

Braulio Henrique Freire Lima

Estudo da inibição da PI3K $\gamma$  e seu efeito modulatório na inflamação desencadeada por ligantes do TLR9 em modelos *in vitro* e *in vivo*

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 06 de setembro de 2016



Braulio Henrique Freire Lima

Estudo da inibição da PI3K $\gamma$  e seu efeito modulatório na inflamação desencadeada por ligantes do TLR9 em modelos *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário para a obtenção do título de Doutor em Imunologia

Orientação: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

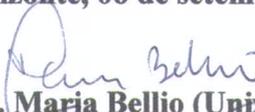
Belo Horizonte, 06 de setembro de 2016



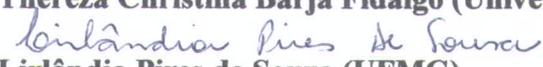
Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRAULIO HENRIQUE FREIRE LIMA.** Aos seis dias do mês de setembro de 2016 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Estudo da inibição da PI3Ky e seu efeito modulatório na inflamação desencadeada por ligantes do TLR9 em modelos *in vitro* e *in vivo*"" , requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Bellio (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovado; Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo (Universidade do Estado do Rio de Janeiro), aprovado; Dra. Lirlândia Pires de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de setembro de 2016.

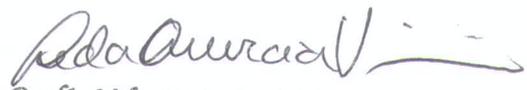
  
 Dra. Maria Bellio (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

  
 Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

  
 Dra. Lirlândia Pires de Souza (UFMG)

  
 Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)

  
 Dra. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)

  
 Prof<sup>a</sup> Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

**“Utopia have a tendency of coming true...  
all we need is a little pacience.”**

Rutger Bregman, TEDxMaastricht

## **Agradecimentos**

Primeiramente eu gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Mauro. Muito obrigado pelas oportunidades (doutorado, doutorado sanduíche, o projeto NanoValid), incentivos, auxílios, pela ajuda mais que necessária quando eu estava com problemas na Inglaterra e pela confiança depositada ao aceitar um novo projeto de doutorado (este que está sendo apresentado) após meu retorno ao Brasil. Apesar de alguns erros, aprendi muito com isso tudo. Meus sinceros agradecimentos.

Em segundo, gostaria de agradecer aos dois professores Dr. Gustavo e Dr. Remo e ao Dr. Pedrelas que me auxiliaram nesse novo projeto desenvolvido após o meu retorno. Sem a ajuda e colaboração de vocês este projeto não estaria onde está hoje, podem ter certeza! Muito obrigado!

Gostaria de agradecer imensamente à Ilma (escudeira do Imunofar) e à Frank por segurarem literalmente as pontas do laboratório e permitir que nosso trabalho seja feito da melhor maneira possível. Sem a presença de vocês esse lugar seria um “Deus nos acuda”  $10^{23415}$  vezes maior, podem ter certeza! Muito obrigado!!! Claro que eu não poderia esquecer da Ildinha, que além de ajudar no trabalho pesado da organização do lab, nos provê os quitutes e a nossa Coca-Cola sagrada de todo dia! Brigadao!

Ao Dr. Flávio e Dra. Vanessa, que sempre estiveram presentes para uma boa discussão sobre experimentos, resultados, teorias e sempre se mostraram disponíveis para ajudar quando precisasse. Gostaria também de agradecer ao Celso com a ajuda imensurável com as histologias. Muito obrigado

À Tânia, que é a responsável pela parte burocrática do lab e que sem ela o lab também não funcionaria apropriadamente! Obrigado!

I would also like to thank GSK for the opportunity to be inside one of the biggest pharma industry in the world and get this experience that is priceless. I would also like to thank Dr. Isro Gloger and Dra. Edith Hessel for the trust they put on me and believing that I would correspond to their expectations.

I cannot forget Dr. Augustin Amour and Dr. Mark Lennon, my advisors while I was in England. Thank you both for your patience and knowledge shared with me throughout this time we spent together! I'll take it wherever I'll go. I would

also like to thank to other researchers at GSK like Nikolai, Srividya, Rick, Paul and the others, thanks a lot!

How forget Ben Calvert? This amazing mate! Thank you a lot for your friendship, support, pubdays, jokes and amazing moments we had over one year in that cold and rainy, and cloudy and foggy and exciting (but not) Stevenage. Thanks for introducing me the most amazing beer, Doombar, and at the same time the most f\*\*\*\*ng terrible one, Amigos (interestingly, Amigos in Portuguese means Friends. But the point is, what kind of friend buys it to his mate??? Haha-haha). Thanks a lot, and I didn't forget our Oktoberfest and Carnival party!

I would also like to thank all the other IPs I met at GSK (I'll name some of them and I know for sure I'll forget some people, so don't be sad if that happens): Mehaab, Michael, Issy, Yash, Bret, Katie, Carlos, Ben Moore, Alina Hannah, Vlad, Oliver... Thank you all!!!

Ao Fabio Vigil, pelos 11 anos de amizade que começou na graduação, continuou pelo mestrado no mesmo depto e foi coroado pelo ano ótimo que tivemos em Londres. Valeu pela parceria e apoio incondicional naquela cidade até então desconhecida, man!!!! Ao Elisão pelos também 4 anos de graduação mais os 6 anos de trabalho em conjunto no Imunofar. Por isso que essa brotheragem não falha, é tempo pra daná! Valeu demais pelos papos sérios e descontraídos, sinceros mas zuados, lúcidos porém viajados. Valeu e pela parceria no lab e na vida!

Aos amigos do peito Polidoro, Ruiz, Lion, André e Cristina pelo companheirismo, amizade, respeito e apoio sempre, mesmo que de longe! Aos colegas de faculdade Alf, Nath, Marina, Gingola, Carina, Xexeu, Lucao, Zequinha, Mestre e todos aqueles que não estão nessa lista (me desculpe o esquecimento) mas que me ajudaram de alguma forma a passar por esse caminho de forma mais suave e agradável. Meu muito obrigado!

Aos colegas de Imunofar Cristiana, Luciana, Izabela Adriano, Aninha, Lívia, Nath, Daiane, Rosália, Flávia, Leandro, Vivian, Carol, Cisalpino, Renata, Caio, Rayssa, Denise, Matheus e Lucas, obrigado pela convivência, troca de experiências e disponibilidade em ajudar sempre! Marina, além do já expresso,

MUITO obrigado pela ajuda inestimável nesse fim de doc em que os experimentos não pararam... ta salvando!!! Ao Pedro, Elisão, Juliana, Rebeca, Thiago, Bruno e Fernando, além do já dito, obrigado por fazerem parte da sensacional equipe Ressaca!!!

Às professoras Dra. Maria Cristina Barja-Fidalgo, Dra. Maria Belio, Dra. Lirlândia Souza e Dra. Leda Vieira por aceitarem fazer parte dessa banca e contribuírem ainda mais com meu aprendizado e crescimento.

Aos meus amigos de BH do Colégio Santo Agostinho pelos bons momentos que passamos sempre que nos encontramos, pelo apoio e torcida. Aos meus companheiros de Basquete Parrots por me permitirem novamente a prática do esporte que mais amo e por me proverem, além das competições, um ambiente muito amigável e agradável toda segundinha. Ao meu professor de baixo, Acácio, que a cada terça-feira, além de me ensinar muito, também me permite fugir, nem que por um momento, do mundo real e entrar no mundo muito loco da música e assim poder desestressar, relaxar e trocar bons papos! A TODOS vocês, meus sinceros agradecimentos!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, representados pelo Orlando e funcionários pelo apoio administrativo. Às agências financeiras CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro. Muito obrigado.

Gostaria também de agradecer à minha família, meus pais Rita e Fernando e meu irmão Plínio pelo apoio, compreensão e incentivo durante todo este percurso, ainda mais no final desta caminhada que não é um período fácil e é quando você às vezes cogita se seria capaz de realizá-lo. A ajuda de vocês vale muito! Muito obrigado pelo apoio e torcida.

