A; DE BLOIS, M. C.; MALAN, V; PHILIPPE, A; CORMIER-DAIRE, V.; COLLEAUX, L; FLORI, E; ... SANLAVILLE, D. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. **Journal of Medical Genetics**, vol. 47, no. 6, p. 377–384, 1 Jun. 2010. DOI 10.1136/jmg.2009.071902. Available at: <https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmg.2009.071902>.
- CARVALHO, Brener C; OLIVEIRA, Leonardo C; ROCHA, Carolina D; FERNANDES, Heliana B; OLIVEIRA, Isadora M; LEÃO, Felipe B; VALVERDE, Thalita M; REGO, Igor M G; GHOSH, Sankar; SILVA, Aristóbol M. Both knock-down and overexpression of Rap2a small GTPase in macrophages result in impairment of NF- $\kappa$ B activity and in inflammatory gene



expression. **Molecular Immunology**, vol. 109, no. January, p. 27–37, 2019. DOI 10.1016/j.molimm.2019.02.015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.015>.

CHEN, Keyue; WU, Tiyun; WANG, Danyan; LI, Rong; SHEN, Xiangfeng; ZHAO, Ting; OZATO, Keiko; LI, Rongqun. Transcriptomics and quantitative proteomics reveal changes after second stimulation of bone marrow-derived macrophages from lupus-prone MRL/lpr mice. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, no. October, p. 1–18, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1004232>.

CHEN, Siyuan; YANG, Jing; WEI, Yuquan; WEI, Xiawei. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. **Cellular and Molecular Immunology**, vol. 17, no. 1, p. 36–49, 2020. DOI 10.1038/s41423-019-0315-0. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0315-0>.

CHIANG, Hao Sen; ZHAO, Yun; SONG, Joo Hye; LIU, Song; WANG, Ninghai; TERHORST, Cox; SHARPE, Arlene H.; BASAVAPPA, Megha; JEFFREY, Kate L.; REINECKER, Hans Christian. GEF-H1 controls microtubule-dependent sensing of nucleic acids for antiviral host defenses. **Nature Immunology**, vol. 15, no. 1, p. 63–71, 2014. <https://doi.org/10.1038/ni.2766>.

COMPANIONI NÁPOLES, Osmel; TSAO, Amy C.; SANZ-ANQUELA, José Miguel; SALA, Núria; BONET, Catalina; PARDO, María Luisa; DING, Lin; SIMO, Ornella; SAQUI-SALCES, Milena; BLANCO, Verónica Parra; GONZALEZ, Carlos A.; MERCHANT, Juanita L. SCHLAFEN 5 expression correlates with intestinal metaplasia that progresses to gastric cancer. **Journal of Gastroenterology**, vol. 52, no. 1, p. 39–49, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1202-4>.

CRUVINEL, Wilson de Melo; MESQUITA JÚNIOR, Danilo; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tiek Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva de; SILVA, Neusa Pereira da; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, vol. 50, no. 4, p. 434–447, Aug. 2010. DOI 10.1590/S0482-50042010000400008. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v50n4/v50n4a08>.

CZIKORA, Agnes; KEDEI, Noemi; KALISH, Heather; BLUMBERG, Peter M. Importance of the REM (Ras exchange) domain for membrane interactions by RasGRP3. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1859, no. 12, p. 2350–2360, 2017. DOI 10.1016/j.bbamem.2017.09.010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.010>.

DANG, Xitong; RAFFLER, Nikolai A.; LEY, Klaus. Transcriptional regulation of mouse I-selectin. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, vol. 1789, no. 2, p. 146–152, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.10.004>.

DING, Lin; HAYES, Michael M; PHOTENHAUER, Amanda; EATON, Kathryn A; LI, Qian; OCADIZ-RUIZ, Ramon; MERCHANT, Juanita L. Schlafen 4-expressing myeloid-derived suppressor cells are induced during murine gastric metaplasia. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 126, no. 8, p. 2867–2880, 18 Jul. 2016. DOI 10.1172/JCI82529. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/82529>.

EL-ZAATARI, Mohamad; KAO, John Y.; TESSIER, Art; BAI, Longchuan; HAYES, Michael M.; FONTAINE, Clinton; EATON, Kathryn A.; MERCHANT, Juanita L. Gli1 Deletion Prevents

[Digite aqui]

Helicobacter-Induced Gastric Metaplasia and Expansion of Myeloid Cell Subsets. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, p. 1–14, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058935>.

