

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Jôsy Hubner de Sousa

**Implicação do fator RasGEF1b na regulação da expressão da quimiocina Cxcl1 e
neutrofilia durante a infecção pelo vírus H1N1 em camundongos**

Belo Horizonte

2018

Jôsy Hubner de Sousa

**IMPLICAÇÃO DO FATOR RASGEF1B NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
QUIMIOCINA CXCL1 E NEUTROFILIA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS
H1N1 EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte

2018

043

Sousa, Jôsy Hubner de.

Implicação do fator RasGEF1b na regulação da expressão da quimiocina Cxcl1 e neutrofilia durante a infecção pelo vírus H1N1 em camundongos [manuscrito] / Jôsy Hubner de Sousa. – 2018.

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

Orientador: Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva.

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

1. Biologia Celular. 2. Quimiocina CXCL1. 3. Fatores ras de Troca de Nucleotídeo Guanina. 4. Receptor 7 Toll-Like. I. Silva, Aristóbolo Mendes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

JÔSY HUBNER DE SOUSA

307/2018
entrada
2º/2016
2016713547

Às **nove horas** do dia **27 de julho de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"IMPLICAÇÃO DO FATOR RASGEF1B NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 E NEUTROFILIA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS H1N1 EM CAMUNDONGOS"**, requisito final para obtenção do grau de Mestre 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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Aristóbolo Mendes da Silva	UFMG	APROVADA
Dr. Alexandre M. Vieira Machado	Fiocruz	APPROVADO
Dr. Remo Castro Russo	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de julho de 2018.**

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva (Orientador)

Dr. Alexandre M. Vieira Machado

Dr. Remo Castro Russo

RESUMO

Os vírus Influenza são uma das causas mais comuns das infecções respiratórias, sendo um dos principais problemas que afligem a saúde pública no mundo, ainda causando uma alta taxa de mortalidade. Durante a infecção, o receptor do tipo Toll 7 (TLR7) expresso em células epiteliais, dendríticas e macrófagos reconhece o vírus Influenza A (IAV, do inglês *Influenza A virus*) devido a sua habilidade em detectar RNA de fita simples (ssRNA) de origem viral. A produção de citocinas e quimiocinas assim como a expressão de moléculas sinalizadoras intracelulares induzidas durante a infecção por IAV mediada por TLR7 impactam significativamente na resposta do organismo. O membro 1b da família do domínio de fatores de troca de nucleotídeos guanina associado a proteína Ras (RasGEF1b) tem expressão dominante e induzida em macrófagos estimulados com agonistas inflamatórios de TLRs. Apenas recentemente, sua função começou a ser estabelecida na resposta imune. Análises do perfil da expressão de genes inflamatórios específicos revelaram que a deficiência de RasGEF1b em macrófagos afeta apenas certos genes responsivos ao LPS. Em particular, um gene com expressão prejudicada foi *Cxcl1* que codifica a quimiocina KC/Cxcl1 que é crítica para o recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios, sobretudo em infecções bacterianas e virais. Essas observações nos levaram a sugerir que, RasGEF1b exerce um papel na resposta imune ao regular a expressão da quimiocina. Assim, nosso objetivo foi avaliar o papel fisiológico de RasGEF1b sobre a expressão de *Cxcl1* na resposta imune mediada por TLR7 e durante a infecção pelo IAV. Camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* (com recombinação gênica em tecido hematopoietico) e *Rasgef1b^{fl/fl};CMV-cre* (com recombinação gênica somática) foram usados para infecção com o vírus A/PR8/34 ou estímulo com R848 respectivamente, e posterior estudo de fenótipo, expressão e produção de moléculas relevantes na resposta contra o vírus. Demonstramos ainda que camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* apresentam sobrevida significativamente aumentada durante a infecção por Influenza. Nossos estudos fornecem novo conhecimento acerca de um fator do hospedeiro na resposta imune mediada por TLR7 através da infecção pelo IAV e que, pode trazer idéias para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas tão necessárias para as infecções por IAV.

Palavras-chave: *Cxcl1*; RasGEF1b; TLR7.

ABSTRACT

The influenza virus is one of the most common causes of respiratory infections, and is one of the main problems affecting public health worldwide, causing a high mortality rate. During infection, the Toll-like receptor 7 (TLR7) expressed on epithelial, dendritic cells and macrophages recognizes the influenza A virus (IAV) due to its ability to detect single-stranded RNA (ssRNA) of viral origin. The production of cytokines and chemokines as well as the expression of intracellular signaling molecules caused during an IAV infection mediated by TLR7 significantly impact the body's response. The Ras-associated guanine nucleotide exchange factor domain family member 1b (RasGEF1b) has dominant and caused expression in macrophages stimulated with inflamed TLR agonists. Only recently, its function has begun to be revealed in the immune response. Expression profiling of specific affected genes revealed that RasGEF1b deficiency in macrophages affected only a few genes responsible for LPS. In particular, one gene with impaired expression was Cxcl1, which encodes the chemokine KC/Cxcl1 that is critical for neutrophil recruitment to inflammatory sites, mainly in bacterial and viral infections. These observations led us to suggest that RasGEF1b plays a role in the immune response by regulating chemokine expression. Thus, we aimed to evaluate the physiological role of RasGEF1b on Cxcl1 expression in the TLR7-mediated immune response and during IAV infection. Rasgef1b^{fl/fl};vav-*icre* mice (with gene recombination in hematopoietic tissue) and Rasgef1b^{fl/fl};CMV-*cre* mice (with somatic gene recombination) were used for infection with the A/PR8/34 virus or stimulation with R848, respectively, and subsequent study of phenotype, expression and production of relevant molecules in the response against the virus. We also demonstrated that Rasgef1b^{fl/fl};vav-*icre* mice have significantly increased survival during an Influenza infection. These studies provide new knowledge about a host factor in the TLR7-mediated immune response through IAV infection and that may provide insights for the development of therapeutic interventions so permitted for our IAV infections.

Keywords: Cxcl1; RasGEF1b; TLR7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização após ativação do receptor TLR7.....	4
Figura 2: Número anual de óbitos causados por Influenza A (H1N1) registrados pelo Ministério da Saúde no Brasil.....	5
Figura 3: Regulação esquemática das proteínas Ras.....	8
Figura 4: Acompanhamento de peso e mortalidade em animais WT e <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre durante a infecção por IAV.....	22
Figura 5: Expressão <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre tratados com LPS.....	23
Figura 6: Expressão de <i>Tlr7</i> em BMDMs provenientes de camundongos WT e <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre tratados com R848 e GDQ.....	24
Figura 7: Análise da expressão de <i>Rasgef1b</i> , <i>Tlr7</i> e <i>PR8</i> 3 dpi.....	26
Figura 8: Análise da expressão de genes induzidos por IFNs 3 dpi.....	27
Figura 9: Expressão de citocinas inflamatórias 3 dpi.....	28
Figura 10: Expressão de quimiocinas 3 dpi.....	30
Figura 11: Expressão de um dos reguladores de <i>Cxcl1</i> , o <i>Setdb2</i> 3 dpi.....	31
Figura 12: Análise da concentração de quimiocinas, Il-6 e total de proteínas no BAL 3 dpi.....	32
Figura 13: Avaliação da expressão do mRNA de <i>PR8</i> , <i>Tnf-α</i> e <i>Cxcl1</i> e produção de KC/ <i>Cxcl1</i> 1 dpi.....	33
Figura 14: Produção de KC/ <i>Cxcl1</i> após 6 dpi.....	34
Figura 15: Contagem diferencial de células no período de 1 e 6 dpi.....	35
Figura 16: Perfil cinético da expressão de <i>Cxcl1</i> em BMDMs provenientes de animais WT e <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre.....	36
Figura 17: Efeito da deficiência de RasGEF1b sobre <i>Cxcl1</i> <i>in vitro</i>	37
Figura 18: Perfil de produção de KC/ <i>Cxcl1</i> em animais <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;CMV-cre.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Sequências dos oligonucleotídeos usados para RT-qPCR	18
--	----

ABREVIATURAS

ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
BMDMs	<i>Bone marrow derived macrophage</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Ccl2	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>
Ccl7	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>
CMV	<i>Citomegalovirus promoter</i>
Cxcl1	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
Cxcl10	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10</i>
Cxcl2	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotides</i>
DP	<i>Desvio padrão</i>
dpi	<i>Dia pós-infecção</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylene-diamine-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GEF	<i>Guanine Exchange factor</i>
Hes1	<i>Hes Family BHLH Transcription Factor 1</i>
IFITM1	<i>Interferon-induced transmembrane protein 1</i>
IFITM3	<i>Interferon-induced transmembrane protein 3</i>
IL-10	<i>Interleukin-10 cytokine</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β cytokine</i>
IL-6	<i>Interleukin-6 cytokine</i>
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer cell</i>
NLRs	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-NOD-like receptors</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR8	<i>A/PUERTO RICO/8/1934 H1N1</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RasGEF	<i>Ras associated GEF</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute culture medium</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error mean</i>
SETdb2	<i>SET Domain Bifurcated 2</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR7	<i>Toll-like receptor 7</i>
TLRs	<i>Toll-like receptos</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor cytokine</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
TTP	<i>Tristetraprolin</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
Vav-i	<i>Improved Vav-1 promoter</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
O sistema imune inato.....	12
Influenza (H1N1) e a resposta imune antiviral	16
Proteínas Ras e o membro 1b da família do domínio RasGEF, o RasGEF1b	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVO.....	22
Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA	23
Animais	23
Monitoramento dos genótipos dos animais.....	23
Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e tratamento com LPS e R848.....	24
Infecção viral ou instilação de R848.....	25
Obtenção de lavado broncoalveolar e análise da celularidade.....	26
ELISA	26
Ensaio de Bradford	27
Obtenção de RNA total.....	28
Síntese da primeira fita de cDNA	28
RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)	28
Tabela1: Sequências dos oligonucleotídeos usados para RT-qPCR	29
Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Camundongos <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre apresentam sobrevida aumentada durante a infecção com IAV	31
5.2 Expressão de TLR7 e TLR8 em macrófagos provenientes de camundongos <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre	33
5.4 Análise dos pulmões e lavado broncoalveolar após 3 dias de infecção.....	34
5.4 A expressão de <i>Cxcl1</i> é reduzida após 1 e 6 dias de infecção em camundongos <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre	41
5.6 A expressão de <i>Cxcl1</i> induzida através de TLR7 e TLR4 é prejudicada em BMDMs provenientes de camundongos <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;vav-icre	45
5.7 A produção de KC/ <i>Cxcl1</i> é reduzida na lesão pulmonar aguda induzida por R848 em camundongos <i>Rasgef1b^{fl/fl}</i> ;CMV-cre	47

6. DISCUSSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO I - Protocolo de aprovação CEUA	LI
ANEXO II - Artigo submetido	LII

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune inato

O sistema imune inato desempenha um importante papel na limitação rápida das infecções atuando em primeira linha na defesa do hospedeiro contra patógenos, proporcionando o retorno à homeostase e proteção à sobrevivência do organismo. Este sistema baseia-se em um conjunto diversificado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pathogen recognition receptors*) que são responsáveis por reconhecerem estruturas moleculares comuns a vários grupos de microorganismos, em conjunto conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*), assim como estruturas moleculares endógenas derivadas de células danificadas (DAMPs, do inglês *damage associated molecular pattern*) (Dowson *et al.*, 2017).

Exemplos de PAMPs incluem o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias assim como o RNA de dupla fita (dsRNA) e de fita simples (ssRNA), derivados do genoma viral ou da replicação viral. Como exemplos de DAMPs, há as proteínas liberadas por células danificadas ou mortas, provenientes do núcleo e citoplasma como HMGB1 ou provenientes somente do citoplasma como a proteína S100, proteínas de choque térmico provenientes de exossomos, da matriz extracelular como o ácido hialurônico e do sistema complemento como C3a, C4a e C5. Além disso, outros DAMPs não proteicos podem ser detectados durante um processo inflamatório como por exemplo moléculas de ATP, ácido úrico e sulfato de heparina (Tang *et al.*, 2012).

O reconhecimento dos ligantes pelos PRRs dispara uma rápida ativação de vias de sinalização intracelular que culminará na indução de mediadores inflamatórios. Esse processo dispara não só a ativação de respostas imediatas do hospedeiro, como a inflamação, mas também auxilia na montagem e orquestração da resposta imune adaptativa (Kawasaki e Kawai, 2014).

Entre as classes caracterizadas de PRRs estão os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*), receptores do tipo RIG-I (RLRs, do inglês *RIG-I-like receptors*), receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), receptores do tipo AIM2 (ALRs, do inglês *AIM2-like receptors*), receptores do tipo lectina C (CLRs, do inglês *C-type lectin receptors*) e

sensores citossólicos de DNA. Dentre esses, a família dos TLRs foi a primeira a ser identificada, e abrange os PRRs melhor caracterizados (Kawasaki e Kawai, 2014).

Os TLRs estão presentes em células residentes e imunes das superfícies corporais de interface hospedeiro-patógeno, como na pele e em mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital (Anwar *et al.*, 2013; Mifsud *et al.*, 2014).

Atualmente, são descritos 10 membros da família dos TLRs em humanos (TLR1-TLR10) e 12 em camundongos (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (Kawai e Akira, 2010). Os TLRs são glicoproteínas transmembrana do tipo I caracterizados por um domínio extracelular (ou luminal para os TLRs presentes em endossomos) contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine rich repeats*), responsável pelo reconhecimento de diversos PAMPs provenientes de bactérias, protozoários, fungos e vírus, assim como de alguns DAMPs, e um domínio intracelular ou citoplasmático homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, do inglês *Interleukin-1 receptor*) nomeado domínio receptor Toll/IL-1 (TIR, do inglês *Intracellular Toll- Interleukin1 (IL-1) receptor*), responsável pela ativação de vias de sinalização intracelular (Albiger *et al.*, 2007).

Os TLRs são encontrados na membrana plasmática, organelas ou vesículas intracelulares (Kawai e Akira, 2010). A sinalização celular disparada pela ativação dos TLRs se inicia quando um ligante (DAMP ou PAMP) é reconhecido por receptor específico. Os TLRs então recrutam proteínas adaptadoras tais como MyD88 e TRIF. Esse processo vai disparar vias de sinalização intracelular levando à ativação de fatores de transcrição centrais na resposta imune, como NF- κ B, AP-1 (do inglês, *activator protein 1*) e IRFs (do inglês *Interferon regulatory factor*). Uma vez ativados, esses fatores são translocados para o núcleo onde se ligam à região promotora e regulam a transcrição de genes inflamatórios que codificam citocinas, quimiocinas, interferons, entre outras várias moléculas, incluindo proteínas reguladoras intracelulares (Kahana e Cleveland, 1999; Kumar *et al.*, 2011; Takagi, 2011; Kawasaki e Kawai, 2014).

Como extensivamente revisado por Kawasaki e Kawai (2014), os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão localizados na superfície celular e reconhecem uma ampla gama de componentes de membrana derivados de agentes microbianos como lipídeos, lipoproteínas e proteínas, enquanto que TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 estão localizados em endossomos e reconhecem principalmente moléculas de ácidos nucleicos (Kawasaki e Kawai, 2014).

TLR7 e TLR8 humanos foram identificados em 2000 por Du e colaboradores como TLRs por apresentarem sequências ricas em leucina, similaridade esta, que tipifica os TLRs descritos até o momento. Nesse trabalho, os genes que codifica o TLR7 e o TLR8 foram mostrados como receptores codificados no cromossomo X, próximo ao Xp22 (Du X. *et al.*, 2000). Em humanos, TLR7 tem sua expressão predominante no pulmão, placenta e baço, já TLR8 é mais abundante no pulmão e leucócitos (Chuang e Ulevitch, 2000).