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Justificativa do Projeto .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Metodologia .....</b>	<b>39</b>
4.1	Estudos <i>in vitro</i> .....	39
4.1.1	Isolamento de PBMCs .....	39
4.1.2	Estimulação e tratamento de PBMCs com agonistas específicos para TLR e inibição de PI3K, proteína G e AKT.....	39
4.1.3	Quantificação de citocinas no sobrenadante.....	39
4.1.4	Quantificação de proteínas intracelulares .....	40
4.1.5	Teste de viabilidade celular – Live/Dead.....	40
4.2	Estudos <i>in vivo</i> .....	41
4.2.1	Animais.....	41
4.2.2	Modelo de Pleurisia induzida por CpG e lavado pleural .....	41
4.2.3	Modelo de Silicose.....	42
4.2.4	Modelo de lesão hepática induzida por drogas – DILI.....	42
4.2.5	Quimeras.....	42
4.2.6	Coleta do soro e fígado.....	43
4.2.7	Espirometria.....	44
4.2.8	Lavado Bronco-alveolar (BAL) e coleta dos pulmões.....	44
4.2.9	Contagem total e diferencial de células.....	44
4.2.10	Processamento tecidual para dosagem de citocinas/quimiocinas, NAG e MPO .....	45
4.2.11	Dosagem da atividade de NAG tecidual.....	46
4.2.12	Dosagem da atividade de MPO tecidual .....	46
4.2.13	Quantificação de Hidroxiprolina (OH-prolina) tecidual.....	47
4.2.14	Quantificação dos níveis de ALT plasmático.....	47
4.2.15	Quantificação dos níveis de glutatona hepática.....	48
4.2.16	Análise histológica .....	48
4.2.16.1	Modelo de Silicose .....	48
4.2.16.2	Modelo de falência hepática.....	49
4.2.17	Análise dos resultados.....	49

<b>5</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>51</b>
5.1	Ligantes de TLR são capazes de estimular PBMCs, porém somente a atividade de TLR9 é inibida com o bloqueio de PI3K $\delta$ .....	51
5.2	A inibição de diferentes isoformas da PI3K também inibe a atividade de TLR9 .....	53
5.3	Estimulação de PBMCs com CpG leva a ativação de PI3K $\gamma$ .....	54
5.4	A estimulação de CpG concomitante com a inibição de PI3K $\gamma$ não diminui a viabilidade celular .....	55
5.5	Padronização de um modelo de pleurisia induzida por CpG.....	56
5.6	Ausência de PI3K $\gamma$ diminui o recrutamento de células causado por CpG na pleura .....	58
5.7	Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tem menos inflamação e fibrose pulmonar induzidas por sílica e conseqüentemente melhores parâmetros funcionais do pulmão.....	60
5.8	Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou tratados com AS605240 são protegidos da lesão hepática induzida por paracetamol .....	64
5.9	O Tratamento com AS605240 é mais eficiente que NAC na reversão da lesão hepática.....	73
<b>6</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Material suplementar</b> .....	<b>88</b>
8.1	Valores de -logIC <sub>50</sub> dos inibidores de PI3K (M).....	88
8.2	Tabela com os valores das curvas de estimulação para os agonistas representados na Figura 1.....	88
8.3	Gráficos individuais de cada citocina plotada no Heatmap da Figura 2 .....	89
8.4	Inflamação induzida por sílica em animais WT e TLR9 <sup>-/-</sup> .....	90
<b>9</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>93</b>

## Índice de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático do processo inflamatório desde o seu início até a sua resolução. ....	23
Figura 2: desenho esquemático mostrando a localização e a via de sinalização dos diferentes TLRs de mamíferos (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013). ....	29
Figura 3: Perfil de expressão genética das isoformas de PI3K em diferentes tecidos .....	33
Figura 4: Desenho esquemático demonstrando o complexo sistema de sinalização celular que a PI3K desencadeia. Fonte: <a href="http://www.cellsignal.com">www.cellsignal.com</a> .	35
Figura 5: Somente a produção de citocinas de PBMCs estimulados com CpG é prejudicada após a inibição de PI3K $\delta$ .....	52
Figura 6: PI3K $\gamma$ está mais envolvida na produção de citocinas perante estimulação de TLR9 do que PI3K $\delta$ , no entanto, as duas isoformas agem de forma sinérgica para a função completa do receptor.....	53
Figura 7: A estimulação de PBMCs com CpG leva a formação de p-AKT de forma PI3K $\gamma$ dependente. ....	55
Figura 8: PBMCs estimulados com CpG e tratados com o GSK'723 não tem a sua viabilidade alterada. ....	56
Figura 9: Injeção de CpG na pleura induz o recrutamento de células para a cavidade pleural.....	57
Figura 10: A inflamação pleural induzida por CpG tem seu pico com 12 após o estímulo. ....	58
Figura 11: A ausência de PI3K $\gamma$ diminui a inflamação na pleura induzida por CpG. ....	59
Figura 12: A ausência de PI3K $\gamma$ resulta em menor inflamação e fibrose pulmonar induzida por sílica. ....	61
Figura 13: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> possuem menor infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar que os animais WT. ....	62

Figura 14: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> possuem menor deposição de colágeno no parênquima pulmonar que os animais WT. ....	63
Figura 15: A ausência de PI3K $\gamma$ preserva os parâmetros fisiológicos dos pulmões dos camundongos expostos à sílica. ....	64
Figura 16: A ausência de PI3K $\gamma$ resulta em menor lesão hepática induzida por paracetamol e também em menor recrutamento de neutrófilos para o fígado. ....	65
Figura 17: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605340 possuem menor área de lesão hepática induzida por paracetamol que os animais WT. ....	66
Figura 18: A ausência de PI3K $\gamma$ resulta em menos células migradas para as vias aéreas após a administração de paracetamol. ....	67
Figura 19: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 possuem menor lesão remota pulmonar induzida por paracetamol do que animais WT. ....	69
Figura 20: A ausência de PI3K $\gamma$ resgata o fenótipo WT dos parâmetros fisiológicos dos pulmões dos camundongos com falência hepática induzida por paracetamol. ....	70
Figura 21: Tanto animais WT quanto PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> possuem níveis similares de glutatona reduzida e ALT séricos após 2 horas de lesão hepática. ....	71
Figura 22: PI3K $\gamma$ precisa estar ausente tanto nas células mielóides quanto nas células do parênquima para que se tenha proteção completa da lesão hepática induzida por paracetamol. ....	72
Figura 23: a inibição de PI3K $\gamma$ é eficaz no tratamento da lesão hepática induzida por paracetamol mesmo em janelas terapêuticas na qual o tratamento com o padrão-ouro, NAC, não é mais eficaz. ....	73

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Tabela contendo os TLRs já descritos, a espécie em que ele é expresso, sua localização e ligantes exógenos e endógenos de cada receptor.....	27
Tabela 2: Tabela representando as diferentes isoformas de PI3K assim como seu substrato e subunidades regulatórias. ....	33
Tabela 3: Valores de $-\log IC_{50}$ para os inibidores específicos de PI3K. ....	88
Tabela 4: Curvas de estimulação para os agonistas de TLR (Resultado 5.1) ..	88

## **Índice de Figuras Suplementares**

Figura Suplementar 1: Representação gráfica individual de cada citocina plotada no Heatmap da Figura 6. ....	89
Figura Suplementar 2: A ausência de TLR9 resulta em menor inflamação e fibrose pulmonar induzida por sílica.....	90

## Envolvimento em trabalhos científicos

- Artigo 1: MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 56, n. 5, p. n/a–n/a, 2012.....91
- Artigo 2: Paper sobre a importância de PI3K $\gamma$  para a proteção do hospedeiro no modelo de infecção murina com Influenza A. Manuscrito pronto e em processo de submissão. ....92

## Lista de Abreviaturas

- ALT - Alanina aminotransferase
- AnxV – Anexina V
- APAP - acetil-para-aminofenol, paracetamol
- BAL – Lavado broncoalveolar
- BSA – *Bovine Serum Albumine* (Albumina bovina sérica)
- COPD – *Cronic Obstructive Pulmonary Disease* (Doença pulmonar obstrutiva Crônica)
- COX-2 – Ciclo-oxigenase-2
- CpG – Citosina fosfato Guanina
- DAMP – *Damage associated molecular pattern* (padrão molecular associado ao dano)
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA de fita dupla)
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)
- ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbant Assay*
- FEV<sub>100</sub> – *Forced Expiratory Volume in 100 ms* (Volume expiratório forçado em 100 ms)
- FPKM – *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*
- GPCR – *G-protein coupled receptor* (Receptor acoplado à proteína G)
- GSH - Glutathiona
- GSK – GlaxoSmithKline
- HGMB1 - *High-Mobility Group Box 1 Protein*
- HSP70 – *Heat Shock Protein 70*
- HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium bromide*
- IFN – Interferon
- IKK – *Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells* (Inibidor do promotor do gene para a cadeia polipeptídica  $\kappa$  em células B)
- IL – Interleucina
- IRAK – *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase* (Cinase associada ao receptor de Interleucina 1)