ENGLER, Andrea; ROY, Sashwati; SEN, Chandan K.; PADGETT, David A.; SHERIDAN, John F. Restraint stress alters lung gene expression in an experimental influenza A viral infection. **Journal of Neuroimmunology**, vol. 162, no. 1–2, p. 103–111, May 2005. DOI 10.1016/j.jneuroim.2005.01.017. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572805000408>.

ESCOUBET-LOZACH, Laure; BENNER, Christopher; KAIKKONEN, Minna U.; LOZACH, Jean; HEINZ, Sven; SPANN, Nathan J.; CROTTI, Andrea; STENDER, Josh; GHISLETTI, Serena; REICHAART, Donna; CHENG, Christine S.; LUNA, Rosa; LUDKA, Colleen; SASIK, Roman; GARCIA-BASSETS, Ivan; HOFFMANN, Alexander; SUBRAMANIAM, Shankar; HARDIMAN, Gary; ROSENFELD, Michael G.; GLASS, Christopher K. Mechanisms establishing tlr4-responsive activation states of inflammatory response genes. **PLoS Genetics**, vol. 7, no. 12, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002401>.

ESTEBAN, L.; VIDAL, M.; DUSSO, A.  $1\alpha$ -Hydroxylase transactivation by  $\gamma$ -interferon in murine macrophages requires enhanced C/EBP $\beta$  expression and activation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 89–90, p. 131–137, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.092>.

FERNANDES, Heliana B.; OLIVEIRA, Isadora M.; POSTLER, Thomas S.; LIMA, Sérgio Q.; SANTOS, Cícera A. C.; LEÃO, Felipe B.; GHOSH, Sankar; SOUZA, Maria C.; ANDRADE, Warrison; SILVA, Aristóboles M. Transcriptomic analysis reveals that deletion of the gene encoding the Ras guanine nucleotide exchange factor RasGEF1b affects gene expression under basal and LPS-induced conditions in macrophages. **Submitted**, 2023. .

FLEETWOOD, Andrew J.; ACHUTHAN, Adrian; SCHULTZ, Heidi; NANSEN, Anneline; ALMHOLT, Kasper; USHER, Pernille; HAMILTON, John A. Urokinase Plasminogen Activator Is a Central Regulator of Macrophage Three-Dimensional Invasion, Matrix Degradation, and Adhesion. **The Journal of Immunology**, vol. 192, no. 8, p. 3540–3547, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302864>.

GANGWANI, Mohitkumar R.; KUMAR, Anil; BUCH, Shilpa J. Multiple protein kinases via activation of transcription factors NF-KB, AP-1 and C/EBP-5 regulate the IL-6/IL-8 production by HIV-1 Vpr in astrocytes. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 8, p. 1–20, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135633>.

GAUTIER, Emmanuel L.; SHAY, Tal; MILLER, Jennifer; GRETER, Melanie; JAKUBZICK, Claudia; IVANOV, Stoyan; HELFT, Julie; CHOW, Andrew; ELPEK, Kutlu G.; GORDONOV, Simon; MAZLOOM, Amin R.; MA'AYAN, Avi; CHUA, Wei Jen; HANSEN, Ted H.; TURLEY, Shannon J.; MERAD, Miriam; RANDOLPH, Gwendalyn J.; BEST, Adam J.; KNELL, Jamie; ... BENOIST, Christophe. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nature Immunology**, vol. 13, no. 11, p. 1118–1128, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>.

GEIGER, Margarethe; WAHLMÜLLER, Felix; FURTMÜLLER, Margareta. **The serpin family: Proteins with multiple functions in health and disease**. [S. l.: s. n.], 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22711-5>.

[Digite aqui]

GESERICK, Peter. Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. **International Immunology**, vol. 16, no. 10, p. 1535–1548, 31 Aug. 2004. DOI 10.1093/intimm/dxh155. Available at: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxh155>.

GLARÍA, Estibaliz; VALLEDOR, Annabel F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. **Cells**, vol. 9, no. 1, p. 228, 16 Jan. 2020. DOI 10.3390/cells9010228. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/228>.