Dentre os receptores do tipo Toll responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos, o TLR7 e o TLR8 foram descritos ao mesmo tempo, por três equipes distintas, como receptores do tipo toll, capazes de reconhecer RNA de fita simples endossomais (ssRNA) (Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). A ativação de TLR7 murino e TLR7/8 humano induz a transdução de sinais via MyD88 (do inglês *Myeloid differentiation primary response protein 88*) que interage com IRAK1/4 (do inglês *IL-1R-associated kinase 1/4*) e TRAF6 (do inglês *receptor-associated fator 6*) formando um complexo MyD88/IRAK1/IRAK4/TRAF6. Em sequência, IRAK4 e TRAF6 se dissociam do complexo e interagem com a cinase IKK β (do inglês, *I κ B kinase*), resultando na ativação de NF- κ B (do inglês *nuclear fator kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Então, NF- κ B transloca para o núcleo e promove a transcrição de citocinas pró inflamatórias e outros genes essenciais na resposta imune (Fig. 1A) (Hemmi *et al.*, 2002; Akira *et al.*, 2001).

Por outro lado, o fator de transcrição IRF-7 (do inglês *IFN regulatory fator 7*), pode se ligar ao complexo MyD88/IRAK1/IRAK4 que requer TRAF3 (do inglês *receptor-associated fator 3*) para se unir à IRAK1 e interagir com IKK α (do inglês, *I κ α kinase*) resultando na ativação de IRF-7 (do inglês *IFN regulatory fator*) para promover a regulação de IFNs do tipo I (Fig. 1B) (Kawai *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013).

Mediadores expressos após ativação de MyD88 induzida através de TLR7, são responsáveis por limitar a replicação viral, dentre eles, o Interferon do tipo I é o mais predominante (Lund *et al.*, 2004).

TLR7 e TLR8 em humanos, são capazes de reconhecer ssRNA próprios e não próprios, além de agonistas sintéticos. Em camundongos, TLR8 é expresso, porém não é funcional devido a falta de 5 aminoácidos fundamentais para exercer sua função (Liu J 2010). Os TLRs são os principais receptores que reconhecem o vírus Influenza durante a infecção do trato respiratório (Van De Sandt Ce, 2012).

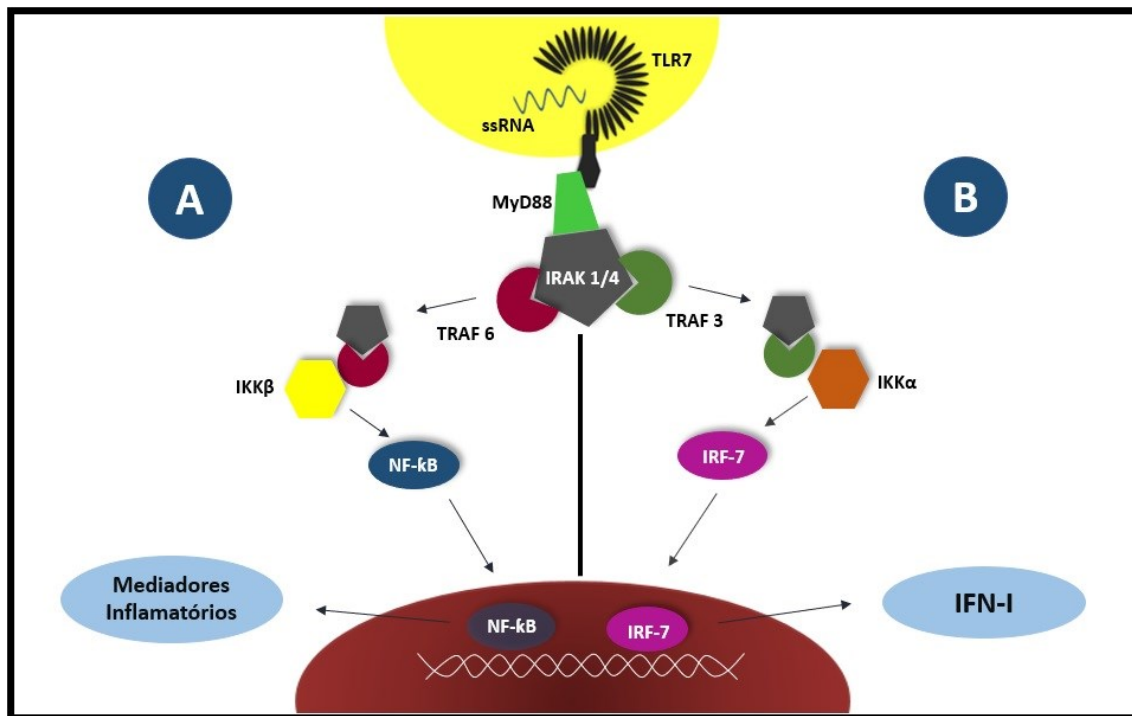


Figura 1: Vias de sinalização após a ativação do receptor TLR7. A ativação de TLR7 após o reconhecimento do RNA de fita simples induz a transdução de sinais via MyD88 que interage com IRAK1/4 e TRAF6 (A) ou TRAF3 (B). O complexo IRAK1/4 e TRAF se dissociam e interage com IKK α ou IKK β para ativar os fatores de transcrição IRF-7 ou NF- κ B respectivamente, que então translocam para o núcleo e promovem a transcrição de mediadores inflamatórios diversos.

Influenza (H1N1) e a resposta imune antiviral

A gripe sazonal ainda é um problema de saúde pública que resulta em 3 a 5 milhões de casos de doença grave e cerca de 250.000 a 500.000 mortes por ano em todo o mundo. Desde 1918 o vírus Influenza vem causando importantes pandemias. A mais recente delas, a Gripe Influenza (H1N1) de 2009 se propagou rapidamente pelo mundo e resultou em cerca de 18.449 óbitos até o ano de 2016 (WHO, 2016), sendo 2.060 somente no Brasil (Ministério da Saúde, 2017). Apesar da queda no número de óbitos após o início da vacinação, o Ministério da Saúde voltou a registrar um número elevado de óbitos em 2016 (Fig. 2).

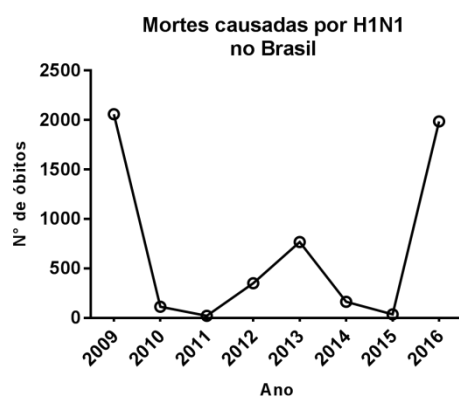


Figura 2: Número anual de óbitos causados por Influenza A (H1N1) registrados pelo Ministério da Saúde no Brasil.

O Influenza H1N1 é um vírus envelopado pertencente à família Orthomyxoviridae que incluem vírus com ssRNA de sentido negativo. Seu genoma é dividido em 8 segmentos e codifica pelo menos 10 proteínas (Wright *et al.*, 2013). A classificação dos diferentes subtipos de vírus se dá através de glicoproteínas localizadas na superfície viral conhecidas como hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Até o momento, foram identificados 18 subtipos de HA e 11 NA. Mutações nestas moléculas levam à diferenças antigênicas resultando em novas cepas circulantes, o que permitirá ao vírus escapar da resposta imunológica mediada por anticorpos formados em resposta à uma exposição anterior.

O Vírus Influenza A (H1N1) apresenta uma grande capacidade de se espalhar pelo trato respiratório inferior, o que é caracterizado como um elemento chave na fatalidade (Cole e Ho,

2017). A gravidade da doença está relacionada à fatores de virulência viral e à resposta excessiva ou desequilibrada do sistema imune (Buchweitz *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2014).

Após a infecção, o vírus é combatido primeiramente pelo muco que recobre o epitélio respiratório, o qual, muitas vezes não é suficiente para evitar a infecção. Quando ocorre a resistência viral à esta primeira barreira, os vírus se replicam nas células epiteliais do trato respiratório e a partir daí, invadem outras células não imunes ou imunes como os macrófagos e as células dendríticas (Iwasaki e Pillai, 2014). Durante a infecção, respostas imunes são acionadas no hospedeiro, o que pode levar à eliminação do patógeno e estabelecimento de uma imunidade de longa duração (Pommerenke *et al.*, 2012; Dudek *et al.*, 2016). A resposta imune inata de combate ao vírus se inicia após detecção do RNA viral pelos PRRs (Dudek *et al.*, 2016).

Em consequência do reconhecimento viral pelos PRRs, várias vias de sinalização são disparadas resultando na produção de mediadores como interferons do tipo I, citocinas e quimiocinas (Dudek *et al.*, 2016).

Uma das mais importantes respostas do hospedeiro durante as infecções virais é a produção de Interferons (IFNs) (Pommerenke *et al.*, 2012). Os IFNs são citocinas críticas que induzem um estado antiviral e interliga as respostas imunes inatas e adaptativas frente à uma infecção viral (Diebold *et al.*, 2004). Essas moléculas são expressas por células epiteliais das vias aéreas, macrófagos e células dendríticas convencionais e plasmocitóides (Cole e Ho, 2017) e tem um papel crítico no desencadeamento da proliferação de células tronco hematopoiéticas (Essers Ma, 2009).

Além da resposta inicial mediada por IFNs, citocinas inflamatórias e quimionas responsáveis pelo recrutamento de células de defesa são sintetizadas através da via de NF- κ B em prol da proteção do organismo contra o patógeno invasor. As primeiras células que migram para o sítio de infecção são os neutrófilos e então os monócitos, que atuam como primeira linha de defesa celular. Essas células são atraídas através da produção de quimiocinas a jusante da ativação de vias de sinalização inflamatória (Pulendran e Maddur, 2015).

Dentre as moléculas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, as quimiocinas Cxcl1 (KC), Cxcl2 (MIP2) e Cxcl5 (Lix) e o respectivo receptor CXCR2, são as principais atuantes no tecido infectado (Hornick Ee 2017).

Cxcl1 é produzida principalmente por macrófagos residentes e células epiteliais e circula através da corrente sanguínea orquestrando o recrutamento de neutrófilos da vasculatura para o local da infecção (Sawant *et al.*, 2015). KC/Cxcl1 é a nomenclatura dada à quimiocina recrutadora de neutrófilos em camundongos. KC/Cxcl1 em camundongos assim como seu homólogo humano CXCL1 ou GRO α , pertencem a uma família de quimiocinas CXC caracterizadas por conter um domínio glutamato-leucina-arginina altamente conservado além de um aminoácido entre os dois resíduos de cisteína N-terminais (Zlotnik, 2000).

A expressão dessa quimiocina é regulada por diversas moléculas, dentre elas, o fator de transcrição NF- κ B, sendo considerado o principal. A região promotora de *Cxcl1* apresenta 3 regiões sítio específicas para ligação de NF- κ B (Ohmori *et al.*, 1995). Estudos anteriores demonstraram que a transcrição do mRNA de *Cxcl1* através do tratamento com ácido okadaico em células JB6, um tipo de célula epidérmica murina, requer a ativação de 2 motivos NF- κ B dentre os 3 presentes na região promotora (Feng G., 2006).

Proteínas Ras e o membro 1b da família do domínio RasGEF, o RasGEF1b

As proteínas GTPases são enzimas hidrolíticas capazes de se ligar e hidrolisar GTP. As GTPases monoméricas do tipo Ras como Ras, Rap e Ral são ativadas por GEFs que apresentam um domínio Cdc25 carboxi-terminal que é conservado em organismos desde leveduras até os humanos (Crechet *et al.*, 1990).

A superfamília Ras é composta por mais de 159 proteínas, subdivididas em cinco famílias: Ras, Rho, Rab, Ran e Art (Wennerberg *et al.*, 2005). Essas proteínas estão envolvidas em variados mecanismos celulares como proliferação, diferenciação, progressão do ciclo celular, transporte vesicular e apoptose (Mitin *et al.*, 2005; Vigil *et al.*, 2010).

Proteínas Ras atuam como interruptores moleculares capazes de responder a diversos estímulos extracelulares tais como citocinas, hormônios e fatores de crescimento (Vojtek e Der, 1998). Sua ativação se dá em situações de stress celular, como infecções e isquemia, no qual, desencadeiam cascatas de sinalização que resultam na transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória (Zhang *et al.*, 2014).

O bloqueio de Ras através do tratamento com o ácido farnesiltiossalicílico, uma substância sintética antagonista de Ras, tem sido associado à atenuação de doenças autoimune, renais e lesão pulmonar (Kafri *et al.*, 2005; Clarke, 2003; Zhang *et al.*, 2014).

A regulação de Ras se dá através da associação à fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEF do inglês *guanine nucleotide exchange factors*) e as proteínas ativadoras de GTPases (GAP do inglês *GTPase activating proteins*). De modo geral, as proteínas Ras encontram-se inativas quando ligadas à GDP, e sua ativação atrela-se à ligação de um GTP. Para que ocorra essa troca de GDP por GTP, é necessário que um GEF catalise a remoção do GDP, possibilitando a ligação espontânea de um GTP, a qual, está dez vezes mais concentrada no citoplasma em relação à GDP. Em contrapartida, a inativação de Ras é controlada por GAP, que acelera a hidrólise de GTP pela Ras (Bos *et al.*, 2007) (Fig 2).

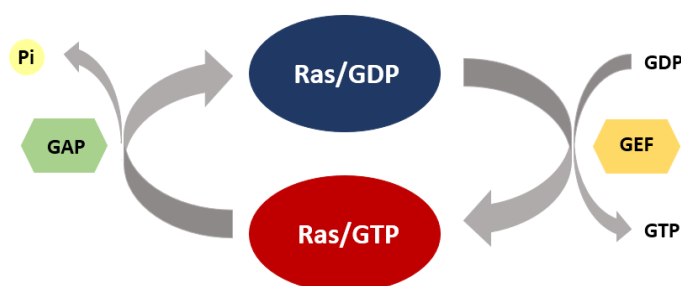


Figura 3: Regulação esquemática das proteínas Ras. A ativação dos fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs) induz a ativação da proteína Ras através da troca de GDP por GTP. A proteína Ras ativada é então regulada pela proteína ativadora de GTPase (GAP), que potencializa a atividade de Ras acelerando a hidrólise de GTP e tornando-a inativa, ligada ao GDP.

Os estudos relacionados aos GEFs são extremamente relevantes devido ao fato dessas proteínas serem capazes de ativar proteínas G e modular importantes vias de sinalização (Vigil *et al.*, 2010).

Os GEFs que possuem o domínio CDC25 regulam exclusivamente a família Ras. Por estarem associados à GTPases do tipo Ras, esses GEFs são enquadrados como RasGEFs (Broek *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1987).

A família do domínio RasGEF compreende vários membros, dentre eles o RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c (Gloerich e Bos, 2011) e apresentam um domínio RasGEF-N semelhante a Cdc25 e o domínio carboxi-terminal catalítico Cdc25 (Epting *et al.* 2007). Embora os estudos com os membros dessa família estejam ainda pouco registrados, o membro 1b parece ser o mais estudado. RasGEF1b é expresso em vários organismos, em diferentes tecidos, e em condições fisiológicas normais e patológicas (Ferreira *et al.*, 2002; Epting *et al.* 2007; Andrade *et al.* 2010).

RasGEF1b foi originalmente identificado como um GEF de expressão induzida em macrófagos estimulados com agonistas de TLRs e em órgãos de camundongos infectados com o agente causador da doença de Chagas, o *T.cruzi* (Ferreira *et al.*, 2002). De maneira interessante, a expressão do RasGEF1b não está restrita apenas a macrófagos ativados. Clones de células Th1 e Th2 murinas ativadas com mitógeno também expressam níveis elevados de seu mRNA, suscitando a idéia que a expressão do gene ocorre durante estágios de ativação de macrófagos e linfócitos T na resposta imune. Demonstramos posteriormente que a expressão de RasGEF1b induzida durante a infecção por *T.cruzi* ou *Plasmodium chabaudi* em camundongos é dependente das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, assim como da citocina IFN-gama (Andrade *et al.*, 2010). Ainda neste contexto, um recente estudo demonstrou que o RNA circular de RasGEF1b regula positivamente a expressão da molécula de adesão Icam-1 em macrófagos ativados com LPS (Ng *et al.*, 2016).