- IRF – *Interferon Regulated Factor* (Fator regulado por Interferon)
- IκB – *NFκB Inhibitor* (Inibidor de NFκB)
- JNK – *C-Jun N-Terminal Kinase* (Cinase N-terminal c-Jun)
- KO – *Knock-Out*
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>
- MAL – *MyD88-adaptor-like protein* (proteína adaptadora semelhante ao MyD88)
- MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase* (Proteína cinase ativada por mitógeno)
- MPO – Mieloperoxidase
- mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)
- MSD – *Mesoscale Discovery*
- mTORC – *mammalian target of rapamycin complex* (Complexo alvo de rapamicina de mamíferos)
- MyD88 – *Myeloid Differentiation Primary Response gene 88* (Gene 88 de resposta primária à diferenciação mielóide)
- NAC – N-acetilcisteína
- NAG – N-acetil-glicosaminidase
- NAPQI - *N-acetil-p-benzoquinona-imina*
- NFκB – *Nuclear Factor kappa B* (Fator nuclear kapa B)
- Nø – Neutrófilos
- PAMP – *pathogen associated molecular pattern* (padrão molecular associado a patógeno)
- PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (Células mononucleares do sangue periférico)
- PBS – *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato-salino)
- PDK1 - *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1* (Proteína cnase-1 dependente de 3-fosfoinositídeo)
- PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PI – Fosfatidilinositol
- PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*
- PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

- PRR – *pattern recognition receptor* (receptor de reconhecimento de padrão)
- PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*
- PVDF – *Polyvinylidene fluoride* (Fluoreto de polivinilideno)
- RIP1 – *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein kinase 1* (Proteína cinase interativa com resíduos de serina/treonina de receptor)
- RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
- rRNA – *Ribosomal RNA* (RNA ribossomal)
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SHIP - *SH2 Domain-Containing Inositol 5-Phosphatase 1* (Inositol 5-fosfatase que contém um domínio SH2)
- ssRNA – *Single-stranded RNA* (RNA de fita simples)
- TAB – *TGF-Beta Activated Kinase 1* (Cinase 1 ativada por TGF- $\beta$ )
- TAK – *Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -Activated Kinase* (cinase ativada pelo fator de crescimento transformante  $\beta$  1)
- TGF- $\beta$  – *Transforming growth factor  $\beta$*  (fator de crescimento transformante  $\beta$ )
- TIR – *Toll/IL-1-resistance domain* (domínio de resistência *Toll/IL-1*)
- TLR – *Toll-Like Receptors* (Receptores do tipo *Toll*)
- TMB - Tetrametilbenzidina
- TNF- $\alpha$  – *Tumoral Necrosis Factor alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)
- TRAF6 – *TNF Receptor Associated Factor 6* (Fator 6 associado ao receptor de TNF)
- TRAM – *Translocation Associated Membrane Protein 1* (Proteína de membrana 1 associada à translocação)
- TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*
- WB – *Western Blot*
- WT – *Wild Type*

### Lista de Materiais

Material	Marca	# Catálogo
<i>BD Pharmigen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I</i>	BD	556547
Seringa BD Ultra-Fine™ 30U	BD	10033430026
<i>Bradford (Dye Reagent)</i>	Bio-Rad	5000006
Transaminase ALT (TGP) Cinética	Bioclin	K049
AKT Inhibitor X	Calbiochem	124020
<i>Rabbit Anti-phospho-AKT (Ser473)</i>	Cell Signalling	9271
<i>Rabbit Anti-phospho-NFκB-p65 (Ser536)</i>	Cell Signalling	3031
RPMI 1640	Cultilab	000462
SFB	Cultilab	000063
Azul de Tripán 4%	Dinâmica	3368-47
AS605240	Echelon Biosciences, Inc.	B-0301
Pipeta <i>pasteur</i> descartável	Falcon	357575
NAC	Fluka	01039
Amersham Hybond P 0,45 PVDF	GE Healthcare	10600023
CpG ODN 2395	IDT	Personalizado
BSA Fração V	Inlab	1870
<i>Cell Extraction Buffer</i>	Invitrogen	FNN0011
<i>Human TLR1-9 Agonist Kit</i>	Invivogen	tlrl-kit1hw
Catéter intravenoso 18G	Medcateter	79004
<i>MSD Human IFN-α Tissue Culture Kit</i>	Mesoscale Discovery	K151ACB
<i>MSD Human IFN-β Tissue Culture Kit</i>	Mesoscale Discovery	K151ADB
<i>MSD Human ProInflammatory 7-Plex Tissue Culture Kit</i>	Mesoscale Discovery	K15008B

<b>Material</b>	<b>Marca</b>	<b># Catálogo</b>
<i>MSD Phospho (Ser473)/Total Akt Whole Cell Lysate Kit</i>	Mesoscale Discovery	K15100D
<i>MSD V-Plex Human Pro-Inflammatory Pannel 1</i>	Mesoscale Discovery	K15049D
CpG ODN 2395	Miltenyi	130-100-282
Placa de cultura 96 poços com fundo em U	Nunc	163320
<i>Human TNF-alpha DuoSet ELISA</i>	R&D	DY210
Solução de Turk	RenyLab	66
Goat Anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
<i>Monoclonal Anti-β-Actin clone AC-74</i>	Sigma	A5316
Goat Anti-rabbit IgG-HRP	Sigma	A6154
Histopaque 1077	Sigma	10771-100ML
Paracetamol	Sigma	A3035-1VL
PMSF	Sigma	P7626
<i>Protease Cocktail</i>	Sigma	P2714
Tetrametilbenzidina	Sigma	T2885-100MG
HTAB	Sigma	H6269-100G
<i>Pertussis toxin from B. pertussis</i>	Sigma	P7208
Cetamina 10%	Syntec	-
Xilasina 2%	Syntec	-
DMSO	Synth	01D1011.01.BJ

## Resumo

**Introdução:** TLRs e PI3Ks são proteínas muito importantes para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória robusta e eficiente. Enquanto TLRs são responsáveis por reconhecer PAMPs/DAMPs e iniciar a resposta, as PI3Ks são responsáveis por uma diversa variedade de funções que compreendem a migração, ativação e sobrevivência celular, síntese de proteínas e outros. Como ambas as proteínas têm ações complementares para a ativação celular e desenvolvimento da resposta imune, um desequilíbrio nas suas vias de sinalização poderia levar a respostas inflamatórias excessivas. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel de PI3K na regulação da resposta TLR9.

**Métodos e Resultados:** PBMC de doadores saudáveis foram coletados, estimulados com ODN2395 com ou sem inibidor seletivo PI3K $\gamma$  (GSK-723) e analisados. Para avaliar se a via PI3K interage com a via de TLR9 a fosforilação de AKT e citocinas induzidas por TLR foram medidas. Os níveis de p-AKT começaram a aumentar 30 minutos após a estimulação de TLR9 e, quando as células foram tratadas com a GSK-723, a fosforilação de AKT foi diminuída. Além disso, a estimulação de PBMC com CpG foi capaz de induzir a produção de citocinas (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-6 IL-8, IL-12) que também foi inibida quando as células foram tratadas com a GSK-723. Para estudar se esses achados são relevantes *in vivo* nós avaliamos o papel da PI3K $\gamma$  no contexto de duas doenças diferentes: a silicose e a lesão hepática induzida por drogas (DILI). Para o modelo de silicose, camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram instilados por via intranasal com sílica (10 mg/Kg) e mantidos por 28 dias. Os camundongos WT apresentaram um intenso infiltrado de leucócitos tanto nas vias aéreas e quanto no parênquima pulmonar e uma extensa inflamação do parênquima do pulmão do tipo granulomatosa que se correlacionou com as áreas de fibrose pulmonar. Todas estas alterações resultaram em comprometimento da função pulmonar dos camundongos. No modelo de DILI, camundongos do tipo WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram submetidos a jejum durante 15 h, tratados com paracetamol (APAP) (600 mg / kg) por gavagem e os danos causados no fígado e no pulmão foram avaliadas 24 horas após a administração da droga. Nos camundongos WT, a administração de APAP resultou em altos níveis de ALT no sangue, áreas necróticas no fígado, bem como de influxo leucócitos para o BALF e perda da função pulmonar. De maneira contrária, os camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tiveram menos