GOUGH, Daniel J.; MARIÉ, Isabelle J.; LOBRY, Camille; AIFANTIS, Iannis; LEVY, David E. STAT3 supports experimental K-RasG12D-induced murine myeloproliferative neoplasms dependent on serine phosphorylation. **Blood**, vol. 124, no. 14, p. 2252–2261, 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-484196>.

GUPTA, Pallavi; GANGENAHALLI, Gurudutta; SALUJA, Daman; VERMA, Yogesh; ZACK, Jyoti; SINGH, Vimal; SATIJA, Neeraj; TRIPATHI, Rajendra. Hematopoietic Stem Cell Transcription Factor PU.1 with Mutated  $\beta 3/\beta 4$  Domain Selectively Elicits Myeloid Differentiation. **Nature Precedings**, , p. 1–17, 2010. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.5453.1>.

GYMREK, Melissa; WILLEMS, Thomas; GUILMATRE, Audrey; ZENG, Haoyang; MARKUS, Barak; GEORGIEV, Stoyan; DALY, Mark J.; PRICE, Alkes L.; PRITCHARD, Jonathan K.; SHARP, Andrew J.; ERLICH, Yaniv. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. **Nature Genetics**, vol. 48, no. 1, p. 22–29, 2015. <https://doi.org/10.1038/ng.3461>.

HERRANZ, Sandra; TRAVÉS, Paqui G.; LUQUE, Alfonso; HORTELANO, Sonsoles. Role of the tumor suppressor ARF in macrophage polarization: Enhancement of the M2 phenotype in ARF-deficient mice. **Oncology**, vol. 1, no. 8, p. 1227–1238, 2012. <https://doi.org/10.4161/onci.21207>.

HU, Xiaoyu; CHEN, Janice; WANG, Lu; IVASHKIV, Lionel B. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 82, no. 2, p. 237–243, 2007. <https://doi.org/10.1189/jlb.1206763>.

JOHN, Sinu P.; SUN, Jing; CARLSON, Rebecca J.; CAO, Binh; BRADFIELD, Clinton J.; SONG, Jian; SMELKINSON, Margery; FRASER, Iain D.C. IFIT1 Exerts Opposing Regulatory Effects on the Inflammatory and Interferon Gene Programs in LPS-Activated Human Macrophages. **Cell Reports**, vol. 25, no. 1, p. 95–106.e6, 2018. DOI 10.1016/j.celrep.2018.09.002. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.002>.

JOHNSON, Derek S.; CHEN, Youhai H. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 12, no. 4, p. 458–463, 2012. DOI 10.1016/j.coph.2012.02.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.02.003>.

KANG, Kyuho; BACHU, Mahesh; PARK, Sung Ho; KANG, Keunsoo; BAE, Seyeon; PARK-MIN, Kyung-Hyun; IVASHKIV, Lionel B. IFN- $\gamma$  selectively suppresses a subset of TLR4-activated genes and enhancers to potentiate macrophage activation. **Nature Communications**, vol. 10, no. 1, p. 3320, 25 Dec. 2019. DOI 10.1038/s41467-019-11147-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11147-3>.

KANG, Kyuho; PARK, Sung Ho; CHEN, Janice; QIAO, Yu; GIANNOPOULOU, Eugenia; BERG, Karen; HANIDU, Adedayo; LI, Jun; NABOZNY, Gerald; KANG, Keunsoo; PARK-MIN, Kyung Hyun; IVASHKIV, Lionel B. Interferon- $\gamma$  Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF. **Immunity**, vol. 47, no. 2, p. 235-250.e4, 2017. DOI 10.1016/j.immuni.2017.07.017. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.017>.

KARNATI, Hanuma Kumar; PASUPULETI, Satya Ratan. TLR-4 signalling pathway : MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment. , p. 73–78, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9621-2>.

KATSOLIDIS, Efstratios; CARAYOL, Nathalie; WOODARD, Jennifer; KONIECZNA, Iwona; MAJCHRZAK-KITA, Beata; JORDAN, Alison; SASSANO, Antonella; EKLUND, Elizabeth A; FISH, Eleanor N; PLATANIAS, Leonidas C. Role of Schlafen 2 (SLFN2) in the Generation of Interferon  $\alpha$ -induced Growth Inhibitory Responses. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 284, no. 37, p. 25051–25064, Sep. 2009. DOI 10.1074/jbc.M109.030445. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820305949>.

KIM, Tae Kyung; SHIEKHATTAR, Ramin. Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. **Cell**, vol. 162, no. 5, p. 948–959, 2015. DOI 10.1016/j.cell.2015.08.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.008>.