1. JUSTIFICATIVA

A gravidade das infecções pelo vírus Influenza está relacionada tanto aos fatores de virulência viral quanto àqueles ligados ao hospedeiro. Assim, células de origem hematopoiética implicadas na resposta imune desempenham um importante papel na resposta ao vírus. A ativação do receptor TLR7 e a consequente produção de citocinas, quimiocinas e moléculas sinalizadoras intracelulares são cruciais para a resposta imune antiviral. No entanto, ainda não está completamente esclarecido os mecanismos envolvidos na resposta imune contra o vírus Influenza.

Trabalhos voltados para a análise da função de RasGEF1b acumulam evidências sugerindo que esse GEF está associado à resposta imune inata mediada por receptores do tipo-Toll. Ferreira *et al.* (2002) e Andrade *et al.* (2010) mostraram que *Rasgef1b* tem sua expressão aumentada tanto *in vitro* quanto *in vivo* durante a resposta imune inata mediada por TLRs. Além dos fatos citados, estudos de expressão gênica realizados em BMDMs deficientes de RasGEF1b, estimulados com agonistas de TLR4, mostraram uma expressão elevada de TLR7 e TLR8. Em conjunto, esses dados sugerem um importante papel de RasGEF1b na resposta imune. Assim, considerando a expressão elevada de TLR7 e TLR8 após ativação de TLR4, consideramos relevante a investigação do papel de RasGEF1b em um modelo inflamatório ativado via TLR7.

2. OBJETIVO

Avaliar o papel do fator RasGEF1b sobre a expressão de Cxcl1 na resposta imune disparada por TLR7 durante a infecção por Influenza H1N1.

Objetivos específicos

- 1) Monitorar o peso e sobrevida dos animais C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre após infecção com o vírus influenza A/PR8/34.
- 2) Avaliar os níveis do mRNA de *Rasgef1b*, *Tlr7*, citocinas e quimiocinas em animais C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre infectados com influenza A/PR8/34.
- 3) Avaliar os níveis do mRNA de *Rasgef1b*, *Tlr7*, citocinas e quimiocinas em BMDMs provenientes de C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre estimulados com LPS e R848.
- 4) Avaliar a concentração global de proteínas, citocinas e quimiocinas no lavado broncoalveolar de animais C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre infectados ou não com influenza.
- 5) Quantificar citocinas e quimiocinas no sobrenadante de BMDMs estimulados ou não com LPS ou R848, provenientes de animais C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre.
- 6) Avaliar a porcentagem de células mononucleares e polimorfonucleares no lavado broncoalveolar de animais infectados ou não com IAV.
- 7) Quantificar KC/Cxcl1 e TNF- α no lavado broncoaveolar de animais C57/BL6 e *Rasgef1b*^{fl/fl};CMV-cre estimulados com R848.

3. METODOLOGIA

Animais

Camundongos C57/BL6 (WT *wild type*) foram obtidos do Centro de Bioterismo do ICB (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Camundongos com deleção condicional de RasGEF1b em células germinativas e somáticas (*Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre, abreviados RasGEF1b-KO) foram gerados por Silva *et al.*, (2018) (Silva A.M., 2018). Camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;Vav-icre foram gerados na University of Massachuessets Medical School (UMMS), USA, através do cruzamento de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}* com camundongos transgênicos que expressam a recombinase Cre regulada pelo promotor de *Vav1* [B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J, Jackson Laboratories, USA] (De Boer *et al.*, 2003). Os camundongos transgênicos condicionais são mantidos no biotério do Laboratório das Interações Celulares, ICB/UFMG, sob a coordenação do Prof. Rodolfo Giunchetti. Os animais permaneceram em minisoladores de polisulfona, em ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração autoclavada ou irradiada, *ad libitum*. Os camundongos foram pareados de acordo com a idade (entre 8-12 semanas), sexo e peso durante os experimentos. Os procedimentos experimentais *in vivo* para este trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal da UFMG (Certificado CEUA nº47/2017).

Monitoramento dos genótipos dos animais

Os camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre e RasGEF1b-KO tiveram o monitoramento frequente quanto aos seus genótipos através de PCR a partir de DNA genômico obtido da cauda dos animais. Brevemente, para a obtenção do DNA foi realizada digestão de um pequeno fragmento da cauda (2-5 mm) em tampão de digestão (5mM EDTA, pH 8,0; 200 mM NaCl; 100mM Tris, pH 8,0; 0,2% SDS; 0,4 mg/mL de proteinase K, LGC Biotecnologia). Após incubação *overnight* à 55°C, a proteinase K foi inativada à 85°C por 15 min, seguido de centrifugação (16.000 xg, 15 min). A fase aquosa foi então submetida à precipitação com isopropanol (Sigma-Aldrich) e centrifugação (16.000 xg, 10 min) para obtenção do sedimento de DNA. Em seguida o sedimento foi lavado em etanol 70% (Sigma-Aldrich), centrifugado a 16.000 x g por 5 min e por fim solubilizado em água livre de DNase à 55°C por 2h. Para a

confirmação da presença de alelos *loxP* foram utilizados, por reação de PCR, 2pmol dos oligonucleotídeos P3: 5'-GTATTTGGGCAGCATGTATGTC-3' e P4: 5'-AGGTGTGTAAATGGCCACTGAG 3' que amplificam um fragmento de 454-pb. Um fragmento de 320-pb e 1878-pb são amplificados a partir de alelos WT e *loxP* respectivamente. Para a detecção de alelos recombinados foram utilizados os iniciadores P1 5'-CCAAGAGCAGAGTGAAACATGC-3' e P4: 5'-AGGTGTGTAAATGGCCACTGAG-3', que amplificam um fragmento de 317-pb. Fragmentos de 1466-pb são amplificados a partir de alelos WT. As reações continham tampão PCR Buffer 10 (Phoneutria), 1,5 mM de MgCl₂ (Phoneutria), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen) e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As reações foram incubadas no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad), com as seguintes condições termocíclicas: desnaturação à 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 2 min 15 s e extensão final de 3 min a 72°C. Os fragmentos amplificados eram submetidos ao fracionamento em gel de agarose 1,5%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich). Os géis foram visualizados em transluminador de luz UV (L-Pix, Loccus Biotecnologia) e as imagens capturadas através do software L Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e tratamento com LPS e R848

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 e knock-outs condicionais. Os animais foram eutanasiados e os fêmures e tíbias cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia,) e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células da medula foram removidas e transferidas para um tubo de polipropileno estéril. Para a diferenciação a macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), as células da medula óssea foram ressuspensas em meio de diferenciação contendo 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% soro fetal bovino (Gibco - USA), 2 mM de glutamina (Gibco), 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica (Gibco) e 30% de sobrenadante de cultura de células L929. O sobrenadante de células L929 contém quantidade significativa de M-CSF que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos. A suspensão de células era plaqueada em placas de superfície não tratada (placas de Petri

100x15mm, Prolab) e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 7 dias. O meio de diferenciação foi renovado a cada 48 horas. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminação dos *debris* e das células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA gelado à placa, seguido de recuperação das células por meio de ressuspensão com PBS/EDTA sobre o fundo da placa. Após a remoção das células aderidas na placa, já diferenciadas a BMDMs, as mesmas foram transferidas para tubo de polipropileno estéril. Os BMDMs foram centrifugados a 200 x g / 10 min a 4°C e ressuspensos em meio contendo 10 mL de meio RPMI 1640, 10% SFB, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929. As células foram contadas e plaqueadas em placas de cultura de 6 poços, seguido de incubação em estufa a 37°C, atmosfera a 5% CO₂. Após 24 horas, as células foram estimuladas com LPS O55:B5 (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich) ou R848 (1 µM) (S28463, MedChemExpress, USA).

Infecção viral ou instilação de R848

Os camundongos foram anestesiados por via intra-peritoneal (IP) com uma mistura de quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg. O anestésico (volume máximo 30 µl) foi injetado na cavidade peritoneal, na metade posterior do abdômen com o animal contido pelo dorso. O tamanho das agulhas utilizado foi de 13 x 0,33 mm. A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia). Após a avaliação da anestesia, os camundongos foram submetidos à instilação nasal com 10⁴ unidades formadoras de placa (PFU) do vírus influenza selvagem A/PR8/34 (PR8), em 20 µl de PBS ou 50µg de R848 em 25µl de DMSO ou ainda, com PBS apenas (grupo controle). O vírus PR8 utilizado neste estudo, foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, pesquisador do laboratório de Imunopatologia do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-MG).

Obtenção de lavado broncoalveolar e análise da celularidade

Ao final de 1, 3 ou 6 dias pós-infecção, ou 4 horas pós-instilação de R848 os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina 100mg/kg e xilazina 10mg/kg, via intraperitoneal (volume máximo 200µl), conforme descrito anteriormente. Após eutanásia por overdose de tiopental, os animais foram dissecados para exposição da traqueia. Os pulmões foram lavados 3 vezes com PBS (1mL por vez), com auxílio de um cateter (GxøxL: 20 x 1.1 x 32mm) inserido diretamente na traqueia. O lavado broncoalveolar foi coletado em tubo de centrífuga de 15mL e centrifugados a 200 x g por 10 min a 4° C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e congelado à -80°C. As células foram ressuspensas em 100µl de BSA 3%, e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, realizamos a centrifugação das células em uma diluição contendo 80µl de suspensão celular e 20µl de BSA 3%. Os cassetes de cytopspin contendo a suspensão foram centrifugados à 100 x g por 5 min e as lâminas foram dispostas à temperatura ambiente para secagem. Após secagem, as lâminas foram coradas pelo método de panótico rápido (LB – laborclin) conforme protocolo de coloração sugerido pelo fabricante. A contagem diferencial foi realizada em seguida através de microscópio óptico.

ELISA

O ensaio de ELISA para as citocinas (Tnf e Il6) e quimiocinas (KC/Cxcl1 e Mip2/Cxcl2) planejados para este estudo, foram realizados conforme orientações do fabricante (R&D System), com modificações como segue: foram transferidos 50µL/poço do anticorpo de captura (diluído na concentração recomendada pelo fabricante) para uma placa de ELISA (Maxisorp®, Nunc). A placa foi selada e incubada por 16-18 horas à temperatura ambiente (TA). Após desprezar o anticorpo de captura, os poços da placa foram lavados com tampão de lavagem, repetindo o processo no mínimo 3 vezes. Em seguida, foi realizado o bloqueio da placa, adicionando 300µL de tampão de bloqueio e incubado à TA por um período mínimo de 1 hora. Após desprezar o tampão de bloqueio, os poços foram lavados (como descrito anteriormente) e a eles foram acrescentados 50µL de BAL, seguido de incubação por 2 horas à TA. Após descarte dos sobrenadantes, cada poço foi lavado com tampão de lavagem como já descrito. Cinquenta microlitros do anticorpo de detecção biotinizado diluído foram adicionados, e a placa incubada por 2 horas à TA. Após descarte, cada poço foi lavado com tampão de lavagem, como já descrito. Após adicionar 50µL da estreptavidina-HRP (R&D Systems) diluída em cada poço,

a placa foi protegida da luz e incubada durante 20 minutos, à TA. Finalmente, cada poço teve seu volume desprezado e lavado com tampão de lavagem, e então, adicionados 50µL da solução substrato TMB (R&D Systems) a cada poço e a placa incubada durante 20-30 minutos à TA. Cinquenta microlitros de solução *stop* (ácido sulfúrico 2N) foram adicionados a cada poço e em seguida, foi realizada a leitura a 450nm em leitor de microplacas (Multiskan FC, ThermoScientific).

Ensaio de Bradford

Para a análise da concentração total de proteínas no BAL de camundongos infectados ou tratados com R848, foi realizado o ensaio de Bradford conforme instruções do fabricante (BioRad). A determinação da curva padrão foi feita através da diluição seriada de BSA à 1mg/ml em H₂O Milli-Q em placa de 96 poços. 10µL de cada amostra de lavado broncoalveolar foi acrescido de 190µL de reagente de Bradford. A reação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e a absorbância, medida imediatamente após o término do tempo estabelecido em espectrofotômetro à 595nm. A concentração das proteínas foram determinadas à partir da curva padrão de BSA.

Obtenção de RNA total

O pulmão direito dos animais infectados e animais controles (PBS) foram coletados em tubos de 2mL logo após a coleta do BAL, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para a extração do RNA total, os órgãos foram retirados do freezer -80°C e imediatamente, foram adicionados 1 ml de Trizol (Ambion) para cada 50-100mg de tecido seguido de processamento das amostras com o auxílio de homogeneizador (*Tissue Master 125, Omni International*). A extração então foi realizada conforme descrição do fabricante. Ao final, o RNA foi solubilizado por ressuspensão em água DEPC (Invitrogen) com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida as amostras foram incubadas à 55°C durante 10 minutos e posteriormente estocadas a -80°C. Para a quantificação do RNA total, 2µL de cada amostra foi lida em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

Síntese da primeira fita de cDNA

Quinhentos nanogramas de RNA total de cada amostra foi adicionado à uma mistura contendo: 0,5µg de oligo-dT₁₈ (IDT DNA Technologies), uma mistura de dNTPs (dATP; dCTP; dGTP; dTTP) (Invitrogen) 10mM e água DEPC. Após incubação a 65°C durante 5 minutos e 2 minutos em gelo, foram adicionados 11µL de um mix contendo 4µL de tampão *First strand buffer* (Invitrogen), 2µL de DTT 0.1 M (Invitrogen), e 1µL (200U) da enzima transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen) e 4 µL de água DEPC. Esta mistura foi incubada à 37°C por 50 minutos para obtenção do cDNA e posteriormente a 70°C durante 15 minutos para inativação da MMLV-RT.

RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

Para análise dos níveis de mRNA assim como do gene referência utilizado com normalizador, *Rpl32*, 2µL de uma diluição 1:10 da reação da primeira fita de cDNA foi utilizado como DNA molde para a reação de RT-qPCR. A reação foi preparada em um volume final de 10 µL de solução contendo 5µL de SYBR Green 2x (SsoAdvanced universal SYBR Green supermix, BioRad), 1µL de cada iniciador a 10µM (*forward* e *reverse*) específicos do gene alvo a ser amplificado (Tabela 2), e 1 µL de H₂O livre de RNase. A reação foi montada em placa de

96 poços (PCR[®] Microplate, Axygen). Esta foi então selada, vortexada e brevemente centrifugada por 1 minuto a 1000 x g antes de ser transferida para o termociclador de tempo real (CFX96[™]Real-Time System, BioRad). As condições termocíclicas foram programadas de acordo com o protocolo de ciclagem recomendado pelo fabricante do kit (BioRad): desnaturação inicial a 95°C durante 30 segundos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. Ao final dos ciclos, foi incluído um passo adicional para determinar as curvas de dissociação. A abundância relativa do mRNA foi analisado através da equação $2^{-\Delta C_t}$, no qual C_t é igual ao valor do C_t menos o gene referência (*Rpl32*). Os valores obtidos foram transferidos para o programa GraphPad Prism 7 para plotagem gráfica e análises estatísticas.