danos no fígado medido pelos níveis de ALT no sangue, pequenas áreas de necrose no fígado, menor infiltração de leucócitos nas vias respiratórias e uma melhor função pulmonar, em comparação com camundongos WT. Além disso, os nossos resultados também demonstram que a PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> deve ser inibida tanto nas células do parênquima quanto nas células mielóides para que se tenha proteção hepática. Finalmente, para avaliar se PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> é um bom alvo terapêutico para tratamento nos casos de intoxicação por drogas, o protocolo DILI foi repetido com animais WT divididos em três grupos: veículo, tratados com padrão ouro NAC (600 mg / kg) e tratados com AS605240 (inibidor seletivo de PI3K $\gamma$ ) (20 mg / kg), por gavagem, 6 e 12 horas após a administração do APAP. Os nossos resultados mostraram que o tratamento com AS605240 pode reduzir o dano hepático, mesmo nos tempos em que o tratamento com NAC surte mais efeito.

**Conclusão:** Nossos resultados mostram que a ativação da PI3K $\gamma$  é necessária para a ativação apropriada da resposta induzida por TLR9. Quando a enzima PI3K $\gamma$  está ausente ou é inibida, os agonistas de TLR9 são incapazes de ativar a função completa do seu receptor resultando assim em uma baixa produção de citocinas e menor inflamação. Estes resultados também indicam que PI3K $\gamma$  é um bom alvo terapêutico para o tratamento em doenças uma vez que a atividade reduzida do TLR9 resultou em menor dano tecidual, protegendo assim o hospedeiro de uma resposta inflamatória excessiva.

## Abstract

**Introduction:** TLRs and PI3Ks are very important proteins for the development of a robust and efficient inflammatory response. While TLRs are responsible for the PAMPs/DAMPs recognition and initiate the response, PI3Ks are responsible for a myriad function that comprise cell migration, cell activation, protein synthesis, cell survival and others. As both proteins have complimentary actions toward cell activation and response, an imbalance on their signalling could lead to excessive inflammatory responses so, the aim of this work was to study the role of PI3K in the regulation of TLR9 response.

**Methods and Results:** PBMCs from healthy donors were collected, stimulated with ODN2395 with or without specific PI3K $\gamma$  inhibitor (GSK-723) and then analysed. To evaluate if the PI3K pathway interacts with the TLR9 pathway the phosphorylation of AKT and TLR-induced cytokines were measured. The p-AKT levels started to increase 30 minutes after TLR9 stimulation and when the cells were treated with GSK-723 the phosphorylation of AKT was blunted. Moreover, the stimulation of PBMCs with CpG could induce the production of cytokines (e.g. IFN  $\alpha, \beta, \gamma$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-6; IL-8; IL-12) which was also inhibited when the cells were treated with GSK-723. To study whether these findings are relevant *in vivo* we assessed the role of PI3K $\gamma$  in the context of two different diseases: Silicosis and drug-induced liver injury (DILI). For the Silicosis model, C57 wild type (WT) and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice were instilled intranasally with silica (10 mg/Kg) and kept for 28 days. WT mice had high leukocyte infiltrate in the airways and lung parenchyma and extensive lung inflammation resembling granulomas that was correlated with lung fibrosis. All of these alterations resulted in lung function impairment. In the DILI model, WT and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice were fasted for 15h, treated with acetaminophen (APAP) (600 mg/kg) by oral gavage and liver and lung damage were assessed 24h after drug administration. In WT mice, the administration of APAP resulted in high levels of ALT in the blood, necrotic areas in the liver as well as leukocyte influx to the BALF and loss of lung function. On the contrary, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice had less liver damage measured by ALT levels in the blood, smaller necrotic areas in the liver, lower leukocyte infiltration into the airways and better lung function, when compared to WT mice. Plus, our results also demonstrate that PI3K $\gamma$  must be inhibited in both parenchyma and myeloid cells to achieve hepatic protection. Finally, to evaluate if PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> is a good target for drug treatment in cases

of APAP intoxication, DILI protocol was repeated with WT animals divided in three groups: vehicle, gold standard NAC (600 mg/Kg) and AS605240 (specific PI3K $\gamma$  inhibitor) (20 mg/kg) treated by oral gavage 6 and 12 hours post-APAP administration. Our results showed that AS treatment could reduce the liver damage even in timepoints where NAC have no longer effects.

**Conclusion:** Our results show that activation of PI3K $\gamma$  is necessary for full signalling of TLR9 agonists. When PI3K $\gamma$  is absent or inhibited, TLR9 agonists are unable to exert their full function resulting in lower cytokine production and inflammation. These results also indicate that PI3K $\gamma$  could be a good target for drug treatment in diseases because the lower activity of TLR9 led to less tissue damage protecting the host from excessive inflammatory response.

## 1 Introdução

A Inflamação, provavelmente, é um dos eventos descritos mais antigos nos registros médicos porque, assim como hoje, ela deve ter sido frequentemente vivenciada pelos povos antigos de forma bastante intensa. Símbolos arremetendo à inflamação são encontrados em hieróglifos Sumérios datados de 2700 a.c. e, a atual terminologia dos sinais cardinais da inflamação – dor, calor, rubor e inchaço – foram descritos Cornelius Celsius durante o primeiro século da era cristã. Mais tarde o termo perda de função foi incrementado por Rudolph Virchow, em 1858 (MEDZHITOV, 2010; ROCK et al., 2010).

O processo inflamatório é uma resposta dos tecidos vascularizados contra alguma condição ou estímulo nocivo que pode ser causado por agentes biológicos (vírus, bactérias), físicos (sílica, traumas), químicos (remédios) ou até mesmo metabólicos (dieta) que busca sempre retornar à homeostase. Uma vez iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores (citocinas, quimiocinas, eicosanoides, aminas vasoativas) serão produzidos e liberados pelas células residentes do local acometido. A presença desses mediadores causa mudanças na vasculatura local que vão desencadear: (1) aumento da circulação e permeabilidade vascular e (2) infiltrado de leucócitos. Uma vez no tecido, tanto moléculas solúveis (ex.: anticorpo, complemento, colectinas) que extravasaram do plasma quanto os granulócitos que foram recrutados tentarão neutralizar e eliminar o agente desencadeador da inflamação. Uma vez no tecido e depois de exercer suas funções, os granulócitos entram em apoptose e passam a expressar novas moléculas na sua superfície que vão induzir uma mudança de perfil nos monócitos que estão presentes no sítio inflamado. Com esta mudança do perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório, novos mediadores inflamatórios (ex.: IL-10, lipoxinas) começam a ser produzidas e a recrutar majoritariamente um outro tipo celular, os macrófagos, que vão limpar os debris e estimular a reparação tecidual. Caso a inflamação dure um tempo maior, linfócitos que foram ativados pelas células dendríticas do tecido afetado também participam do processo (MEDZHITOV, 2008; 2010; ROCK et al., 2010) (Figura 1).