KUZNETSOVA, Tatyana; PRANGE, Koen H. M.; GLASS, Christopher K.; DE WINTHER, Menno P. J. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, vol. 17, no. 4, p. 216–228, 2 Apr. 2020. DOI 10.1038/s41569-019-0265-3. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41569-019-0265-3>.

LABZIN, Larisa I.; SCHMIDT, Susanne V.; MASTERS, Seth L.; BEYER, Marc; KREBS, Wolfgang; KLEE, Kathrin; STAHL, Rainer; LÜTJOHANN, Dieter; SCHULTZE, Joachim L.; LATZ, Eicke; DE NARDO, Dominic. ATF3 Is a Key Regulator of Macrophage IFN Responses. **The Journal of Immunology**, vol. 195, no. 9, p. 4446–4455, 2015. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500204>.

LANGLAIS, David; BARREIRO, Luis B.; GROS, Philippe. The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 213, no. 4, p. 585–603, 2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20151764>.

LEÃO, Felipe B.; VAUGHN, Lauren S; BHATT, Dev; LIAO, Will; MALONEY, Dillon; CARVALHO, Brenner C; OLIVEIRA, Leonardo; GHOSH, Sankar; SILVA, Aristóbolo M. Toll-like Receptor (TLR)-induced Rasgef1b expression in macrophages is regulated by NF- $\kappa$ B through its proximal promoter. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 127, no. May, p. 105840, Oct. 2020. DOI 10.1016/j.biocel.2020.105840. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272520301576>.

LEE, Cha Uk; SONG, Eun Kyung; YOO, Chae Hwa; KWAK, Yong Keun; HAN, Myung Kwan. Lipopolysaccharide induces CD38 expression and solubilization in J774 macrophage cells. **Molecules and cells**, vol. 34, no. 6, p. 573–576, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0263-3>.

LI, Peng; WONG, Joyce Jing Yi; SUM, Calvin; SIN, Wei Xiang; NG, Kok Quan; KOH, Mickey B.C.; CHIN, Keh Chuang. IRF8 and IRF3 cooperatively regulate rapid interferon- $\beta$  induction in human blood monocytes. **Blood**, vol. 117, no. 10, p. 2847–2854, 2011. DOI 10.1182/blood-2010-07-294272. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-294272>.

LIU, FURAO; ZHOU, Pingting; WANG, Qian; ZHANG, Meichao; LI, Dong. The Schlafen family : complex roles in different cell types and virus replication. vol. 9999, p. 1–7, 2017. <https://doi.org/10.1002/cbin.10778>.

LIU, Xuefang; YIN, Sugai; CHEN, Yulong; WU, Yaosong; ZHENG, Wanchun; DONG, Haoran; BAI, Yan; QIN, Yanqin; LI, Jiansheng; FENG, Suxiang; ZHAO, Peng. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- $\kappa$ B, STAT3 or AP-1 activation. **Molecular Medicine Reports**, vol. 17, no. 4, p. 5484–5491, 2018. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8542>.

LU, Yong-Chen; KIM, Ira; LYE, Elizabeth; SHEN, Fang; SUZUKI, Nobutaka; SUZUKI, Shinobu; GERONDAKIS, Steve; AKIRA, Shizuo; GAFFEN, Sarah L.; YEH, Wen-Chen; OHASHI, Pamela S. Differential Role for c-Rel and C/EBP $\beta/\delta$  in TLR-Mediated Induction of Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Immunology**, vol. 182, no. 11, p. 7212–7221, 1 Jun. 2009. DOI 10.4049/jimmunol.0802971. Available at: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/182/11/7212/78941/Differential-Role-for-c-Rel-and-C-EBP-in-TLR>.

LU, Yong Chen; YEH, Wen Chen; OHASHI, Pamela S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, vol. 42, no. 2, p. 145–151, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.

LUH, Shi ping; CHIANG, Chi huei. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. **Journal of Zhejiang University: Science B**, vol. 8, no. 1, p. 60–69, 2007. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0060>.

MA, Xianwei; JIANG, Zhengyu; LI, Na; JIANG, Wei; GAO, Peng; YANG, Mingjin; YU, Xiya; WANG, Guifang; ZHANG, Yan. Ets2 suppresses inflammatory cytokines through MAPK/NF- $\kappa$ B signaling and directly binds to the IL-6 promoter in macrophages. **Aging**, vol. 11, no. 22, p. 10610–10625, 2019. <https://doi.org/10.18632/aging.102480>.