Tabela1: Sequências dos oligonucleotídeos usados para RT-qPCR

Gene	Forward Primer (5'→ 3')	Reverse Primer (5'→ 3')
<i>Rasgef1b</i>	CTTGGAGGCGTACGTAGAATG	CTCGAGCCACATCGATGAAATA
<i>PR8</i>	CGGTCCAAATTCCTGCTGA	CATTGGGTTTCCTTCCATCCA
<i>Tlr7</i>	CACCACCAATCTTACCCCTTACC	CAGATGGTTCAGCCTACGGAA
<i>Tlr8</i>	GCCAAACAACAGCACCCAAAT	AGGCAACCCAGCAGGTATAGT
<i>Setdb2</i>	GGATGGAGCTACAAGATGATGG	CCAGTGTTTGC GTGTTACTCAG
<i>Irf7</i>	CTGGAGCCATGGGTATGCA	AAGCACAAGCCGAGACTGCT
<i>Il6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Il-1b</i>	GTGGCTGTGGAGAAGCTGTG	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>Tnf</i>	ACAGAAAGCATGATCCGCG	GCCCCCATCTTTTGGG
<i>Ifitm1</i>	GACAGCCACCACAATCAACAT	CCCAGGCAGCAGAAGTTCAT
<i>Ifitm3</i>	CCCCCAAACCTACGAAAGAATCA	ACCATCTTCCGATCCCTAGAC
<i>Ccl2</i>	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
<i>Ccl7</i>	CCACATGCTATGTCAAGA	ACACCGACTACTGGTGATCCT
<i>Cxcl1</i>	ACTGCACCCAAACCGAAGTC	TGGGGACACCTTTTAGCATCTT
<i>Cxcl10</i>	CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	GGCTCGCAGGGATGATTTCAA
<i>Cxcl2</i>	CCAACCACCAGGCTACAGG	GCGTCACACTCAAGCTCTG
<i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Il1rn</i>	TAGACATGGTGCCTATTGACCT	TCGTGACTATAAGGGGCTCTTC
<i>Rpl32</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG	TGACTGGTGCCTGATGAACT

Análises estatísticas

O teste T de Student foi usado para analisar a significância de diferenças das médias entre os grupos experimentais. Curvas de sobrevivência foram geradas pelo método de Kaplan-Meier, sendo que a significância das diferenças foi calculada pelo teste de log-Rank.

4. RESULTADOS

5.1 Camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre apresentam sobrevida aumentada durante a infecção com IAV

Em estudos de expressão gênica conduzidos em macrófagos deficientes de RasGEF1b (Silva, 2018 – submetido (anexo)), foi observada expressão elevada de *Tlr7* e *Tlr8* nos macrófagos nocautes tratados com LPS. Assim, decidimos estender essas observações para estudos *in vivo* ao investigar se RasGEF1b desempenha um papel no contexto da infecção causada por vírus de RNA de fita simples, e suas consequências biológicas em modelo experimental em camundongos. Para isso nós utilizamos modelos de infecção pelo vírus Influenza H1N1 em que os TLRs desempenham o papel crítico na resposta imune.

Inicialmente, foram realizados experimentos independentes em que monitoramos a perda de peso, sendo este o principal sintoma clínico no modelo escolhido, e a mortalidade dos animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre. A infecção foi realizada por via intranasal em uma dose sub-letal (LD50) de IAV (1×10^4 PFU) e os animais foram diariamente pesados nas mesmas condições como horário, local e balança.

De acordo com Barbosa *et al.* (2014), a dose de 10^5 PFU do vírus A/PR8/34 leva a 75% de mortalidade dos animais C57/BL6 7 dias após a infecção pelo vírus PR8 e cerca de 25% de perda do peso no décimo dia (Barbosa *et al.*, 2014). Já a dose de 10^3 PFU do vírus A/PR8/34, não apresenta risco de morte para os animais C57/BL6, além disso, essa dose não influencia na perda de peso (Oliveira *et al.*, 2017). Garcia *et al.* (2013) utilizaram uma dose de 10^4 PFU do vírus influenza A/WSN/33 que manteve 100% dos animais vivos (C57/BL6) até o décimo dia após a infecção, onde iniciou os registros de morte (Garcia *et al.*, 2013). Considerando que o objetivo deste estudo foi avaliar o papel de RasGEF1b sobre a expressão de *Cxcl1*, quimiocina produzida nos estágios iniciais da infecção, optamos por utilizar a dose intermediária às doses aqui relatadas, com o qual poderíamos provocar um processo inflamatório acentuado sem necessariamente, provocar a morte dos animais.

A princípio, a infecção foi realizada em grupos compostos por 6 animais fêmeas WT e 7 animais fêmeas *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre (Fig. 4A). A perda de peso mostrou-se cineticamente semelhante entre os grupos. Ao avaliar a mortalidade, os animais *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre

apresentaram uma maior sobrevida e notável capacidade de recuperação de peso frente à infecção.

Para confirmar esse dado, um novo experimento de infecção foi realizado, desta vez, em grupos compostos por 9 camundongos WT machos e 8 animais *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre machos. Corroborando observações anteriores, a sobrevida dos animais foram significativamente aumentada nos camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre durante a infecção por influenza A H1N1 (Fig. 4B).

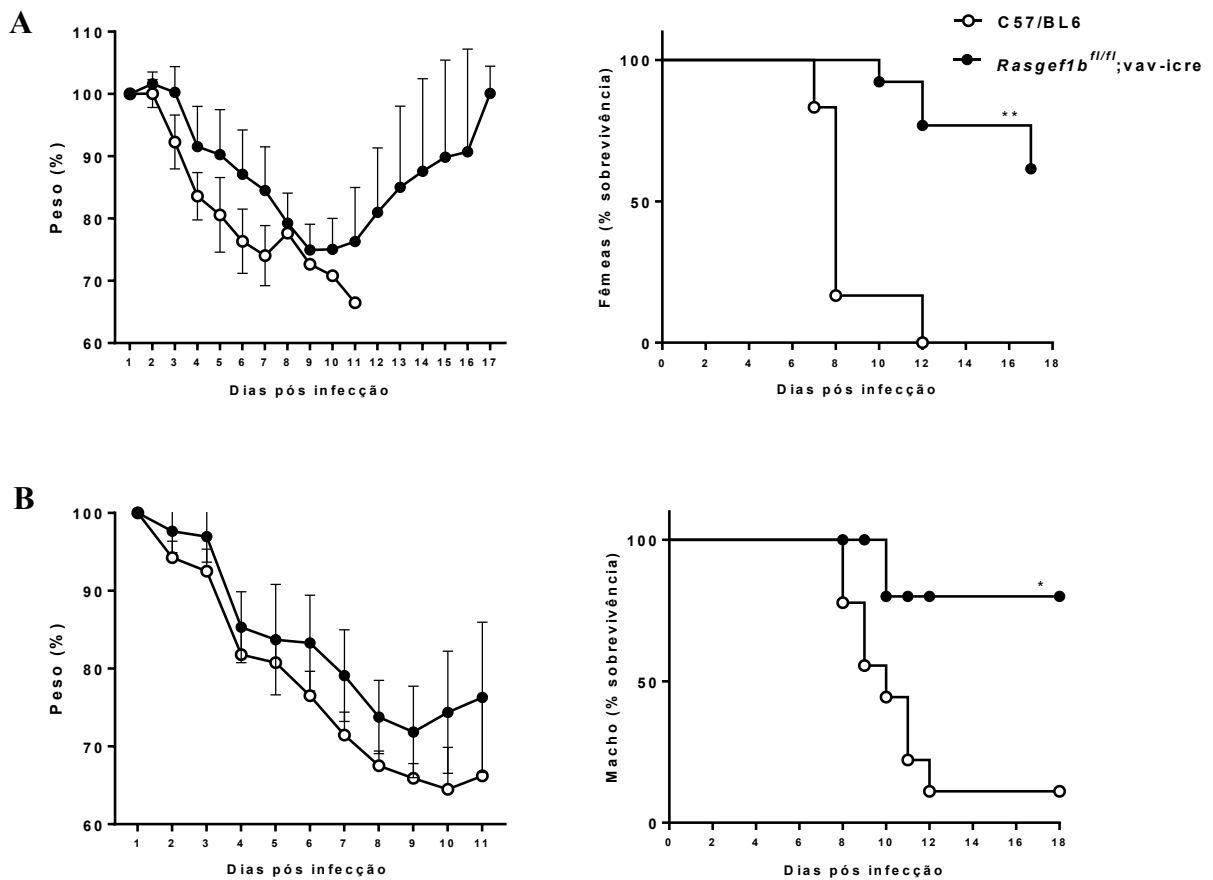


Figura 4: Acompanhamento de peso e mortalidade em animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre durante a infecção por IAV. Camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre com idade entre 8 e 12 semanas, foram infectados com 1×10^4 PFU do vírus H1N1 A/PR8/34 e monitorados por até 18 dias. (A) e (B) experimentos independentes para registro de peso e mortalidade dos animais. ** e * indicam diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre ($p=0.0021$ e $p=0.0146$ respectivamente) conforme determinado pelo T-test. Os resultados de peso foram traçados como média $\pm$ DP.

5.2 Expressão de TLR7 e TLR8 em macrófagos provenientes de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*

Objetivando confirmar os dados de expressão vistos em estudos anteriores, culturas de BMDMs obtidas de camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, foram estimuladas com LPS na concentração 100ng/ml por 9 horas, seguido de análise quantitativa dos níveis de mRNA de *Rasgef1b*, *Tlr7* e *Tlr8* em experimento de RT-qPCR. Inesperadamente, não observamos

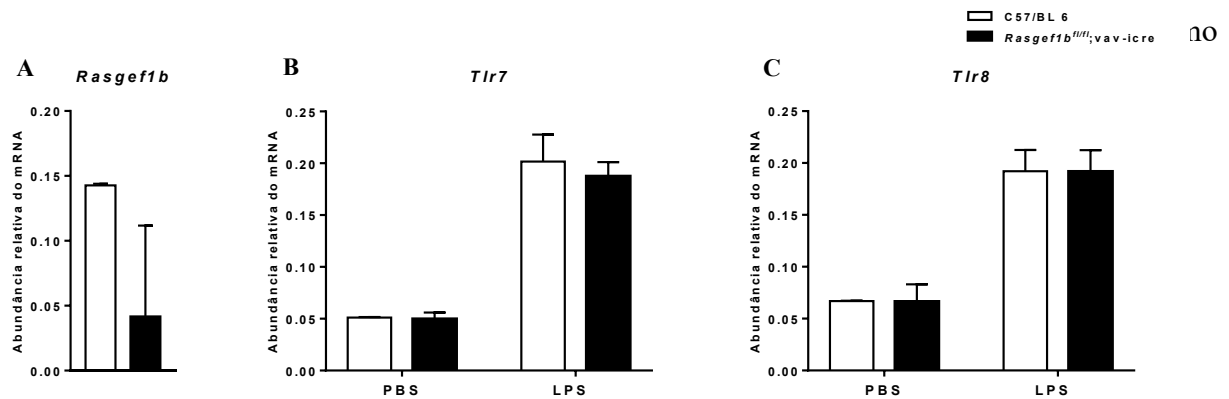


Figura 5: Expressão *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* tratados com LPS. Culturas de BMDMs derivados de animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* foram tratadas com 100ng/ml de LPS por 9 horas. A expressão do mRNA de *Rasgef1b* (A), *Tlr7* (B) e *Tlr8* (C) foi analisada por RT-qPCR. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta Ct}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Para avaliar a função de TLR7 em macrófagos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, estímulos com dois diferentes agonistas deste receptor foram realizados. Resiquimod (R848) e gardquimod (GDQ) nas concentrações 1 μ M e 1 μ g/ml respectivamente, foram adicionados à cultura, e 4 horas após o estímulo, a expressão de *Tlr7* foi analisada por RT-qPCR. Como observado na figura 5, os níveis de *Tlr7* foram similares entre os macrófagos WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, demonstrando que BMDMs provenientes de *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* não apresentam alterações quanto à expressão de *Tlr7* quando comparado com macrófagos WT (Fig. 6).

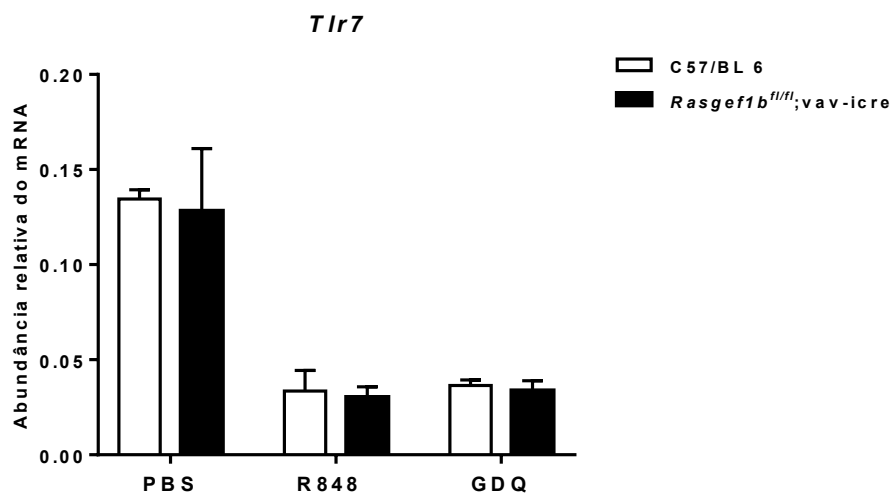


Figura 6: Expressão de *Tlr7* em BMDMs provenientes de camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* tratados com R848 e GDQ. Culturas de BMDMs derivados de animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* foram tratadas com 1μM de resiquimod (R848) ou 1μg/ml gardiquimod (GDQ) por 4 horas. A expressão do mRNA de *Tlr7* foi analisada por RT-qPCR. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Em conjunto, esses dados sugerem que a proteção proporcionada aos camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* infectados com influenza, não está relacionada à expressão alterada de *Tlr7* observada em estudos anteriores, em macrófagos provenientes de animais *Rasgef1b^{fl/fl};CMV-cre* tratados com LPS.

5.4 Análise dos pulmões e lavado broncoalveolar após 3 dias de infecção

Para compreender o fenótipo de baixa mortalidade dos camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* mostrados na figura 4, optamos por avaliar e comparar a expressão de genes inflamatórios críticos que estão implicados na resposta imune ao IAV, assim como a expressão de PR8 nos pulmões dos camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

Para tanto, os animais foram anestesiados e infectados via intranasal com 1×10^4 PFU do vírus H1N1 A/PR8/34 em 25μl de PBS (PR8) ou 25μl de PBS apenas (PBS), e três dias pós infecção (dpi), foram obtidos os pulmões e o lavado broncoalveolar (BAL).

Os pulmões direito foram utilizados para análise da expressão viral e de genes implicados na resposta imune ao vírus, através do RNA total e análise por RT-qPCR da abundância relativa do mRNA. O BAL foi utilizado para a análise da produção de citocinas e quimiocinas.

O tempo para avaliação da resposta imune foi determinado com base nos registros iniciais de morte observado nos experimentos de acompanhamento de mortalidade. Decidimos examinar os pulmões após 3 dias de infecção por se tratar de um tempo intermediário entre a infecção e início de registro de mortes.

Previamente, avaliamos a expressão de *Rasgef1b* nos pulmões dos animais e, apesar da deleção condicional desta proteína em células hematopoiéticas, *Rasgef1b* foi igualmente detectado nos pulmões dos dois grupos (Fig. 7A). Isso pode ser explicado pela presença de células de origem não hematopoiética no tecido analisado. Ademais, o resultado da PCR para amplificação de DNA genômico conduzida a partir de amostras de cauda e pulmão, fornecem evidências que há recombinação gênica dos alelos *Rasgef1b^{fl/fl}* nos camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

Também, verificamos os níveis de mRNA de *Tlr7* in vivo, e os resultados mostram que a expressão de *Tlr7* é similar entre os animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* (Fig. 7B).

Ao avaliar a presença do vírus PR8, medida através dos níveis do mRNA da polimerase A, observamos que os animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* apresentaram expressão viral mais elevada quando comparado aos animais do tipo selvagem (Fig. 7C). No entanto, essa diferença não apresentou significância estatística ($p = 0.2268$). Esses dados demonstram que camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* não apresentam um fenótipo sobre o controle da replicação viral, indicando que a maior sobrevida dos animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* possa estar relacionada à resposta imune mediada por moléculas envolvidas no processo inflamatório.