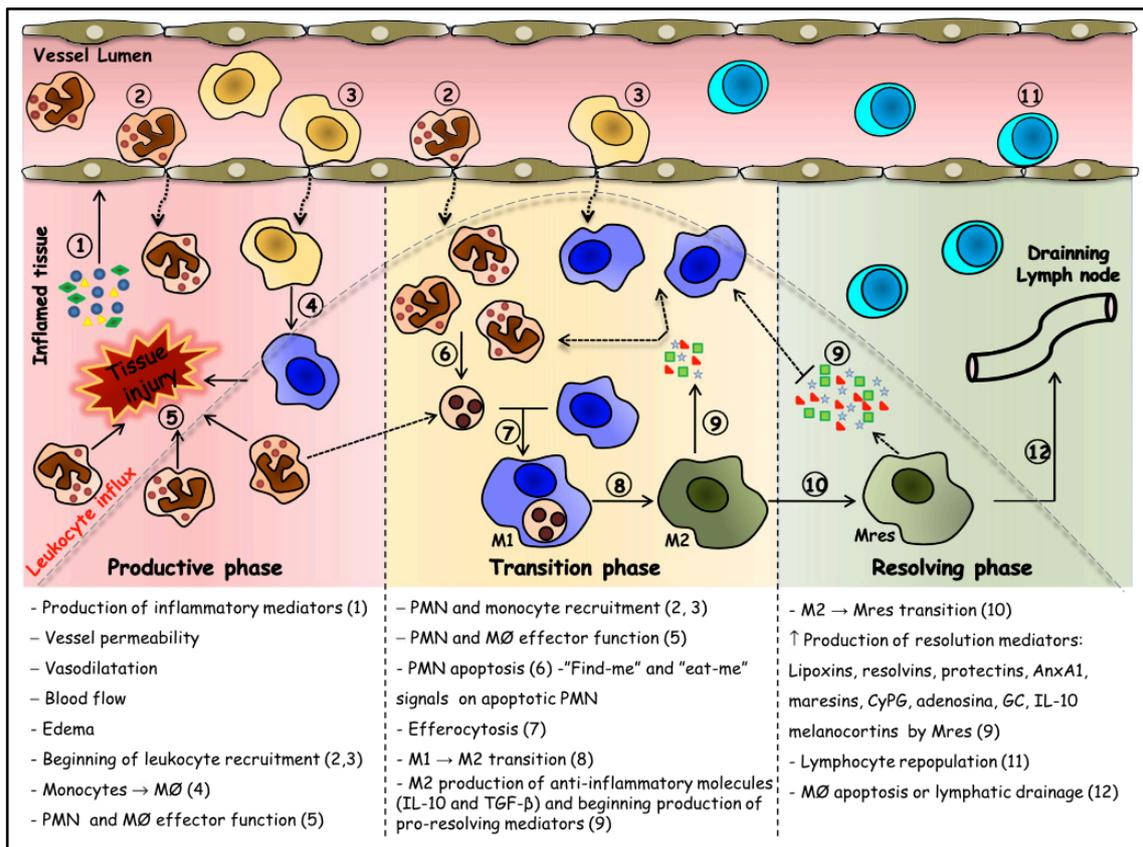


Figura 1: Desenho esquemático do processo inflamatório desde o seu início até a sua resolução.

Nele podemos observar claramente as três fases distintas da inflamação: a primeira fase, ou fase produtiva, onde os principais eventos são o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos para o sítio lesado, a segunda fase, ou fase de transição, na qual tem-se a eferocitose das células apoptóticas e a mudança de perfil das células inflamatórias e a terceira fase, ou fase resolvente, onde os leucócitos remanescentes bloqueiam o recrutamento de novos monócitos/neutrófilos, promovem a reparação tecidual e são drenados para o sistema linfático (ALESSANDRI et al., 2013).

Entretanto, para que a inflamação ocorra de forma efetiva ela precisa ser executada de forma coordenada e autolimitante. De fato, a resposta inflamatória é bem orquestrada para que os eventos sejam sucessivos e aconteçam cada um a seu tempo e lugar correto. Além disso, componentes que participam de forma a promover a inflamação também são responsáveis por começar a desencadear o processo de resolução do mesmo, de modo que, assim que o fator desencadeante do processo inflamatório é resolvido, o processo se resolve pouco depois. Problemas que envolvem tanto a iniciação quanto a resolução do processo inflamatório podem trazer consequências graves para o hospedeiro como reações excessivas, descontroladas, fora do local adequado ou até mesmo crônicas e não resolvíveis (MARQUES et al., 2016; SERHAN; CHIANG, 2013; SERHAN; SAVILL, 2005)

Como mencionado anteriormente, fatores de natureza diversas podem desencadear um processo inflamatório, entretanto, independentemente do agente iniciador dessa resposta, para que ela tenha início, as células residentes do tecido têm que ser capazes de detectar o dano, se ativarem e produzir mediadores que recrutarão outras células do sistema imune. Por sua vez, as novas células que são recrutadas terão que ser capazes de detectar o local da lesão, migrar em direção a este ponto e se ativarem para que estejam aptas a realizarem sua função efetora. Para que isto ocorra apropriadamente, dois tipos de proteína são necessárias, são elas: (1) receptores de reconhecimento padrão, que vão detectar o sinal e (2) proteínas de sinalização intracelular, que vão interpretar o sinal enviado pelo receptor e transmitir a informação para os compartimentos celulares responsáveis por uma determinada reação.

### **1.1 Receptores de conhecimento padrão**

O sistema imune inato é o maior contribuinte para o início da inflamação induzida por microrganismos ou dano tecidual. Apesar de células como os macrófagos e células dendríticas serem de suma importância, células da linhagem não imunológica como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, também expressam estes receptores e são capazes de contribuir para a resposta imune inata. Elas expressam uma série de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que estão codificadas no código genético e permitem que estas células reconheçam a presença de microrganismos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A ideia da existência desses receptores ganhou força em 1989, onde Charles Janeway Jr. propôs em seu discurso no congresso de Cold Spring Harbor que células do sistema imune inato deveriam ter receptores que conseguiriam detectar moléculas padrões nos patógenos e, dessa forma, fazer um link entre a imunidade inata e a adaptativa (JANEWAY, 1989).

Atualmente, 4 classes de PRRs são descritos e eles incluem proteínas que estão localizados tanto em membranas celulares como os Receptores do Tipo Toll (TLRs) e Receptores de Lectinas do tipo C (CLRs) quanto no citosol, como Receptores do tipo RIG-I (RLR) e Receptores do tipo NOD (DE NARDO, 2015; KAWAI; AKIRA, 2009). De todas as classes de PRRs conhecidas, a primeira a ser descoberta e o que mais foi estudado atualmente são os TLRs.

O estudo dos TLRs teve seu início em 1991, na mosca doméstica (*Drosophila melanogaster*) quando dados sobre a sequência genética da porção citosólica do receptor para IL-1 em humanos revelaram que ele era homólogo ao de uma outra proteína, na mosca, chamada *Toll* (GAY; KEITH, 1991). Entretanto, este resultado foi tido como inesperado pela comunidade científica, uma vez que a única função conhecida até então para esta molécula era a de promover a polarização dorsoventral das larvas da mosca (ANDERSON; JÜRGENS; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1985). Estudos posteriores demonstraram que a ativação de *Toll* sinaliza intracelularmente via uma proteína chamada *Dorsal* e que esta compartilha um domínio homólogo REL com outra proteína de mamíferos, já conhecida, chamada fator nuclear *kappa* B (NFκB) (STEWART, 1987) e, naquele tempo, já era sabido que a ativação de NFκB estava relacionado à resposta a bactérias Gram negativas, sendo considerado uma das mais importantes moléculas relacionadas à inflamação e infecção (SEN; BALTIMORE, 1986).

Subsequente a estes fatos, duas descobertas impulsionaram a busca por um receptor semelhante ao *Toll* em mamíferos. O primeiro deles, foi a descoberta da proteína N em 1994, em plantas, que conferia proteção ao vírus do mosaico do tabaco. Esta proteína tinha o domínio citoplasmático semelhante à do *Toll* e da IL-1R1; domínio este que ficou conhecido como TIR (domínio de resistência Toll/IL-1) (WHITHAM et al., 1994). O segundo fato foram os achados de Lemaître e Hoffman, em 1996, que mostraram que moscas adultas que não conseguem sinalizar apropriadamente via *Toll* são incapazes de combater infecções fúngicas (LEMAITRE et al., 1996).

Essa busca por este receptor resultou na descoberta, em 1997, por Medzhitov e Janeway no que viria a ser mais tarde o TLR4 e do seu ligante, o lipopolissacarídeo (LPS) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Essa descoberta impulsionou a pesquisa no campo dos TLRs e nos anos subsequentes outros TLRs foram descobertos até que, no ano de 2000, o TLR9 juntamente com seu ligante, DNA rico em porções CpG não metilado, foi descrito (HEMMI et al., 2000).