MANCINO, Alessandra; TERMANINI, Alberto; BAROZZI, Iros; GHISLETTI, Serena; OSTUNI, Renato; PROSPERINI, Elena; OZATO, Keiko; NATOLI, Gioacchino. A dual cis-regulatory code links IRF8 to constitutive and inducible gene expression in macrophages. **Genes and Development**, vol. 29, no. 4, p. 394–408, 2015. <https://doi.org/10.1101/gad.257592.114>.

MARKOVIC, N.; MCCAIG, L. A.; STEPHEN, J.; MIZUGUCHI, S.; VELDHUIZEN, R. A.W.; LEWIS, J. F.; CEPINSKAS, G. Mediators released from LPS-challenged lungs induce inflammatory responses in liver vascular endothelial cells and neutrophilic leukocytes. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 297, no. 6, p. 1066–1076, 2009. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00278.2009>.

MASUMI, Atsuko; TAMAOKI, Satoshi; WANG, I-ming; OZATO, Keiko; KOMURO, Katsutoshi. IRF-8 / ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. vol. 531, p. 348–353, 2002. .

[Digite aqui]

- MATTHAY, Michael A.; ZIMMERMAN, Guy A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: Four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, vol. 33, no. 4, p. 319–327, 2005. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F305>.
- MAVROMMATIS, Evangelos; FISH, Eleanor N.; PLATANIAS, Leonidas C. The Schlafen family of proteins and their regulation by interferons. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, vol. 33, no. 4, p. 206–210, 2013a. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0133>.
- MAVROMMATIS, Evangelos; FISH, Eleanor N.; PLATANIAS, Leonidas C. The Schlafen Family of Proteins and Their Regulation by Interferons. vol. 33, no. 4, p. 206–210, 2013b. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0133>.
- MEDZHITOV, Ruslan; HORNG, Tiffany. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Reviews Immunology**, vol. 9, no. 10, p. 692–703, 2009. <https://doi.org/10.1038/nri2634>.
- MEI, Shirley H.J.; MCCARTER, Sarah D.; DENG, Yupu; PARKER, Colleen H.; LILES, W. Conrad; STEWART, Duncan J. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin. **PLoS Medicine**, vol. 4, no. 9, p. 1525–1537, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040269>.
- MERCHANT, Juanita L; DING, Lin. Hedgehog Signaling Links Chronic Inflammation to Gastric Cancer Precursor Lesions. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, vol. 3, no. 2, p. 201–210, Mar. 2017. DOI 10.1016/j.jcmgh.2017.01.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.004>.
- MUSSO, Tiziana; DEAGLIO, Silvia; FRANCO, Luisa; CALOSSO, Liliana; BADOLATO, Raffaele; GARBARINO, Giovanni; DIANZANI, Umberto; MALAVASI, Fabio. CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN- $\gamma$  on human monocytes and monocytic cell lines. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 69, no. 4, p. 605–612, 2001. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.4.605>.
- NEUMANN, Brent; ZHAO, Liang; MURPHY, Kathleen; GONDA, Thomas J. Subcellular localization of the Schlafen protein family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 370, no. 1, p. 62–66, 2008a. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.032>.
- NEUMANN, Brent; ZHAO, Liang; MURPHY, Kathleen; GONDA, Thomas J. Subcellular localization of the Schlafen protein family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 370, no. 1, p. 62–66, May 2008b. DOI 10.1016/j.bbrc.2008.03.032. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X08004749>.
- PARK, Kiwon; SCOTT, Alan L. Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 88, no. 6, p. 1081–1087, 2010. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610318>.
- PARK, Sung Ho; KANG, Kyuho; GIANNOPOULOU, Eugenia; QIAO, Yu; KANG, Keunsoo; KIM, Geonho; PARK-MIN, Kyung Hyun; IVASHKIV, Lionel B. Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. **Nature Immunology**, vol. 18, no. 10, p. 1104–1116, 2017. <https://doi.org/10.1038/ni.3818>.