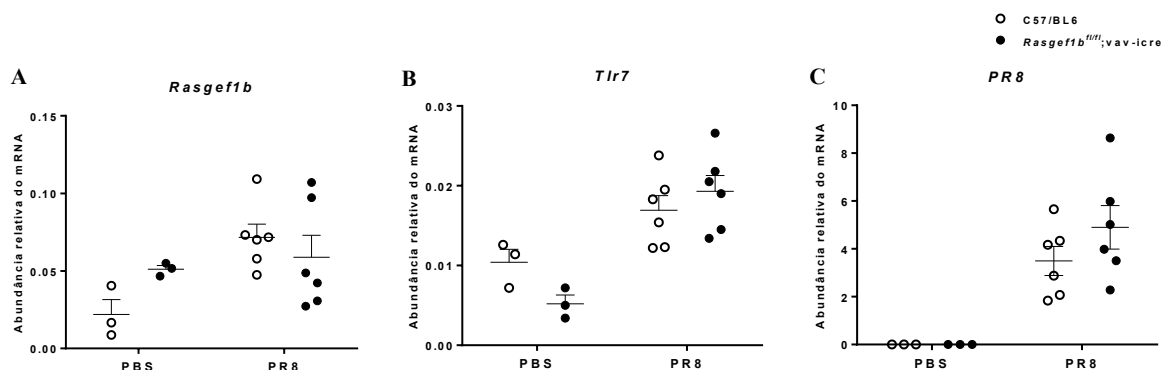


Figura 7: Análise da expressão de *Rasgef1b*, *Tlr7* e *PR8* 3 dpi. Os animais foram anestesiados e estimulados via intranasal com 1×10^4 PFU do vírus H1N1 A/PR8/34 em 20 μ l de PBS (PR8) ou 20 μ l de PBS apenas (PBS), e três dpi, foram obtidos os pulmões direito para avaliar a abundância relativa do mRNA de *Rasgef1b* (A), *Tlr7* (B) e *PR8* (C) através de RT-qPCR. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Em seguida, analisamos a expressão de genes que codificam citocinas, quimiocinas, DAMPs, TLRs e de genes induzidos por IFNs, cujos níveis que se encontram alterados na resposta inflamatória causada por IAV corroboram seus potenciais papéis nesse contexto (Oslund *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2015).

Os IFNs induzem a produção de genes conhecidos como genes estimulados por Interferons (ISGs) (Lund *et al.*, 2004). Dentre os ISGs, analisamos a expressão dos membros da família transmembrana induzidos por interferon, IFITM1 e IFITM3 e do fator 7 de regulação de interferon (IRF7) que além de ser induzido por IFN-I, também atua na amplificação da expressão de IFN-I (Chen *et al.*, 2013). Assim como NF- κ B, IRF7 é ativado através da sinalização de TLR7/MyD88. Enquanto NF- κ B ativa a produção de citocinas inflamatórias, IRF7 ativa a produção de IFNs (Hemmi *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2004; Iwasaki e Pillai, 2014). Já os IFITMs, são importantes moléculas induzidas durante a IAV, reconhecidos por inibirem a infecção viral através da interferência na fusão vírus-endossomo e restrição da saída de IAV presentes nos endossomos, através do bloqueio da formação de poros de fusão (Brass *et al.*, 2009).

Apesar da tendência de uma expressão elevada de *Ifitm3* e *Irf7* nos pulmões de animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* infectados, tal diferença observada entre os grupos infectados não é suportada estatisticamente ($p = 0.2053$ e $p = 0.0880$ respectivamente) (Fig. 8B e C).

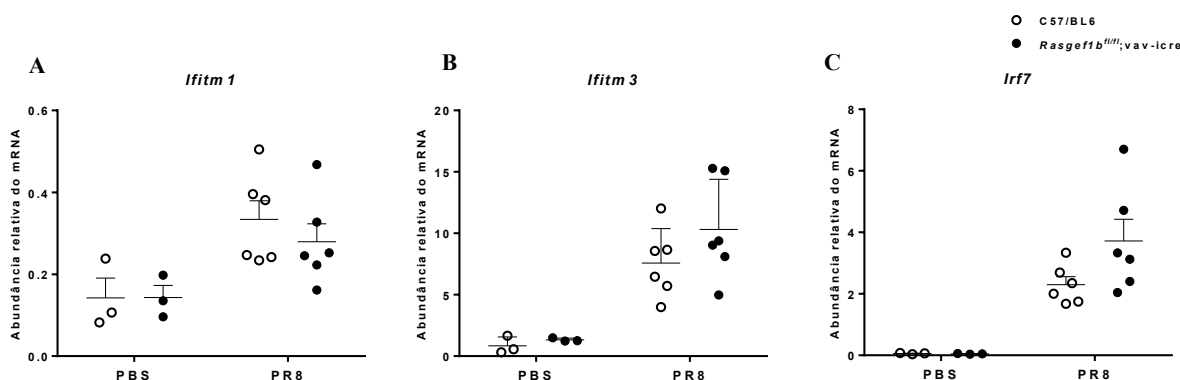


Figura 8: Análise da expressão de genes induzidos por IFNs 3 dpi. A infecção dos camundongos foi realizada conforme descrito na figura 6. Três dpi, o pulmão direito foi utilizado para avaliar a abundância relativa do mRNA de *Ifitm1* (A), *Ifitm3* (B) e *Irf7* (C). A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Em sequência, analisamos a expressão de citocinas inflamatórias a fim de verificarmos possíveis diferenças de expressão entre os grupos selvagens e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. A produção de citocinas é um fator crucial na proteção do organismo, porém, em excesso, torna-se um fator patogênico podendo levar à injúria pulmonar aguda (ALI do inglês *Acute Lung Injury*) e síndrome do stress respiratório agudo (ARDS do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) (Butt *et al.*, 2016).

IL-1beta é uma citocina secretada em resposta à ativação de inflamassoma e sinaliza através de IL-1R induzindo a produção de genes inflamatórios mediante ativação de NF-kB. TNF está implicado no controle da infecção viral através do recrutamento de células como macrófagos e neutrófilos. IL-6 foi considerada uma citocina vital no controle da infecção por H1N1, promovendo a eliminação do vírus e protegendo os animais contra elevados danos pulmonares e morte (Pahl *et al.*, 1995; Conn, *et al.*, 1995; Kim e Solomon, 2010; Dienz *et al.*, 2012).

A análise da expressão de citocinas demonstra que os níveis do mRNA são similares entre os grupos selvagem e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* infectados, descartando uma possível correlação de dano pulmonar causado pela produção de citocinas (Fig. 9).

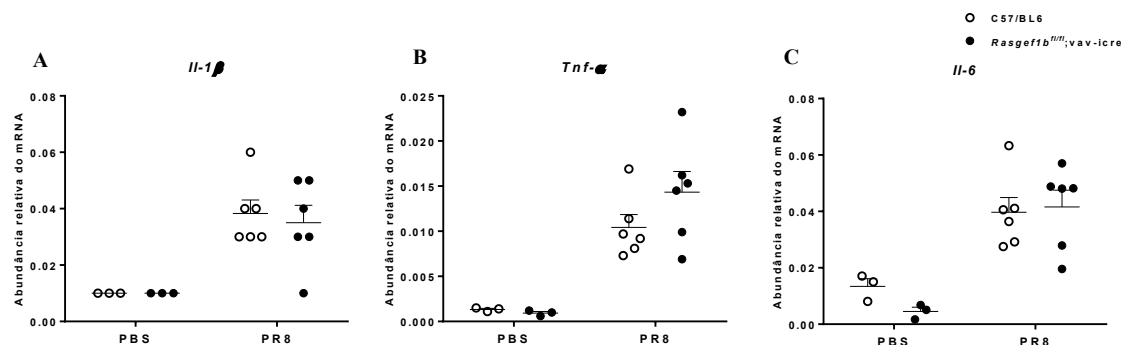


Figura 9: Expressão de citocinas inflamatórias 3 dpi. A infecção dos camundongos foi realizada conforme descrito na figura 6. Três dpi, o pulmão direito foi utilizado para avaliar a abundância relativa do mRNA de *Il-1β*, *Tnf-α* e *Il-6*. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta Ct}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Além de citocinas, moléculas com funções quimiotáticas de leucócitos são produzidas em resposta à infecção, e algumas delas estão correlacionadas à patogênese do vírus influenza. Ccl2 e Ccl7, também conhecidas como proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1 e MCP-3 respectivamente), são quimiocinas recrutadoras de uma série de leucócitos durante a infecção e foram relatadas como colaboradoras para a patogênese de doenças respiratórias (Choi Es., 2004; Mercer Pf., 2014). O mesmo efeito patológico foi observado por Ichikawa *et al.* (2013) ao induzir a infecção por influenza H1N1 em camundongos selvagens e nocautes para *Cxcl10* e *CXCR3*. A ausência de *Cxcl10* e seu receptor *CXCR3* protegeu os camundongos da lesão pulmonar na fase aguda da infecção (Ichikawa *et al.*, 2013).

O tráfego de neutrófilos para o tecido infectado está relacionado à quimiocinas CXC, incluindo *Cxcl1* e *Cxcl2*. Essas quimiocinas também são frequentemente relacionadas à lesão pulmonar (Hoth *et al.*, 2011; Brandes *et al.*, 2013; Hornick Ee 2017). Ahuja *et al.* (2012) demonstraram IL-6 altamente elevado em camundongos com lesão renal aguda (LRA) associada à lesão pulmonar. Através da inibição de IL-6, camundongos com LRA foram

protegidos da lesão pulmonar associado à redução dos níveis de *Cxcl1* e dos neutrófilos pulmonares (Ahuja *et al.*, 2012).

A RT-PCR quantitativa foi utilizada para determinar a expressão gênica das quimiocinas aqui mencionadas, previamente selecionadas por apresentarem papéis relevantes na lesão pulmonar. No entanto, as análises dos resultados indicam que apenas *Cxcl1* teve sua expressão comprometida nos pulmões de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;vav-icre.

O acúmulo do mRNA de *Cxcl1* em animais WT pode indicar um maior recrutamento de neutrófilos para o pulmão após 3 dias de infecção por influenza A H1N1 nestes animais, sugerindo uma potencial correlação para o aumento da mortalidade (Fig. 10E).

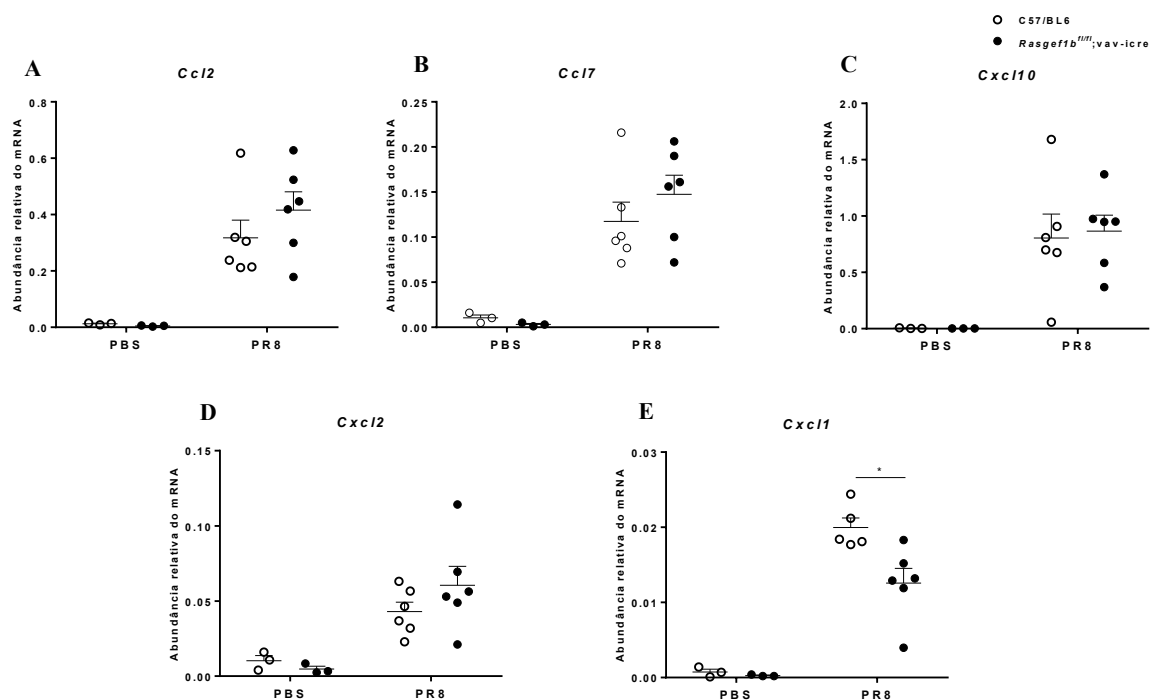


Figura 10: Expressão de quimiocinas 3 dpi. A infecção dos camundongos foi realizada conforme descrito na figura 6. Três dpi, o pulmão direito foi utilizado para avaliar a abundância relativa do mRNA de *Ccl2*, *Ccl7*, *Cxcl10*, *Cxcl2* e *Cxcl1*. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta Ct}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao WT (* $p < 0.05$) conforme determinado pelo T-test. Os resultados foram traçados como média $\pm$ DP.

A proteína Domínio SET bifurcado 2 (*Setdb2*), que funciona como uma metiltransferase de histonas, regulando a segregação de cromossomos, foi descrita como uma molécula induzida por Interferon do tipo I e que apresenta função na modulação da expressão de genes regulados por NF- κ B, dentre eles, *Cxcl1*. A deficiência de *Setdb2* resultou em uma inflamação pulmonar exacerbada. *Setdb2* catalisa a adição de uma marca repressiva H3K9 trimetilada (H3K9me3) à região promotora de *Cxcl1*, inibindo a expressão desta quimiocina (Schliehe *et al.*, 2015). Neste sentido, analisamos a expressão de *Setdb2* nos pulmões de camundongos infectados com o intuito de averiguar se os níveis de mRNA poderiam estabelecer alguma correlação com os níveis reduzidos do mRNA de *Cxcl1* encontrados nos camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. Contudo, não foi observada diferença na expressão desta molécula entre os animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* infectados (Fig 11).

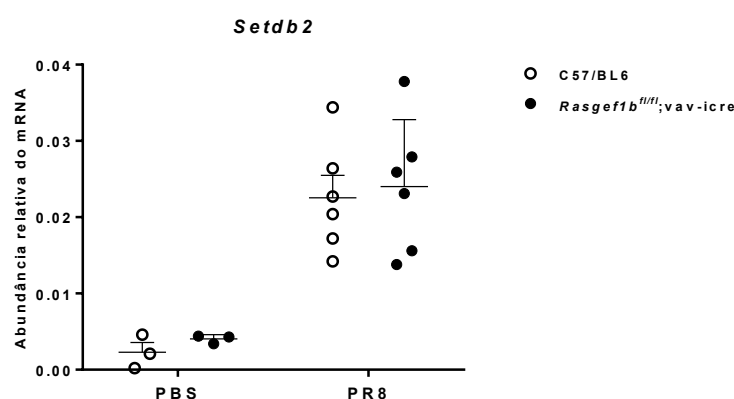


Figura 11: Expressão de um dos reguladores de *Cxcl1*, o *Setdb2* 3 dpi. A infecção dos camundongos foi realizada conforme descrito na figura 6. Três dpi, o pulmão direito foi utilizado para avaliar a abundância relativa do mRNA de *Setdb2*. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta Ct}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. Os resultados foram traçados como média $\pm$ DP.

Após avaliação de expressão dos genes acima apresentados, partimos para análise de produção de citocinas e quimiocinas através do ensaio de Elisa. Interessantemente, o perfil de produção de KC/*Cxcl1* manteve-se significativamente reduzida no BAL dos animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. Ademais, confirmamos a similaridade entre os grupos, na produção de *Ccl2* e IL-6, biomarcadores importantes no contexto da infecção, além da concentração total de proteínas por análise de bradford (Fig. 12).