Os receptores TLRs são proteínas transmembrana que estão localizados tanto na membrana plasmática – TLR1, 2, 4, 5 e 6 – quanto em vesículas ou endossomos – TLR4, 7, 8, 9 (Figura 2). Na membrana, eles geralmente estão

expressos como monômeros mas, a presença do seu ligante induz sua dimerização e sinalização intracelular (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016; TAKEDA, 2004). Vários estudos elucidaram o padrão de expressão dos TLRs nos diferentes tecidos animais sendo que a grande maioria dos tecidos testados expressavam pelo menos um receptor e vários outros tecidos expressavam vários TLRs ao mesmo tempo. Os fagócitos profissionais são as células que expressam a maior diversidade de combinações de TLRs. Além destas, células não imunes também expressam TLRs, principalmente aquelas situadas em posições de barreira como a pele (queratinócitos), trato respiratório (epitélio das vias aéreas e pulmonar), trato gastrointestinal (células trato intestinal, hepatócitos) e trato genitourinário (epitélio vaginal e cervical) (BARNIE et al., 2014; HORNUNG et al., 2002; SANDOR et al., 2005; SUN et al., 2016).

Estes receptores são capazes de reconhecer uma vasta gama de moléculas estruturais dos microrganismos que são altamente conservadas entre as espécies, que são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além dos PAMPs, evidências recentes indicam que os PRRs são capazes de reconhecer também moléculas endógenas do hospedeiro que, em situações normais não estão expostas ao sistema imune inato, mas que, em situações adversas, são liberadas. Estas moléculas são chamadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016; CHEN; NÚÑEZ, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010) (Tabela 1).

Receptor	Espécie	Localização	Ligante	
			PAMP	DAMP
TLR1/2	H, C	MP	Lipoproteínas triaciladas	Desconhecido
TLR2	H, C	MP	Zimosan Lipoproteínas Peptideoglicano Ácido lipoteicóico	Versican
TLR3	H, C	E	dsRNA	mRNA
TLR4	H, C	MP e E	LPS	B-Amiloide Lipoproteínas oxidadas de baixa densidade
TLR5	H, C	MP	Flagelina	Desconhecido
TLR6/2	H, C	MP	Zimosan Ácido lipoteicóico Lipoproteínas diaciladas	Versican β-Amilóide Lipoproteínas oxidadas de baixa densidade
TLR7	H, C	E	ssRNA	RNA hospedeiro Imunocomplexos
TLR8	H, C	E	ssRNA	RNA hospedeiro Imunocomplexos
TLR9	H, C	E	DNA CpG Híbridos de DNA:RNA	Cromatina DNA hospedeiro Imunocomplexos IgG
TLR10	H	MP	Desconhecido	Desconhecido
TLR11	C	E	Flagelina Profilina	Desconhecido
TLR12	C	E	Profilina	Desconhecido
TLR13	C	E	rRNA 23S	Desconhecido

Tabela 1: Tabela contendo os TLRs já descritos, a espécie em que ele é expresso, sua localização e ligantes exógenos e endógenos de cada receptor.

H = humano; C = camundongo; MP = membrana plasmática; E = endossomo (DE NARDO, 2015).

Como mencionado anteriormente, a presença do antígeno induz a dimerização e reconhecimento do mesmo pelos TLRs. A dimerização do receptor é de extrema importância, pois é ela que vai permitir a fosforilação do domínio TIR e o recrutamento e formação de um complexo proteico que vai resultar na ativação de NFκB de forma MyD88 dependente ou na ativação de fatores regulatórios de IFN (IFR) de forma TRIF dependente (DE NARDO, 2015) (Figura 2).

A via de MyD88 é utilizada por todos os TLRs com a exceção do 3, que utiliza TRIF como molécula adaptadora. A exceção dessa regra é o TLR4, que é capaz de ativar as duas vias de sinalização. Adicionalmente ao MyD88, os TLRs 1; 2; 4; 6 e 10 podem recrutar também uma segunda molécula, MAL (proteína

adaptadora semelhante ao MyD88), que servirá como um *link* entre o domínio TIR dos TLRs e MyD88. Em seguida, MyD88 recruta para o complexo a proteína cinase associada ao receptor de IL-1 4 (IRAK4) que irá fosforilar IRAK1 e 2. Após isso, o complexo IRAK se separa do MyD88 e se liga ao fator associado ao receptor de necrose tumoral (TNF) 6 (TRAF6) que, por sua vez, ativa o trímero proteico formado pela cinase ativada pelo fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 1 (TAK1), cinase TGF- $\beta$  ativada 2 (TAB2) e 2 (TAB3) através de poliubiquitinação e iniciando assim a ativação de NF $\kappa$ B e MAPKs. A ativação de NF $\kappa$ B acontece quando o complexo trimérico TAK1/TAB2/TAB3 fosforila e ativa o dímero de cinases de inibidores do fator nuclear  $\kappa$ B  $\alpha$  e  $\beta$  (IKKs). Por sua vez, este dímero ativado fosforila a molécula de I $\kappa$ B que está associada ao NF $\kappa$ B levando à sua ubiquitinação, dissociação do complexo e posterior degradação pelo proteassoma. Essa degradação permite então a liberação da molécula de NF $\kappa$ B e sua translocação para o núcleo. Em paralelo, TAK1/TAB2/TAB3 também ativam a via das MAPKs através da fosforilação de MKKs que resultarão na ativação de p38 e JNK (cinase N-terminal c-Jun). A ativação destas MAPKs resulta na ativação e translocação para o núcleo dos fatores de transcrição CREB e AP-1 que, juntamente com NF $\kappa$ B estimularão a transcrição de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias.

TRIF é outra molécula adaptadora utilizada por TLRs para a transdução do sinal, entretanto, apenas o TLR3 utiliza esta molécula e o TLR4 pode também utilizá-la em uma via de ativação alternativa. Enquanto TLR3 recruta TRIF diretamente para o domínio TIR, TLR4 necessita da presença da molécula adaptadora TRAM para que o complexo TIR/MyD88 se forme. A interação entre TRIF e TRAF3 ativa IKKs não canônicas como por exemplo IKK $\epsilon$  que vai culminar na fosforilação de IRF3 e IRF7. As IRFs fosforiladas são então translocadas para o núcleo onde irão desencadear a transcrição dos genes de interferons (IFN) tipo I.

Vale ainda notar que a ativação dos TLRs 7; 8; 9 e 13 em endossomos tardios é capaz de levar à fosforilação de IRF7 via interação de TRAF3 e IRAK2 e que TRIF também é capaz de ativar tardiamente NF $\kappa$ B e MAPKs por meio da ativação de TRAF6 via interação com a proteína cinase interativa com resíduos

de serina/treonina de receptor 1 (RIP1) (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