REDDY, Marpadga A.; CHEN, Zhuo; PARK, Jung Tak; WANG, Mei; LANTING, Linda; ZHANG, Qiang; BHATT, Kirti; LEUNG, Amy; WU, Xiwei; PUTTA, Sumanth; SÆTROM, Pål; DEVARAJ, Sridevi; NATARAJAN, Rama. Regulation of inflammatory phenotype in macrophages by a diabetes-induced long noncoding RNA. **Diabetes**, vol. 63, no. 12, p. 4249–4261, 2014. <https://doi.org/10.2337/db14-0298>.

REINER, David J. Small GTPases. **WormBook**, , p. 1–65, 2018. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.67.2>.

ROGER, Thierry; MICONNET, Isabelle; SCHIESSER, Anne Laure; KAI, Hirofumi; MIYAKE, Kensuke; CALANDRA, Thierry. Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. **Biochemical Journal**, vol. 387, no. 2, p. 355–365, 2005. <https://doi.org/10.1042/BJ20041243>.

ROSAS, Marcela; DAVIES, Luke C.; GILES, Peter J.; LIAO, Chia Te; KHARFAN, Bashar; STONE, Timothy C.; O'DONNELL, Valerie B.; FRASER, Donald J.; JONES, Simon A.; TAYLOR, Philip R. The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. **Science**, vol. 344, no. 6184, p. 645–648, 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1251414>.

ROY, Ruchi; PARASHAR, Vyom; CHAUHAN, L. K.S.; SHANKER, Rishi; DAS, Mukul; TRIPATHI, Anurag; DWIVEDI, Premendra Dhar. Mechanism of uptake of ZnO nanoparticles and inflammatory responses in macrophages require PI3K mediated MAPKs signaling. **Toxicology in Vitro**, vol. 28, no. 3, p. 457–467, 2014. DOI 10.1016/j.tiv.2013.12.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.004>.

SCHMIDT, Martina; BIES, Juraj; TAMURA, Tomohiko; OZATO, Keiko; WOLFF, Linda. The interferon regulatory factor ICSBP / IRF-8 in combination with PU . 1 up-regulates expression of tumor suppressor p15 Ink4b in murine myeloid cells. vol. 103, no. 11, p. 4142–4150, 2019. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0285.4142>.

SCHRODER, Wayne A.; HIRATA, Thiago D.; LE, Thuy T.; GARDNER, Joy; BOYLE, Glen M.; ELLIS, Jonathan; NAKAYAMA, Eri; PATHIRANA, Dilan; NAKAYA, Helder I.; SUHRBIER, Andreas. SerpinB2 inhibits migration and promotes a resolution phase signature in large peritoneal macrophages. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48741-w>.

SCHRODER, Wayne A.; LE, Thuy T. T.; MAJOR, Lee; STREET, Shayna; GARDNER, Joy; LAMBLEY, Eleanore; MARKEY, Kate; MACDONALD, Kelli P.; FISH, Richard J.; THOMAS, Ranjeny; SUHRBIER, Andreas. A Physiological Function of Inflammation-Associated SerpinB2 Is Regulation of Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, vol. 184, no. 5, p. 2663–2670, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902187>.

SCHRODER, Wayne A.; MAJOR, Lee; SUHRBIER, Andreas. The role of serpinB2 in immunity. **Critical Reviews in Immunology**, vol. 31, no. 1, p. 15–30, 2011. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i1.20>.

SCHUSTER, W A; MEDCALF, R L; KRUTHOF, E K. Retinoic acid potentiates phorbol ester-mediated induction of urokinase and plasminogen activator inhibitor type 2 in human myeloid leukemic cell lines. **Endocrinology**, vol. 133, no. 4, p. 1724–1730, 1 Oct. 1993. DOI

[Digite aqui]

10.1210/endo.133.4.8404615. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1771617>.

SCHWARZ, David A.; KATAYAMA, Carol D.; HEDRICK, Stephen M. Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. **Immunity**, vol. 9, no. 5, p. 657–668, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80663-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80663-9).

SEBASTIAN, Thomas; JOHNSON, Peter F. Stop and go: Anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBP $\beta$ . **Cell Cycle**, vol. 5, no. 9, p. 953–957, 2006. <https://doi.org/10.4161/cc.5.9.2733>.

SEN, Payel; HELMKE, Alexandra; LIAO, Chieh Ming; SÖRENSEN-ZENDER, Inga; RONG, Song; BRÄSEN, Jan Hinrich; MELK, Anette; HALLER, Hermann; VON VIETINGHOFF, Sibylle; SCHMITT, Roland. SerpinB2 regulates immune response in kidney injury and aging. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 31, no. 5, p. 983–995, 2020. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019101085>.