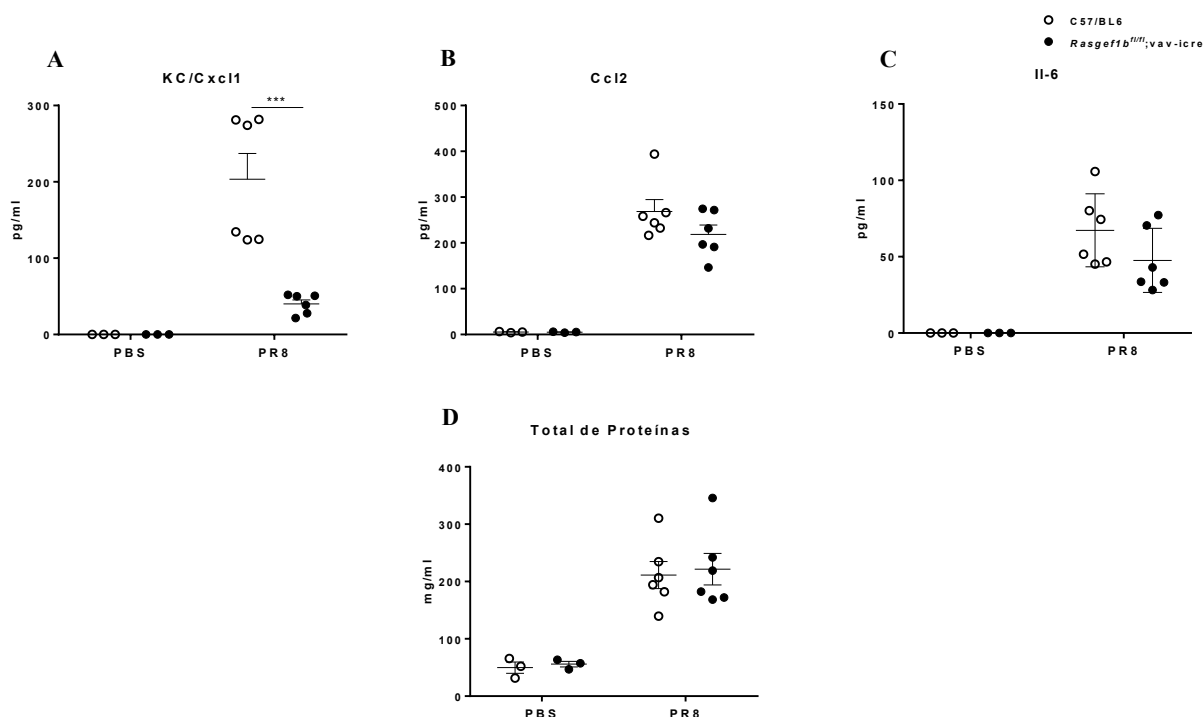


Figura 12: Análise da concentração de quimiocinas, Il-6 e total de proteínas no BAL 3 dpi. A infecção dos camundongos foi realizada conforme descrito na figura 6. Três dpi, os pulmões foram lavados com 3ml de PBS, o qual foi coletado para avaliar a concentração das quimiocinas, Il-6 e o total de proteínas. As concentrações de KC/Cxcl1 (A), Ccl2 (B) e Il-6 (C) foram obtidas através do ensaio de ELISA e a concentração total de proteínas foi dada através do ensaio de Bradford (D). *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao WT (***) $p < 0.001$) conforme determinado pelo T-test. Os resultados foram traçados como média $\pm$ DP.

5.4 A expressão de *Cxcl1* é reduzida após 1 e 6 dias de infecção em camundongos *Rasgeflb^{fl/fl};vav-icre*

Com o intuito de verificar a expressão de *Cxcl1* em tempos distintos, partimos para análises após 1 e 6 dias de infecção. Primeiramente, analisamos a infecção após 1 dia, visto que o maior achado deste trabalho está em torno de *Cxcl1*, e que esta quimiocina é encontrada em altos níveis principalmente em tempos precoces.

Avaliamos inicialmente os níveis do mRNA viral, e então, validamos a infecção através dos elevados níveis de mRNA de *PR8*, presentes no pulmão dos animais infectados. Ainda, nesse sentido, avaliamos a expressão de *Tnf- α* , confirmando a ocorrência de um processo inflamatório. Em seguida, analisamos a expressão de *Cxcl1* através de RT-qPCR e de sua produção por ensaio de ELISA. Semelhante aos dados observados aos 3 dpi, os animais

Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre apresentaram significativa redução na expressão do mRNA e produção da quimiocina Cxcl1 (Fig. 13).

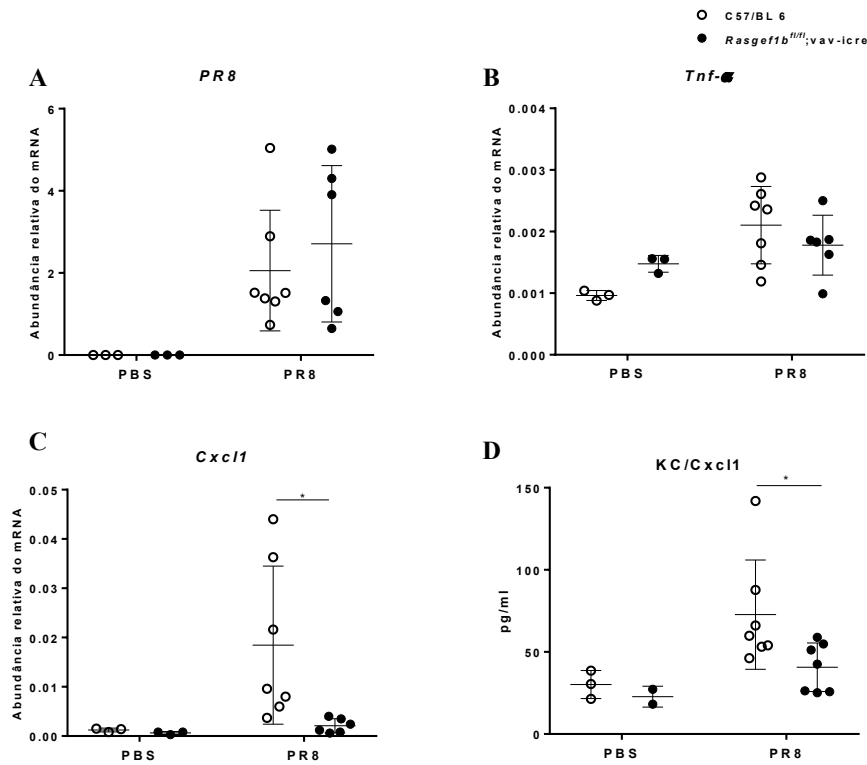


Figura 13: Avaliação da expressão do mRNA de PR8, Tnf-α e Cxcl1 e produção de KC/Cxcl1 1 dpi. Os animais foram anestesiados e infectados via intranasal com 1×10^4 PFU do vírus H1N1 A/PR8/34 em 20μl de PBS (PR8) ou 20μl de PBS apenas (PBS), e 1 dpi, foram obtidos os pulmões e BAL. A abundância relativa do mRNA de PR8 (A), Tnf-α (B) e Cxcl1 (C) foi avaliada através de RT-qPCR e calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o *Rpl32* como gene normalizador. A produção de KC/Cxcl1 (D) foi analisada através do ensaio de ELISA. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao WT (*p<0.05) conforme determinado pelo T-test. Valores dados como média ± desvio padrão (DP).

Ademais, analisamos a produção de KC/Cxcl1 nos animais infectados aos seis dpi através do ensaio de ELISA e observamos uma constante e baixa produção de KC/Cxcl1 nos animais *Rasgef1b*^{fl/fl};vav-icre (Fig. 14).

Esses dados reforçam a importância do estudo detalhado do papel de RasGEF1b sobre Cxcl1 durante a infecção por IAV, e sugere fortemente, a regulação positiva deste GEF sobre KC/Cxcl1.

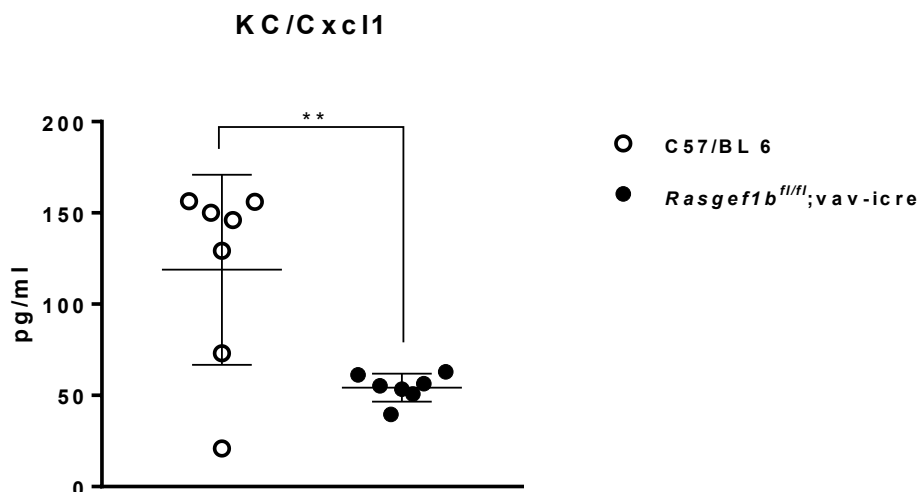


Figura 14: Produção de KC/Cxcl1 após 6 dpi. Os animais foram anestesiados e infectados via intranasal com 1×10^4 PFU do vírus H1N1 A/PR8/34 em 20 μ l de PBS (PR8) ou 20 μ l de PBS apenas (PBS), e 6 dpi, foi obtido o BAL. A produção de KC/Cxcl1 foi analisada através do ensaio de ELISA. ** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao WT (** $p < 0.005$) conforme determinado pelo T-test. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Avaliamos também as consequências biológicas da reduzida produção de Cxcl1 no recrutamento de neutrófilos para o pulmão através da análise e contagem de células obtidas do BAL após 1 e 6 dpi (Fig. 15).

Um dia após a infecção, observamos uma redução na contagem de células polimorfonucleares, no entanto, para confirmação desse dado, sugerimos estudos mais aprofundados com relação ao recrutamento celular, através de marcadores de superfície celular para neutrófilos e análise por citometria de fluxo.

Seis dias após a infecção, não observamos diferenças na contagem diferencial de células.

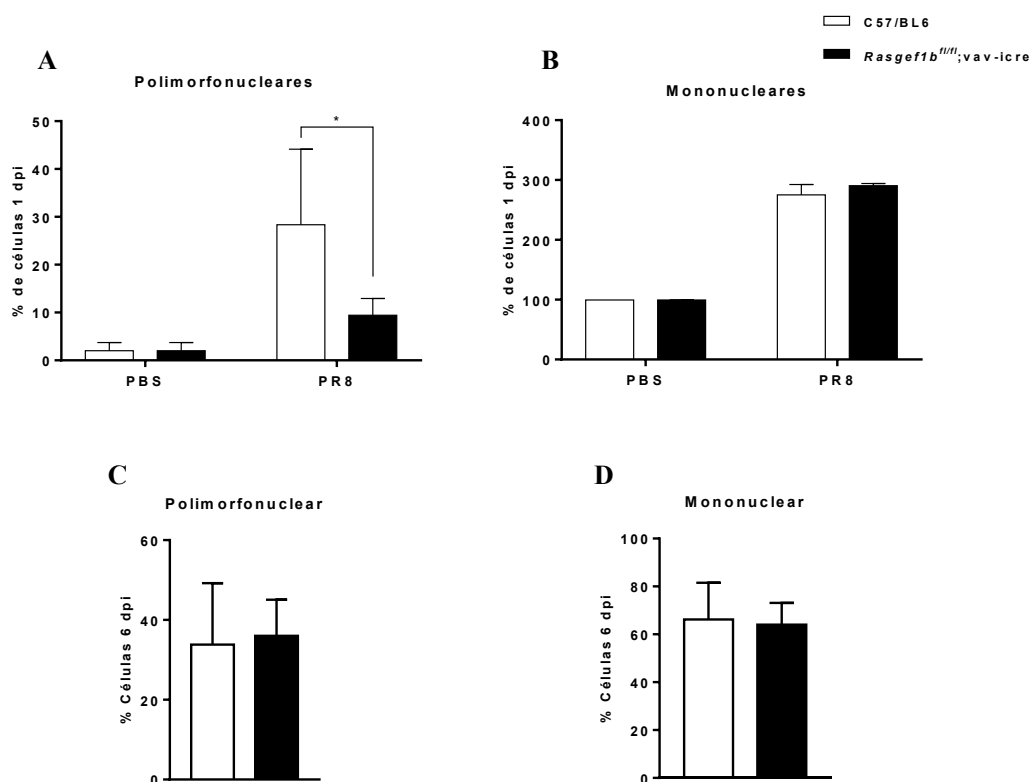


Figura 15: Contagem diferencial de células no período de 1 e 6 dpi. Os animais foram infectados conforme figura 6 e eutanasiados após 1 (A e B) e 6 (C e D) dpi. Após eutanásia, os pulmões foram lavados com 3ml de PBS, o qual foi centrifugado e o sobrenadante (BAL), coletado. As células foram ressuspensas em BSA3% e fixadas em lâminas através de cytospin para realização da contagem diferencial de células. * indica diferença estatisticamente significantes em relação ao WT (*p< 0.05) conforme determinado pelo T-test. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

5.5 Expressão de *Cxcl1* induzida por R848 é reduzida em BMDMs provenientes de animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*

Para verificar o perfil cinético da expressão de *Cxcl1* *in vitro*, nós obtivemos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) provenientes de camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, e tratamos as culturas com agonista de TLR7 e avaliamos os níveis do mRNA de *Cxcl1*.

Para tanto, culturas de BMDMs foram incubadas com 1 μ M de Resiquimod (R848). O estímulo foi realizado nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, e o RNA total foi obtido para análise da expressão de *Cxcl1*. Observamos a redução significativa dos níveis do mRNA de

Cxcl1 nos macrófagos provenientes de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. Além disso, houve diferenças significativas em todos os tempos analisados (Fig. 16).

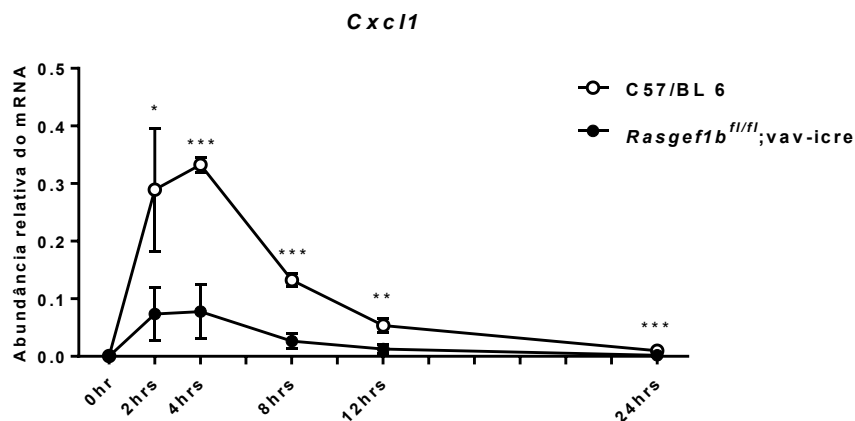


Figura 16: Perfil cinético da expressão de *Cxcl1* em BMDMs provenientes de animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. Culturas de BMDMs derivados de animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* foram tratadas com 1 μ M de resiquimod (R848) por 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. A expressão do mRNA de *Cxcl1* foi analisada por RT-qPCR. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o Rpl32 como gene normalizador. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,001) conforme determinado pelo T-test. N= 3. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

5.6 A expressão de *Cxcl1* induzida através de TLR7 e TLR4 é prejudicada em BMDMs provenientes de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*

Utilizamos BMDMs derivados de animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* e WT em culturas para avaliar a expressão de *Cxcl1* induzida por R848. Os estímulos foram realizados na dose de 1 μ M por 4 horas e após este período, coletamos o sobrenadante para avaliar a expressão de *Cxcl1*, *Cxcl2* e *Il-6* (Fig 17A).

Além disso, verificamos a produção de KC/*Cxcl1* induzida por LPS. Os estímulos foram realizados na dose de 100ng/ml por 9 horas e então, avaliamos a produção de KC/*Cxcl1*, *Il-6* e *Tnf- α* através do ensaio de ELISA (Fig 17B).