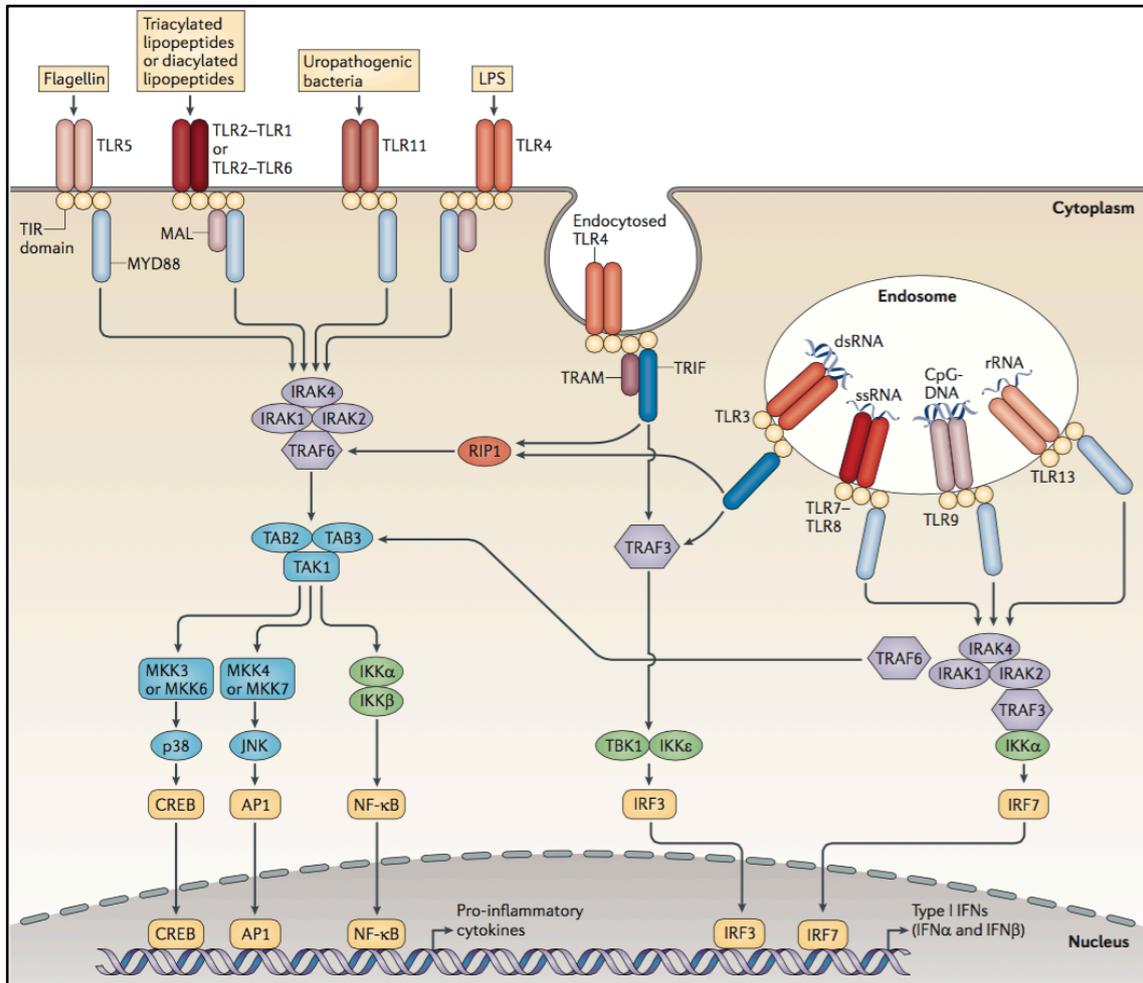


Figura 2: desenho esquemático mostrando a localização e a via de sinalização dos diferentes TLRs de mamíferos (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

## 1.2 Proteínas de sinalização celular

Para que um sinal extracelular chegue ao núcleo e a célula possa responder àquele estímulo é preciso que haja um meio de comunicação entre a membrana plasmática/endossomal e o núcleo. O processo responsável por esta conexão chama-se via de transdução de sinal. A transdução de sinal se baseia em sucessivas modificações moleculares que vão criar um sítio de ancoragem para outras moléculas, induzir um rearranjo estrutural que permite/bloqueia interações moleculares e atividades enzimáticas ou até mesmo o endereçamento da molécula para degradação.

Um evento comum no início da via de transdução de sinal é a adição de um resíduo de fosfato em aminoácidos específicos da porção citosólica do receptor (tirosina, serina, treonina) e as enzimas que fazem esta função são chamadas de cinases proteicas. Posteriormente na via de sinalização, podem ser ativadas cinases que não fosforilam outras proteínas, mas lipídeos por exemplo. Estas proteínas são chamadas de cinases lipídicas. Para cada tipo de evento de fosforilação existe uma fosfatase correspondente, que são enzimas que vão remover o resíduo de fosfato e assim, na maioria das vezes, possuir um efeito inibitório na via de transdução de sinal.

A fosforilação de proteínas não é a única modificação pós-translacional que está relacionada à transdução de sinal intracelular. Dentre os outros tipos de modificações podemos incluir a ubiquitinação, a adição de lipídeos e acetilações ou metilações (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). Dentre as várias proteínas que fazem parte das diversas vias de sinalização celular, uma cinase em particular tem ganhado bastante atenção da comunidade científica devido a sua capacidade de regular diversas funções celulares. Esta proteína é a PI3K.

*Phosphoinositide 3-kinases*, ou PI3Ks, são cinases lipídicas intracelulares cuja função é catalisar a fosforilação do grupo hidroxila localizado na posição 3 do anel de inositol presente na molécula lipídica fosfatidilinositol (PI). Três tipos diferentes de PI podem ser obtidos como resultado da fosforilação por PI3Ks, são eles: PI; PI-4-fosfato (PI4P) e PI-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>). Ambos, o substrato e o produto desta reação, são moléculas que estão presentes tanto no folheto interno da membrana plasmática quanto em outras membranas intracelulares e, dessa forma, a ação final da atividade das PI3K é gerar sítios de ancoragem para outras proteínas da via de sinalização celular permitindo assim que a célula em questão possa responder a um determinado estímulo (ROMMEL et al., 2007).

O estudo das PI3K tem seu início na década de 1980. Naquela época tinha-se bastante interesse em entender a via de sinalização celular ativada pela hidrólise do PI(4,5)P<sub>2</sub> em diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato pela fosfolipase C. Relatos de vários cientistas mostravam, à época, que algumas oncoproteínas virais (ex.: SRC tirosina cinase ou *polyoma virus middle T antigen* (PMT)) se associavam a algumas cinases lipídicas que utilizavam PI como substrato

(KAPLAN et al., 1986; MACARA; MARINETTI; BALDUZZI, 1984; SUGIMOTO et al., 1984; WHITMAN et al., 1985). No final da década, o grupo de Cantley juntamente com o grupo de Downes finalmente descobriu que a cinase que estava associada às oncoproteínas eram, de fato, PI3Ks, que fosforilavam o agrupamento 3-OH do anel de fosfatidilinositol gerando assim um lipídio que até então era desconhecido: o PI3P (WHITMAN et al., 1988).

Ainda no ano de 1988 ficou demonstrado que a estimulação de neutrófilos com ligantes de receptores acoplados à proteína G eram capazes de induzir a presença de um lipídio com características cromatográficas semelhantes a um PIP<sub>3</sub> e a confirmação formal de que este composto existe em células animais veio em 1989. Ainda, naquela época, os estudos sobre a via de sinalização da insulina estavam em foco e estes esforços também demonstraram que após a estimulação com este hormônio, grandes quantidades de PIP<sub>3</sub> era gerada rapidamente nas células (RUDERMAN et al., 1990; STEPHENS; HAWKINS; DOWNES, 1989; TRAYNOR-KAPLAN et al., 1988; TRAYNOR-KAPLAN; THOMPSON; HARRIS, 1989). Com estas informações, a ideia de que as células em condições basais continham baixos níveis de PI(3,4)P<sub>2</sub> e PI(3,4,5)P<sub>3</sub> mas altos níveis de PI(3)P foi proposta mas que, quando estimuladas por tipos específicos de receptores tirosina cinase ou GPCRs, havia a rápida formação de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sem grandes alterações nos níveis de PI(3)P (HAWKINS; JACKSON; STEPHENS, 1992; STEPHENS; HUGHES; IRVINE, 1991; TRAYNOR-KAPLAN; THOMPSON; HARRIS, 1989).

Com isto, vários grupos foram em busca da purificação da enzima e, diferentes autores encontraram que a atividade catalítica da PI3K está associada à fração de 110 KDa encontrada na cromatografia de coluna (CARPENTER et al., 1990; FRY et al., 1992). Em 1992, por meio da técnica de micro sequenciamento de proteínas facilitou a clonagem do gene para a subunidade catalítica  $\alpha$  de PI3K e assim estabeleceu formalmente que o papel catalítico do heterodímero p85-p110 está de fato na última subunidade (SKOLNIK et al., 1991). Estudos subsequentes revelaram a presença de outras isoformas de PI3K e, em 1997, a subunidade p110 $\gamma$  foi clonada (STEPHENS et al., 1997).

Atualmente, 8 isoformas da enzima são conhecidas em mamíferos e estas estão divididas em três famílias diferentes de acordo com sua estrutura: quatro

isoformas de Classe 1 (PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), três isoformas de Classe 2 (PI3K $C2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e uma única isoforma de Classe 3 (Vps34).

As subunidades catalíticas das enzimas PI3K de Classe 1 são subdivididas em Classe 1A (p110 $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e 1B (p110 $\gamma$ ) e ambas utilizam PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> como substrato. A diferença entre ambos os subgrupos está na sua estrutura proteica e, conseqüentemente, na subunidade regulatória que ela interage. As proteínas de classe 1A existem na célula como um complexo heterodimérico com uma das isoformas da proteína p85; já a p110 $\gamma$ , por não conter o domínio de ligação à p85, se complexa ou com a proteína p101 ou com p87. Por sua vez, Vps34 (única representante da Classe 3) utiliza PtdIns como substrato e tem como subunidade regulatória a proteína Vps15. Por último, temos as PI3K de Classe 2 que é o grupo menos conhecido. Estas PI3K não possuem um domínio de ligação à p85 e também não possuem nenhuma subunidade regulatória, entretanto, acredita-se que extensões amino- e carboxiterminal na subunidade catalítica são capazes de regular sua atividade. Estas proteínas são capazes de utilizar como substrato moléculas de PtdIns porém, em condições específicas, estas enzimas também seriam capazes fosforilar PtdIns4P (Tabela 2) (VANHA-ESEBROECK et al., 2010; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012).