SHEN, Bingyu; ZHAO, Chenxu; CHEN, Chengzhen; LI, Zheng; LI, Yang; TIAN, Ye; FENG, Haihua. Picoside II Protects Rat Lung and A549 Cell Against LPS-Induced Inflammation by the NF- $\kappa$ B Pathway. **Inflammation**, vol. 40, no. 3, p. 752–761, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0519-3>.

SHII, Lihua; SONG, Li; MAURER, Kelly; ZHANG, Zhe; SULLIVAN, Kathleen E. SERPINB2 is regulated by dynamic interactions with pause-release proteins and enhancer RNAs. **Molecular Immunology**, vol. 88, no. May, p. 20–31, 2017. DOI 10.1016/j.molimm.2017.05.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.005>.

SIN, Wei Xiang; LI, Peng; YEONG, Joe Poh Sheng; CHIN, Keh Chuang. Activation and regulation of interferon- $\beta$  in immune responses. **Immunologic Research**, vol. 53, no. 1–3, p. 25–40, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8293-7>.

SOHN, Wern-joo; KIM, Dongbum; LEE, Keun-Wook; KIM, Min-Soo; KWON, Sanghoon; LEE, Younghee; KIM, Doo-sik; KWON, Hyung-joo. Novel transcriptional regulation of the schlafen-2 gene in macrophages in response to TLR-triggered stimulation. **Molecular Immunology**, vol. 44, no. 13, p. 3273–3282, Jul. 2007. DOI 10.1016/j.molimm.2007.03.001. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589007000983>.

SPOONER, Chauncey J.; GUO, Xiangrong; JOHNSON, Peter F.; SCHWARTZ, Richard C. Differential roles of C/EBP $\beta$  regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription. **Molecular Immunology**, vol. 44, no. 6, p. 1384–1392, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.05.004>.

STRINGER, Brett; UDOFA, Ekemini A.; ANTALIS, Toni M. Regulation of the human plasminogen activator inhibitor type 2 gene: Cooperation of an upstream silencer and transactivator. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, no. 13, p. 10579–10589, 2012. DOI 10.1074/jbc.M111.318758. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.318758>.

TANG, Songqing; CHEN, Taoyong; YU, Zhou; ZHU, Xuhui; YANG, Mingjin; XIE, Bin; LI, Nan; CAO, Xuetao; WANG, Jianli. RasGRP3 limits Toll-like receptor-triggered inflammatory response in macrophages by activating Rap1 small GTPase. **Nature Communications**, vol. 5, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms5657>.



TESKE, Nina C.; ENGELEN-LEE, Joo Yeon; DYCKHOFF-SHEN, Susanne; PFISTER, Hans Walter; KLEIN, Matthias; VAN DE BEEK, Diederik; KIRSCHNING, Carsten K.; KOEDEL, Uwe; BROUWER, Matthijs C. The role of plasminogen activator inhibitor-2 in pneumococcal meningitis. **Acta Neuropathologica Communications**, vol. 10, no. 1, p. 1–11, 2022. DOI 10.1186/s40478-022-01461-1. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01461-1>.

THURMAN, Robert E.; RYNES, Eric; HUMBERT, Richard; VIERSTRA, Jeff; MAURANO, Matthew T.; HAUGEN, Eric; SHEFFIELD, Nathan C.; STERGACHIS, Andrew B.; WANG, Hao; VERNOT, Benjamin; GARG, Kavita; JOHN, Sam; SANDSTROM, Richard; BATES, Daniel; BOATMAN, Lisa; CANFIELD, Theresa K.; DIEGEL, Morgan; DUNN, Douglas; EBERSOL, Abigail K.; ... STAMATOYANNOPOULOS, John A. The accessible chromatin landscape of the human genome. **Nature**, vol. 489, no. 7414, p. 75–82, 2012. DOI 10.1038/nature11232. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11232>.

TYNER, Jeffrey W.; UCHIDA, Osamu; KAJIWARA, Naohiro; KIM, Edy Y.; PATEL, Anand C.; O’SULLIVAN, Mary P.; WALTER, Michael J.; SCHWENDENER, Reto A.; COOK, Donald N.; DANOFF, Theodore M.; HOLTZMAN, Michael J. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. **Nature Medicine**, vol. 11, no. 11, p. 1180–1187, 2 Nov. 2005. DOI 10.1038/nm1303. Available at: <http://www.nature.com/articles/nm1303>.