As análises revelaram uma produção de citocinas inflamatórias em níveis comparáveis entre os grupos, entretanto, a expressão e produção de Cxcl1 foi significativamente reduzida nas células *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

Estes resultados mostram que a regulação de Cxcl1 através de TLR4 e TLR7 é prejudicada em BMDM's provenientes de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

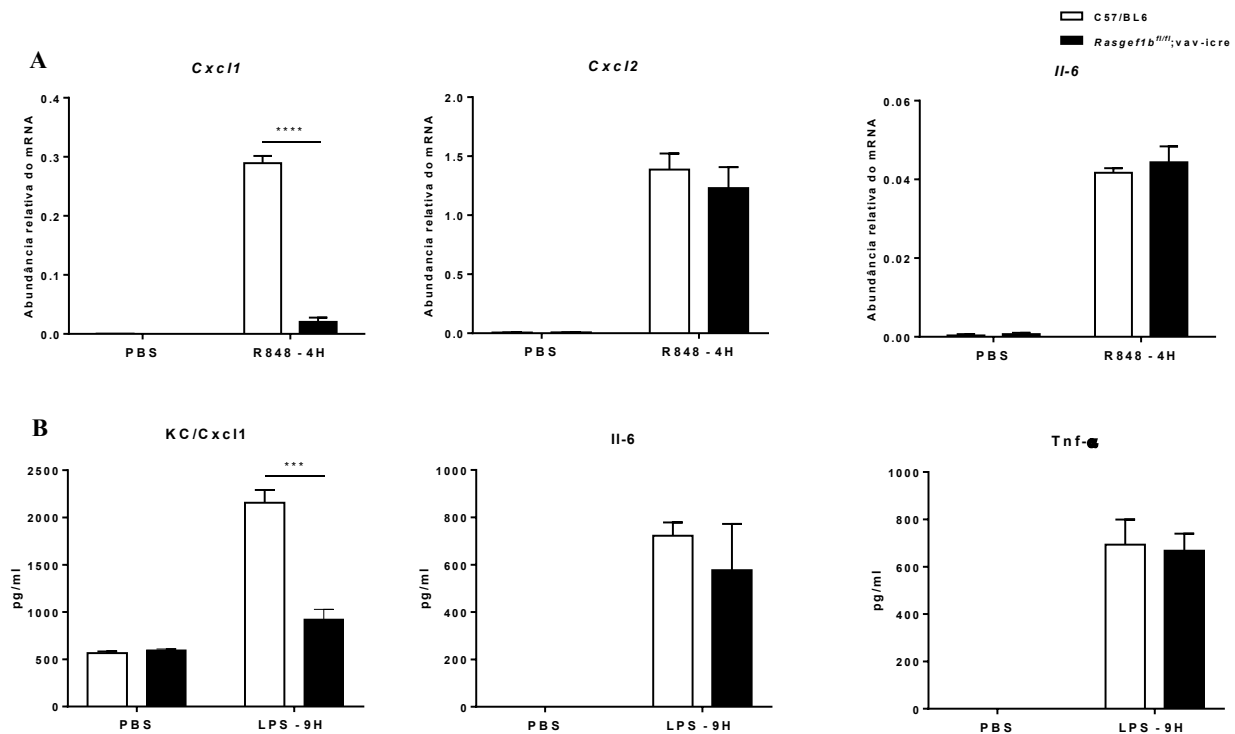


Figura 17: Efeito da deficiência de RasGEF1b sobre Cxcl1 *in vitro*. Culturas de BMDMs derivados de animais WT e *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* foram tratadas com 1μM de resiquimod (R848) por 4 horas ou 100ng/ml de LPS por 9 horas. A expressão do mRNA de *Cxcl1*, *Cxcl2* e *Il-6* de BMDMs tratados com R848 (A), foi analisada por RT-qPCR. A abundância relativa do mRNA foi calculada de acordo com o método comparativo de ciclo limiar ($2^{-\Delta C_t}$) utilizando o Rpl32 como gene normalizador. A produção de KC/Cxcl1, Il-6 e Tnf-α de BMDMs tratados com LPS foram analisados pelo ensaio de ELISA (B). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* (*p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.001; ****p < 0.0001) conforme determinado pelo T-test. N= 3. Valores dados como média ± desvio padrão (DP).

5.7 A produção de KC/Cxcl1 é reduzida na lesão pulmonar aguda induzida por R848 em camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre

Nós também conduzimos experimentos de lesão pulmonar aguda utilizando camundongos com deleção ubíqua de RasGEF1b.

Para tanto, camundongos WT e *Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre foram submetidos à instilação por via intranasal com 50µg de R848 por animal, preparado em 25µl de DMSO e, após 4 horas, os animais foram devidamente anestesiados e sacrificados para coleta do BAL e pulmões. Três experimentos independentes foram realizados uma vez que as ninhadas dos animais *Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre são pouco frequentes e reduzidas. Além disso, houve grande variabilidade intra-experimental, pois, os animais mostravam-se frágeis durante a inoculação e grande parte não resistia ao estímulo.

O resultado desses experimentos (Fig. 18) mostra que a produção de KC/Cxcl1 é reduzida no BALF de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre quando comparada à de camundongos WT, embora, de acordo com o test T de student, essa observação não seja suportada estatisticamente ($p = 0.081$).

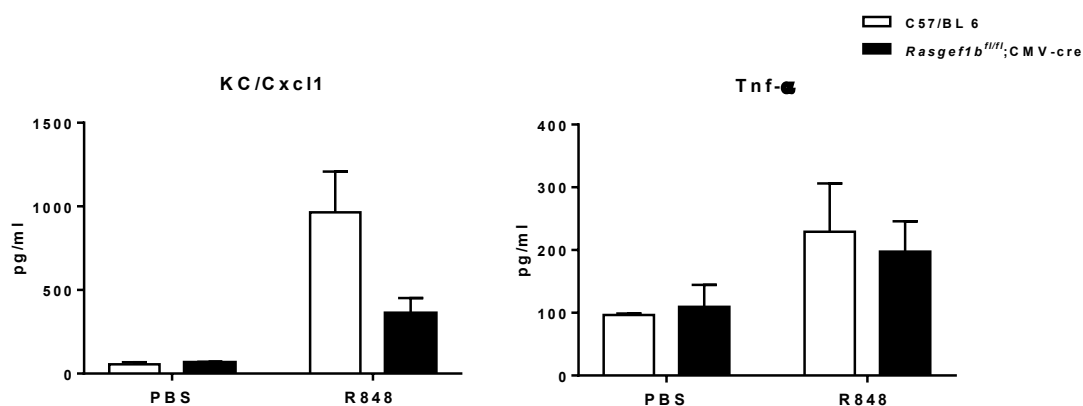


Figura 18: Perfil de produção de KC/Cxcl1 em animais *Rasgef1b^{fl/fl}*;CMV-cre. Os animais foram anestesiados e estimulados via intranasal com 50µg de R848 em 25µl de PBS (R848) ou 25µl de PBS apenas (PBS), e 4 horas após a infecção, foi obtido o BAL através da lavagem dos pulmões com 3ml de PBS. A produção de KC/Cxcl1 e TNF-α foi analisada através do ensaio de ELISA. Os valores representados são baseados nas médias de 3 experimentos independentes. Valores dados como erro padrão da média (SEM).

5. DISCUSSÃO

RasGEF1b é um fator intracelular de troca de nucleotídeos guanina cuja expressão é aumentada em macrófagos ativados por TLRs e *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2010; Silva 2018). Embora a função de troca nucleotídica de RasGEF1b sobre uma GTPase específica na resposta imune seja ainda desconhecida, estudos conduzidos em nosso laboratório têm revelado que RasGEF1b é requerida para a ativação induzida por LPS de uma GTPase relacionada a Ras em macrófagos (Brenner C. Carvalho, 2018, dados não publicados).

Utilizando um modelo de infecção pelo vírus Influenza H1N1, nós verificamos diferenças marcantes nos sinais clínicos através do acompanhamento de peso dos animais (Fig. 4). Além disso, os dados mostrados na figura 3 nos revelou um importante fenótipo, a sobrevivência aumentada nos animais *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, o que nos motivou a investigar como era a expressão de moléculas inflamatórias diversas durante a infecção por IAV em camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

Após constatar que no sétimo dia pós-infecção se inicia o comprometimento da sobrevivência dos animais, optamos por avaliar a expressão e produção de citocinas e quimiocinas em um período antecedente e intermediário, terceiro dpi, no qual sugerimos que nos pulmões de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* parece ocorrer um mecanismo seletivo sobre a regulação da expressão de *Cxcl1* após ativação de TLR7 (Fig. 10).

O estudo de moléculas envolvidas na resposta imune contra o vírus apresenta grande relevância para o conhecimento dos mecanismos desenvolvidos durante a infecção por Influenza. Dentre estas moléculas, *Cxcl1* tem sido amplamente estudada e, a compreensão dos mecanismos de transcrição desta quimiocina é essencial para o estudo do controle de doenças inflamatórias assim como o controle do crescimento tumoral.

Além da função de atrair neutrófilos para o local da infecção, *Cxcl1* está envolvida no crescimento de tumores (Cuenca *et al.*, 1992). Feng e colaboradores (2006) demonstraram que após o tratamento de camundongos com um promotor natural de carcinogênese cutânea, o ácido oikaico, foi observado o aumento da expressão de *Cxcl1* em células JB6, uma linhagem de células epidérmicas de camundongos (Feng G. *et al.*, 2006).

Embora o papel dos neutrófilos na resistência a infecções bacterianas seja bem aceito (Ba, 2009), o papel destas células durante as infecções virais é sugestivo para o aumento da morbidade e mortalidade devido ao dano tecidual e comprometimento da função respiratória causada pela excessiva produção de quimiocinas de recrutamento de neutrófilos e consequente presença, em grande escala, destas células no tecido infectado (Hornick Ee 2017).

Estudos tem demonstrado, frequentemente, a presença maciça de neutrófilos em pulmões infectados por IAV, e este tem sido relatado como maior fator de associação à lesão pulmonar aguda e o registro de casos letais causados por Influenza (Perrone La 2008; Crowe *et al.*, 2009; Narasaraju *et al.*, 2011; Seo Su 2011; Hornick Ee 2017).

Em 2008, Perrone e colaboradores demonstraram um elevado e rápido recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o pulmão de animais infectados pelos vírus altamente patogênicos H1N1 e H5N1 (Perrone La 2008).

Crowe *et al.* (2009), utilizou como modelo experimental para infecção por influenza H1N1, camundongos deficientes de IL-17RA, um receptor de IL-17, citocina descrita como mediadora do recrutamento de neutrófilos para o pulmão infectado por influenza. Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar se o bloqueio da sinalização de IL-17RA poderia conferir proteção contra a lesão pulmonar aguda. Como resultado, foi observada a diminuição do infiltrado neutrofílico no pulmão dos animais infectados em estágio inicial da doença e uma imunopatologia moderada (Crowe *et al.*, 2009).

Seo (2011) demonstrou que animais knockout para o receptor de IFN-I produzem altos níveis de KC/Cxcl1 durante a infecção pelos vírus Influenza (H1N1). Em associação ao aumento desta quimiocina e consequente fluxo de neutrófilos para o sítio inflamatório, os animais desenvolveram uma neutrofilia grave acompanhada à uma alta taxa de mortalidade (Seo Su, 2011).

Estudos em animais com depleção de macrófagos ou neutrófilos desafiados com doses subletais do vírus PR8 (H1N1) demonstraram que a redução de macrófagos resulta em neutrofilia aumentada e consequente aumento de danos pulmonares. Em contrapartida, animais com depleção neutrofílica, apresentaram patologia pulmonar moderada (Narasaraju *et al.*, 2011).

Ainda nesta mesma linha, Hornick e colaboradores (2017) conferiram proteção aos camundongos infectados por IAV contra a letalidade através da deleção do receptor Nlrp12 funcionalmente descrito como um receptor implicado na regulação pró-inflamatória em diferentes contextos. Em consequência da deleção de Nlrp12, os animais demonstraram redução da permeabilidade vascular além da diminuição dos níveis de Cxcl1 e consequente redução no recrutamento de neutrófilos para o pulmão (Hornick *et al.*, 2017).

Contrariamente ao observado em estudos aqui citados, Tate (2008, 2009 e 2011) demonstrou em três distintos trabalhos, uma doença mais pronunciada com elevação da mortalidade em animais com neutropenia induzida, infectados com diferentes cepas do vírus Influenza (Tate *et al.* 2008; 2009; 2011).

No entanto, de acordo com Tumpey *et al.* (2005), o esgotamento de neutrófilos está associado com o aumento da carga viral e a diminuição da sobrevivência (Tumpey *et al.*, 2005).

Interessantemente, Brandes e colaboradores (2013) demonstraram que o alto recrutamento de neutrófilos ou deleção dessas células durante a infecção viral levam ao aumento da morbidade. Entretanto, a atenuação de neutrófilos aumenta a sobrevivência sem alterar a disseminação do vírus (Brandes *et al.*, 2013). Corroborando o trabalho de Brandes (2013), Hornick (2017) demonstra que a neutrofilia moderada é importante para o controle viral e aumento da sobrevivência de animais infectados com Influenza H1N1 (Hornick *et al.* 2017).

Em resumo, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, fornecemos evidências claras que a expressão de *Cxcl1* é dramaticamente comprometida nos pulmões de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* submetidos a lesão pulmonar aguda induzida via TLR7 e durante a infecção com Influenza H1N1, causando prejuízos no recrutamento de neutrófilos para o local de infecção, o que poderia conferir menor dano patológico com consequente aumento da sobrevivência.

É importante reforçar que estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para entender melhor a expressão comprometida de *Cxcl1* nos pulmões de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*. O gene codificante para RasGEF1b assim como o gene que codifica *Cxcl1* encontram-se no cromossomo 5, separados por cerca de 40 genes por uma distância de pouco mais de 8 milhões de pares de bases. É especulativo que a presença de sequências loxP no genoma de camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre* poderia comprometer a ligação de algum

fator regulador a algum “*enhancer*” com implicação na regulação à distância da expressão de *Cxcl1*. No entanto, camundongos *Rasgef1b-flfl;CMVcre* que abrigam apenas um sítio loxP, também apresentam expressão comprometida de *Cxcl1* nos pulmões (Fig. 18). Assim, além de estudos comparativos com camundongos *Rasgef1b^{fl/fl}*, a inspeção minuciosa e mais detalhada da região contendo as sequências loxP poderão esclarecer melhor essas observações.

Devido a alta seletividade e especificidade observada na expressão de *Cxcl1* nos camundongos transgênicos utilizados em nosso estudo, pode-se sugerir que RasGEF1b desempenhe um papel sobre a expressão de *Cxcl1* que independa de sua região promotora, pois demonstramos que RasGEF1b não é suficiente para induzir a ativação transcrricional de *Cxcl1* (Silva et al., 2018).

Zhang *et al.* (2014) demonstraram o papel de proteínas Ras na indução de *Cxcl1* e *Cxcl2* no pulmão de camundongos previamente tratados com ácido farnesiltiossalicílico (FTS do inglês *farnesylthiosalicylic acid*) durante a lesão pulmonar induzida por *Streptococcus pyogenes*. O bloqueio de Ras pelo seu antagonista FTS protegeu os camundongos da lesão pulmonar aguda (Zhang *et al.*, 2014). Em associação com o trabalho de Zhang *et al.* (2014), é tentativo especular a luz de nossos resultados que uma RasGTPase seja efetora de RasGEF1b para regular a expressão de *Cxcl1*. De fato, estudos em andamento em nosso laboratório tem revelado que o silenciamento da expressão de uma GTPase relacionada a Ras em macrófagos resulta em expressão e produção comprometida de *Cxcl1* após estimulação com LPS (Brener Carvalho, dados não publicados).

Conforme Hernandez (2016), a expressão de *Cxcl1* ocorre através das vias MyD88 e TRIF (Hernandez A., 2016). Essa informação inspirou o nosso interesse em investigar se a sinalização dependente de TRIF também alteraria a expressão de *Cxcl1*. Para elucidar a nossa pergunta, partimos para experimentos *in vitro*, realizados em BMDM's desprovidos de RasGEF1b tratados com agonista de TLR7 (ativa a via MyD88) e TLR4 (ativa via MyD88 e TRIF) através de estímulos com LPS e R848. O resultado demonstra que RasGEF1b tem um potencial controle na expressão de *Cxcl1* independente da via de sinalização aqui investigada.

Partindo para experimentos utilizando camundongos com deleção ubíqua de RasGEF1b, observamos claramente uma redução nos níveis de KC, embora não suportada estatisticamente ($p=0,08$). No entanto, a realização de novos experimentos com a linhagem de camundongos

RasGEF1b-KO no qual os animais sejam infectados com o vírus influenza A/PR8/34 ou inoculados por via intratraqueal com o R848 poderão melhor esclarecer nossos achados em camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*.

De modo interessante, a regulação da expressão de *Cxcl1* durante resposta imune envolve múltiplos mecanismos, incluindo pós-transcricionais. Além de *Setdb2*, um regulador de *Cxcl1* analisado neste trabalho vários outros reguladores de *Cxcl1* têm sido descritos. NF- κ B, tristetraprolin (TTP), ATF3 e *Hes1* são exemplos de reguladores descritos, e estas moléculas são sugestivas para continuar efetivando suas funções normalmente na ausência de RasGEF1b, visto que o recrutamento de neutrófilos não é totalmente prejudicado. Essa parcialidade na produção de *Cxcl1* pode ser a justificativa da melhora na sobrevivência dos animais, já que o recrutamento de neutrófilos é essencial para o controle da replicação viral, porém, o seu aumento parece estar relacionado com a gravidade da doença.

TTP, uma proteína reguladora de TNF, foi descrita em 2008 como uma molécula desestabilizadora de *Cxcl1*. TTP é uma proteína de regulação pós-transcrição que reconhece sequências ricas em adenina-uridina (AREs) localizadas em regiões 3' de uma série de mRNAs, incluindo o mRNA que codifica *Cxcl1* (Datta S 2008). De nota, estudos para avaliar a meia-vida dos mRNAs de *Cxcl1* e de outros genes afetados em macrófagos nocautes de RasGEF1b após a estimulação com LPS já estão sendo conduzidos no laboratório.

ATF3, normalmente induzida após ativação de TLRs de modo a suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios, foi descrito como um regulador negativo da expressão de *Cxcl1* no pulmão de camundongos tratados com LPS via intratraqueal (Boespflug Nd 2014).

O fator de transcrição 1 da família Hes (*Hes1*), uma proteína com importante papel no desenvolvimento de diferentes órgãos e células, mostrou-se como um importante modulador da resposta inflamatória induzida por macrófagos, com efeitos inibitórios sob um conjunto de genes induzidos por essas células, dentre eles, *Cxcl1* (Shang Y 2016).

Através dos nossos estudos, adicionamos à lista de reguladores de *Cxcl1* um novo potencial regulador até então, ainda não relatado na literatura, o RasGEF1b. Além disso, demonstramos uma possível contribuição de *Cxcl1* na severidade da doença e o efeito protetivo da atenuação desta quimiocina em camundongos *Rasgef1b^{fl/fl};vav-icre*, levando-nos a concluir que a

expressão desta molécula está diretamente relacionada com o controle do número de neutrófilos recrutados para o sítio da infecção e consequente controle do processo inflamatório.

Visto que o recrutamento de neutrófilos apresenta um papel relevante na patogênese da infecção por IAV e que RasGEF1b parece estar implicada na expressão de Cxcl1, mais estudos podem ajudar a estabelecer que esse GEF venha a ser um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação promissora no tratamento de Influenza.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, Niles, et al. Circulating IL-6 mediates lung injury via CXCL1 production after acute kidney injury in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2012, 303.6: F864-F872.

AKIRA, Shizuo; TAKEDA, Kiyoshi; KAISHO, Tsuneyasu. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature immunology**, 2001, 2.8: 675.

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

ANDRADE, W. A. et al. Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. **Genes Immun**, v. 11, n. 6, p. 447-57, Sep 2010. ISSN 1466-4879.

ANWAR, M. A.; BASITH, S.; CHOI, S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. **Exp Mol Med**, v. 45, p. e11, Feb 22 2013. ISSN 1226-3613.

BARBOSA, R. P. et al. Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98685, 2014. ISSN 1932-6203.

BOESPFLUG, Nicholas D., et al. ATF3 is a novel regulator of mouse neutrophil migration. **Blood**, 2014, blood-2013-06-510909.

BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 865-77, Jun 1 2007. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674.

BRANDES, M. et al. A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. **Cell**, v. 154, n. 1, p. 197-212, Jul 03 2013. ISSN 0092-8674.

BRASS, Abraham L., et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. **Cell**, 2009, 139.7: 1243-1254.

BROEK, D. et al. The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. **Cell**, v. 48, n. 5, p. 789-99, Mar 13 1987. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674.

BUCHWEITZ, J. P.; HARKEMA, J. R.; KAMINSKI, N. E. Time-dependent airway epithelial and inflammatory cell responses induced by influenza virus A/PR/8/34 in C57BL/6 mice. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 3, p. 424-35, Apr 2007. ISSN 0192-6233 (Print) 0192-6233.

BUTT, Yasmeen; KURDOWSKA, Anna; ALLEN, Timothy Craig. Acute lung injury: a clinical and molecular review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 2016, 140.4: 345-350.

CHEN, D-Y, Lin C-C, Chen Y-M, et al. Involvement of TLR7 MyD88-dependent signaling pathway in the pathogenesis of adult-onset Still's disease. **Arthritis Research & Therapy**. 2013;15(2):R39. doi:10.1186/ar4193.

CHOI, Esther S., et al. Enhanced monocyte chemoattractant protein-3/CC chemokine ligand-7 in usual interstitial pneumonia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 2004, 170.5: 508-515.

CHUANG, T. H.; ULEVITCH, R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 3, p. 372-8, Sep 2000. ISSN 1148-5493 (Print)1148-5493.

CLARKE, Helen C., et al. Ras antagonist farnesylthiosalicylic acid (FTS) reduces glomerular cellular proliferation and macrophage number in rat thy-1 nephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, 2003, 14.4: 848-854.

COLE, S. L.; HO, L. P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 4, p. 269-283, Feb 01 2017. ISSN 0143-5221.

CONN, Carole A., et al. Cytokines and the acute phase response to influenza virus in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 1995, 268.1: R78-R84.

CRECHET, J. B. et al. Enhancement of the GDP-GTP exchange of RAS proteins by the carboxyl-terminal domain of SCD25. **Science**, v. 248, n. 4957, p. 866-8, May 18 1990. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

CROWE, C. R. et al. Critical Role of IL-17RA in Immunopathology of Influenza Infection. **J Immunol**, v. 183, n. 8, p. 5301-10, Oct 15 2009. ISSN 0022-1767 (Print)1550-6606 (Electronic).

CUENCA, R. E.; AZIZKHAN, R. G.; HASKILL, S. Characterization of GRO α , β and γ expression in human colonic tumours: potential significance of cytokine involvement. **Surgical oncology**, 1992, 1.4: 323-329.

DATTA, Shyamasree, et al. Tristetraprolin regulates CXCL1 (KC) mRNA stability. **The Journal of Immunology**, 2008, 180.4: 2545-2552.

DE BOER, J, et al. "Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre." **European journal of immunology** 33.2 (2003): 314-325.

DIEBOLD, S. S. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1529-31, Mar 05 2004. ISSN 0036-8075.

DIENZ, O. et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. **Mucosal Immunology**, p. 258, 2012-02-01 2012. ISSN 1935-34561935-3456.

DOWSON, C. et al. Innate Immunity in Systemic Sclerosis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 19, n. 1, p. 2, Jan 2017. ISSN 1523-3774.

DU, Xin, et al. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. **European cytokine network**, 2000, 11.3: 362-71.

DUDEK, S. E. et al. Influenza A viruses suppress cyclooxygenase-2 expression by affecting its mRNA stability. **Sci Rep**, v. 6, p. 27275, Jun 06 2016. ISSN 2045-2322.

EPTING, Daniel, et al. Expression of rasgef1b in zebrafish. **Gene expression patterns**, 2007, 7.4: 389-395.

ESSERS MA , E. A. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. **Nature**. 2009.

FENG, Gong; OHMORI, Yoshihiro; CHANG, Pi-Ling. Production of chemokine CXCL1/KC by okadaic acid through the nuclear factor- κ B pathway. **Carcinogenesis**, 2005, 27.1: 43-52.

FERREIRA, L. R. et al. Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by Trypanosoma cruzi parasites. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 6, p. 1215-27, Dec 2002. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400.

GARCIA, Cristiana C., et al. Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. **PloS one**, 2013, 8.5: e64443.

GLOERICH, M.; BOS, J. L. Regulating Rap small G-proteins in time and space. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 615-23, Oct 2011. ISSN 0962-8924.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1526-9, Mar 05 2004. ISSN 0036-8075.

HEMMI, Hiroaki, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. **Nature immunology**, 2002, 3.2: 196.

HERNANDEZ, Antonio, et al. The role of MyD88-and TRIF-dependent signaling in monophosphoryl lipid A-induced expansion and recruitment of innate immunocytes. **Journal of leukocyte biology**, 2016, 100.6: 1311-1322.

HORNICK, Emma E., et al. Nlrp12 mediates adverse neutrophil recruitment during influenza virus infection. **The Journal of Immunology**, 2017, jil700999.

HOTH, J. J. et al. Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion. **Shock**, v. 35, n. 6, p. 604-9, Jun 2011. ISSN 1073-2322 (Print)1540-0514 (Electronic).

ICHIKAWA, Akihiko, et al. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and nonviral origin. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 2013, 187.1: 65-77.

Informe Epidemiológico. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/05/Informe-Epidemiologico-Influenza-2016-SE-52.pdf>> Acesso em: 10 nov. 2017.

IWASAKI, A.; PILLAI, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 5, p. 315-28, May 2014. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1741 (Electronic).

KAFRI, M. et al. Inhibition of Ras attenuates the course of experimental autoimmune neuritis. **J Neuroimmunol**, v. 168, n. 1-2, p. 46-55, Nov 2005. ISSN 0165-5728 (Print)0165-5728.

KAHANA, J. A.; CLEVELAND, D. W. Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. **J Cell Biol**, v. 146, n. 6, p. 1205-10, Sep 20 1999. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2908.

KAWAI, Taro, et al. Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nature immunology**, 2004, 5.10: 1061.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, v. 5, p. 461, 2014. ISSN 1664-3224.

KIM, S. Y.; SOLOMON, D. H. Tumor necrosis factor blockade and the risk of viral infection. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 3, p. 165, 2010-02-09 2010. ISSN 1759-4804/1759-4804.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, Feb 2011. ISSN 0883-0185.

LIU, Jin, et al. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. **Molecular immunology**, 2010, 47.5: 1083-1090.

LUND, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 15, p. 5598-603, Apr 13 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

MERCER, Paul F., et al. Proteinase-activated receptor-1, CCL2, and CCL7 regulate acute neutrophilic lung inflammation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, 2014, 50.1: 144-157.

MIFSUD, E. J.; TAN, A. C.; JACKSON, D. C. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. **Front Immunol**, v. 5, p. 79, 2014. ISSN 1664-3224.

MITIN, Natalia; ROSSMAN, Kent L.; DER, Channing J. Signaling interplay in Ras superfamily function. **Current Biology**, 2005, 15.14: R563-R574.

MUMY, Karen L.; MCCORMICK, Beth A. The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. **Current opinion in pharmacology**, 2009, 9.6: 697-701.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **Am J Pathol**, v. 179, n. 1, p. 199-210, Jul 2011. ISSN 0002-9440.

NG, W. L. et al. Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway. **RNA Biol**, v. 13, n. 9, p. 861-71, Sep 2016. ISSN 1547-6286.

OHMORI, Y., S. Fukumoto, and T.A. Hamilton. Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), 1995, 155:3593-3600.

OSLUND, Karen L.; BAUMGARTH, Nicole. Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity. **Future virology**, 2011, 6.8: 951-962.

- OLIVEIRA, Lorena VN, et al. Influenza A virus as a predisposing factor for Cryptococcosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2017, 7: 419.
- PAHL, Heike L.; BAEUERLE, Patrick A. Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. **Journal of virology**, 1995, 69.3: 1480-1484.
- PERRONE, Lucy A., et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. **PLoS pathogens**, 2008, 4.8: e1000115.
- POMMERENKE, C. et al. Global transcriptome analysis in influenza-infected mouse lungs reveals the kinetics of innate and adaptive host immune responses. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41169, 2012. ISSN 1932-6203.
- PULENDRAN, B.; MADDUR, M. S. Innate Immune Sensing and Response to Influenza. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 386, p. 23-71, 2015. ISSN 0070-217X (Print).
- ROBINSON, L. C. et al. CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 235, n. 4793, p. 1218-21, Mar 6 1987. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.
- SAWANT, K. V. et al. Chemokine CX1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. **J Innate Immun**, v. 7, n. 6, p. 647-58, 2015. ISSN 1662-811x.
- SCHLIEHE, C. et al. The methyltransferase Setdb2 mediates virus-induced susceptibility to bacterial superinfection. **Nat Immunol**, v. 16, n. 1, p. 67-74, Jan 2015. ISSN 1529-2908.
- SEO, Sang-Uk, et al. Type I interferon signaling regulates Ly6Chi monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. **PLoS pathogens**, 2011, 7.2: e1001304..
- SHANG, Yingli, et al. The transcriptional repressor Hes1 attenuates inflammation by regulating transcription elongation. **Nature immunology**, 2016, 17.8: 930.
- SHORT, K. R. et al. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 1, p. 57-69, Jan 2014. ISSN 1473-3099.
- TAKAGI, M. Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis. **J Clin Exp Hematop**, v. 51, n. 2, p. 77-92, 2011. ISSN 1346-4280.
- TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunol Rev**, v. 249, n. 1, p. 158-75, Sep 2012. ISSN 0105-2896.
- TATE, Michelle D., et al. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. **The Journal of Immunology**, 2009, jimmunol. 0902497.
- TATE, Michelle D., et al. The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. **PloS one**, 2011, 6.3: e17618.
- TATE, Michelle D.; BROOKS, Andrew G.; READING, Patrick C. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. **Respiratory research**, 2008, 9.1: 57.
- TRIPATHI, Shweta; WHITE, Mitchell R.; HARTSHORN, Kevan L. The amazing innate immune response to influenza A virus infection. **Innate immunity**, 2015, 21.1: 73-98.

TUMPEY, T. M. et al. Pathogenicity of Influenza Viruses with Genes from the 1918 Pandemic Virus: Functional Roles of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Limiting Virus Replication and Mortality in Mice. In: (Ed.). **J Virol**, v.79, 2005. p.14933-44. ISBN 0022-538X (Print)1098-5514 (Electronic).

VAN DE SANDT, Carolien E.; KREIJTZ, Joost HCM; RIMMELZWAAN, Guus F. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. **Viruses**, 2012, 4.9: 1438-1476.

VIGIL, D. et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842-57, Dec 2010. ISSN 1474-175x.

VOJTEK, A. B.; DER, C. J. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 273, n. 32, p. 19925-8, Aug 7 1998. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 5, p. 843-6, Mar 1 2005. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533.

World Health Organization. Influenza (Seasonal). Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. Acesso em: 11 out. 2017.

WRIGHT, P. et al. **Orthomyxoviruses**. 6th edn. 2013.

ZHANG, S. et al. "Ras regulates alveolar macrophage formation of CXC chemokines and neutrophil activation in streptococcal M1 protein-induced lung injury. **European journal of pharmacology** 733 (2014): 45-53.

ZLOTNIK, Albert; YOSHIE, Osamu. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, 2000, 12.2: 121-127.