UDOFA, Ekemini A; STRINGER, Brett W; GADE, Padmaja; MAHONY, Donna; BUZZA, Marguerite S; KALVAKOLANU, Dhananjaya V; ANTALIS, Toni M. The Transcription Factor C/EBP- $\beta$  Mediates Constitutive and LPS-Inducible Transcription of Murine SerpinB2. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, p. e57855, 5 Mar. 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0057855. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0057855>.

VAN KUPPEVELD, F J; JOHANSSON, K. E.; GALAMA, J. M.D.; KISSING, J.; BÖLSKE, G; VAN DER LOGT, J T; MELCHERS, W. J.G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 60, no. 1, p. 149–152, 1994. DOI 10.1128/AEM.60.1.149-152.1994. Available at: <https://aem.asm.org/content/60/1/149>.

VAN ZUYLEN, Wendy J.; GARCEAU, Valerie; IDRIS, Adi; SCHRODER, Kate; IRVINE, Katharine M; LATTIN, Jane E; OVCHINNIKOV, Dmitry A; PERKINS, Andrew C; COOK, Andrew D; HAMILTON, John A; HERTZOG, Paul J; STACEY, Katryn J; KELLIE, Stuart; HUME, David A; SWEET, Matthew J. Macrophage Activation and Differentiation Signals Regulate Schlafen-4 Gene Expression: Evidence for Schlafen-4 as a Modulator of Myelopoiesis. **PLoS ONE**, vol. 6, no. 1, p. e15723, 7 Jan. 2011. DOI 10.1371/journal.pone.0015723. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015723>.

VIGIL, Dominico; CHERFILS, Jacqueline; ROSSMAN, Kent L.; DER, Channing J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, vol. 10, no. 12, p. 842–857, 24 Dec. 2010. DOI 10.1038/nrc2960. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrc2960>.

WANG, Shilin; LIU, Guohong; LI, Yirong; PAN, Yunbao. Metabolic Reprogramming Induces Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, no. July, p. 1–14, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840029>.

[Digite aqui]

WEIRAUCH, Matthew T.; YANG, Ally; ALBU, Mihai; COTE, Atina G.; MONTENEGRO-MONTERO, Alejandro; DREWE, Philipp; NAJAFABADI, Hamed S.; LAMBERT, Samuel A.; MANN, Ishminder; COOK, Kate; ZHENG, Hong; GOITY, Alejandra; VAN BAKEL, Harm; LOZANO, Jean-Claude; GALLI, Mary; LEWSEY, Mathew G.; HUANG, Eryong; MUKHERJEE, Tuhin; CHEN, Xiaoting; ... HUGHES, Timothy R. Determination and Inference of Eukaryotic Transcription Factor Sequence Specificity. **Cell**, vol. 158, no. 6, p. 1431–1443, Sep. 2014. DOI 10.1016/j.cell.2014.08.009. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414010368>.

WENNERBERG, Krister; ROSSMAN, Kent L.; DER, Channing J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of Cell Science**, vol. 118, no. 5, p. 843–846, 2005. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.

XIE, Leike; OVERBEEK, Paul A.; RENEKER, Lixing W. Ras signaling is essential for lens cell proliferation and lens growth during development. **Developmental Biology**, vol. 298, no. 2, p. 403–414, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.045>.

ZARREI, Mehdi; MERICCO, Daniele; KELLAM, Barbara; ENGCHUAN, Worrawat; SCRIVER, Tara; JOKHAN, Rikash; WILSON, Michael D.; PARR, Jeremy; LEMIRE, Edmond G.; STAVROPOULOS, Dimitri J.; SCHERER, Stephen W. A de novo deletion in a boy with cerebral palsy suggests a refined critical region for the 4q21.22 microdeletion syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, vol. 173, no. 5, p. 1287–1293, 2017. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38176>.

ZHU, Chen; GAGNIDZE, Khatuna; GEMBERLING, James H.M.; PLEVY, Scott E. Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-12 p40 promoter: Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, no. 21, p. 18519–18528, 2001. DOI 10.1074/jbc.M100440200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100440200>.