Classe		Unidade Catalítica		Unidade Regulatória		Substrato
		Gene	Proteína	Gene	Proteína	
Classe 1	1A	<i>PIK3CA</i>	PI3K $\alpha$	<i>PIK3R1</i>	p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
		<i>PIK3CB</i>	PI3K $\beta$	<i>PIK3R2</i>	p85 $\beta$	
		<i>PIK3CD</i>	PI3K $\delta$	<i>PIK3R3</i>	p55 $\gamma$	
	1B	<i>PIK3CG</i>	PI3K $\gamma$	<i>PIK3R5</i>	p101	
				<i>PIK3R6</i>	p87	
Classe 2		<i>PIK3C2A</i>	PI3K-C2 $\alpha$			PtdIns e PtdIns4P
		<i>PIK3C2B</i>	PI3K-C2 $\beta$			
		<i>PIK3C2G</i>	PI3K-C2 $\gamma$			
Classe 3		<i>PIK3C3</i>	Vps34	<i>PIK3R4</i>	Vps15	PtdIns

Tabela 2: Tabela representando as diferentes isoformas de PI3K assim como seu substrato e subunidades regulatórias.

PI3K de maneira geral são proteínas ubíquas, entretanto, se considerarmos cada isotipo individualmente, veremos que cada proteína em particular possui um padrão específico de expressão em cada tipo de tecido. Com isso, as 8 isoformas podem ser reclassificadas e, sob esse novo olhar, 3 grupos podem ser formados: (1) o primeiro grupo tem a característica de ser pouco expresso em todos os tecidos analisados e é constituído apenas de um integrante, PI3K-C2 $\gamma$ ; (2) um segundo grupo, composto por PI3K-C2 $\beta$ ; PI3K $\beta$ ; PI3K-C2 $\alpha$ ; Vsp34 e PI3K $\alpha$ , cujos componentes são expressos de maneira homogênea entre os tecidos; (3) e um terceiro grupo, composto por PI3K $\delta$  e PI3K $\gamma$ , que é expresso quase que exclusivamente nos tecidos linfoides (Figura 3) ([www.thehumanproteinatlas.org](http://www.thehumanproteinatlas.org)) (ROMMEL et al., 2007; VANHAESEBROECK et al., 2010).

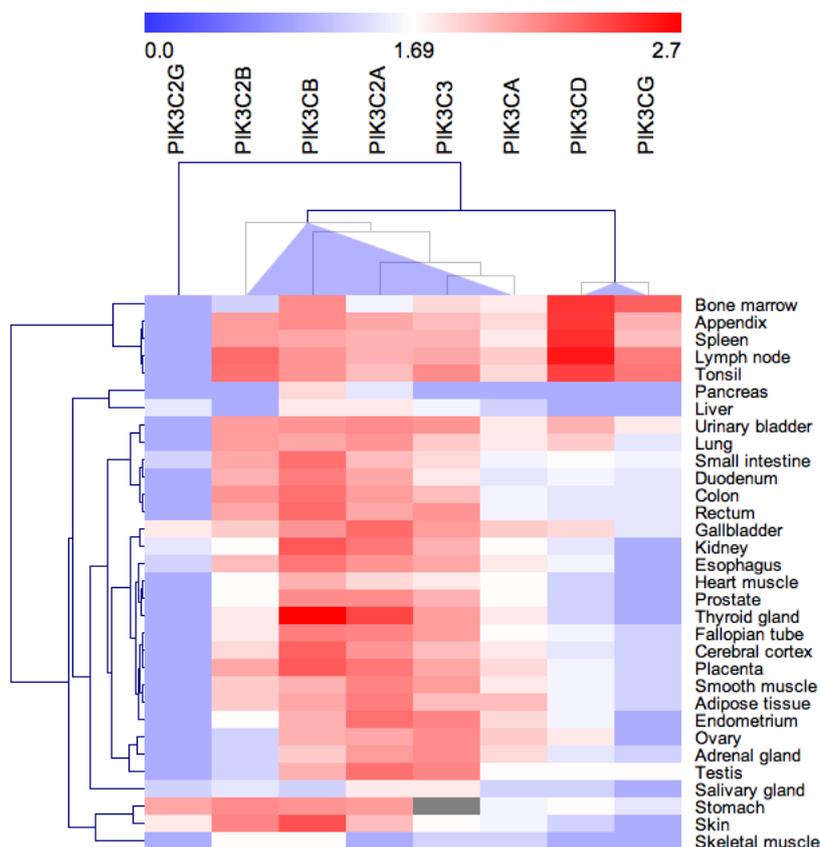


Figura 3: Perfil de expressão genética das isoformas de PI3K em diferentes tecidos

Valores expressos em  $\log(10 \cdot \text{FPKM})$ . Fonte: [www.thehumanproteinatlas.org](http://www.thehumanproteinatlas.org)

Embora a estrutura e função básica das PI3K já serem descritas, as proteínas mais bem estudadas e conhecidas pertencem à Classe 1 e, por isso, o estudo das proteínas dessa classe serão o foco deste trabalho.

Embora pertençam à mesma classe de PI3Ks, as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  se diferem quanto ao seu modo de ativação. Enquanto as isoformas  $\alpha$  e  $\delta$  são ativadas via receptores de tirosina cinase (ex.: receptores de citocinas, receptores para fator de crescimento, hormônios), a isoforma  $\gamma$  é ativada via receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (ex.: receptores de quimiocinas, fMLP, leucotrienos, prostaglandinas). De maneira híbrida, a isoforma  $\beta$  é capaz de ser ativada tanto por receptores tirosina cinases quanto por GPCRs (BACKER et al., 1992; HAWKINS; STEPHENS, 2015; STEPHENS et al., 1994; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012).

Independentemente do modo de ativação, uma vez ativadas todas as PI3K de Classe 1 atuam de forma semelhante convertendo PI(4,5)P<sub>2</sub> em PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (ou PIP<sub>3</sub>). Essa conversão cria um sítio de ancoragem na membrana plasmática que recruta para a região tanto AKT quanto PDK1. A aproximação das duas enzimas permite que PDK1 fosforile AKT na posição T308 iniciando sua ativação. Esta fosforilação inicial induz uma mudança estrutural na AKT que permite que ela sofra uma segunda fosforilação, na posição S473, mediada pelo complexo mTORC2 e assim ativando sua atividade enzimática completa.

Após ativação, AKT interage com diferentes proteínas citoplasmáticas e, dessa forma, a via de PI3K/AKT é capaz de regular diversas funções celulares como por exemplo: síntese proteica (ex.: mTORC1), sobrevivência (ex.: FoxO1 e Bax), ciclo celular (ex.: p21 e p27), metabolismo (ex.: Glicogênio Sintase) e migração celular (HAWKINS; STEPHENS, 2015; JIN et al., 2008; OKKENHAUG, 2013; ROMMEL et al., 2007; WEICHHART; HENGSTSCHLÄGER; LINKE, 2015). Por ser uma via complexa e que abrange várias funções celulares, o início da via de sinalização é regulado por meio de duas fosfatases: a PTEN e a SHIP. Tanto PTEN quanto SHIP diminuem a quantidade de PIP<sub>3</sub> na membrana e, dessa forma, diminuem a ativação de AKT mediada por PI3K (BIRTOLO et al., 2016; SASAKI et al., 2000) (Figura 4). Apesar de causarem o mesmo efeito, estas duas fosfatases agem de maneira diferente na célula: PTEN age de maneira inversa à PI3K, retirando o fosfato na posição 3 do PIP<sub>3</sub> e gerando PI(4,5)P<sub>2</sub>; por sua vez, SHIP diminui a ativação de AKT através da desfosforilação do fosfato na posição 5 do PIP<sub>3</sub>, gerando assim PI(3,4)P<sub>2</sub>.

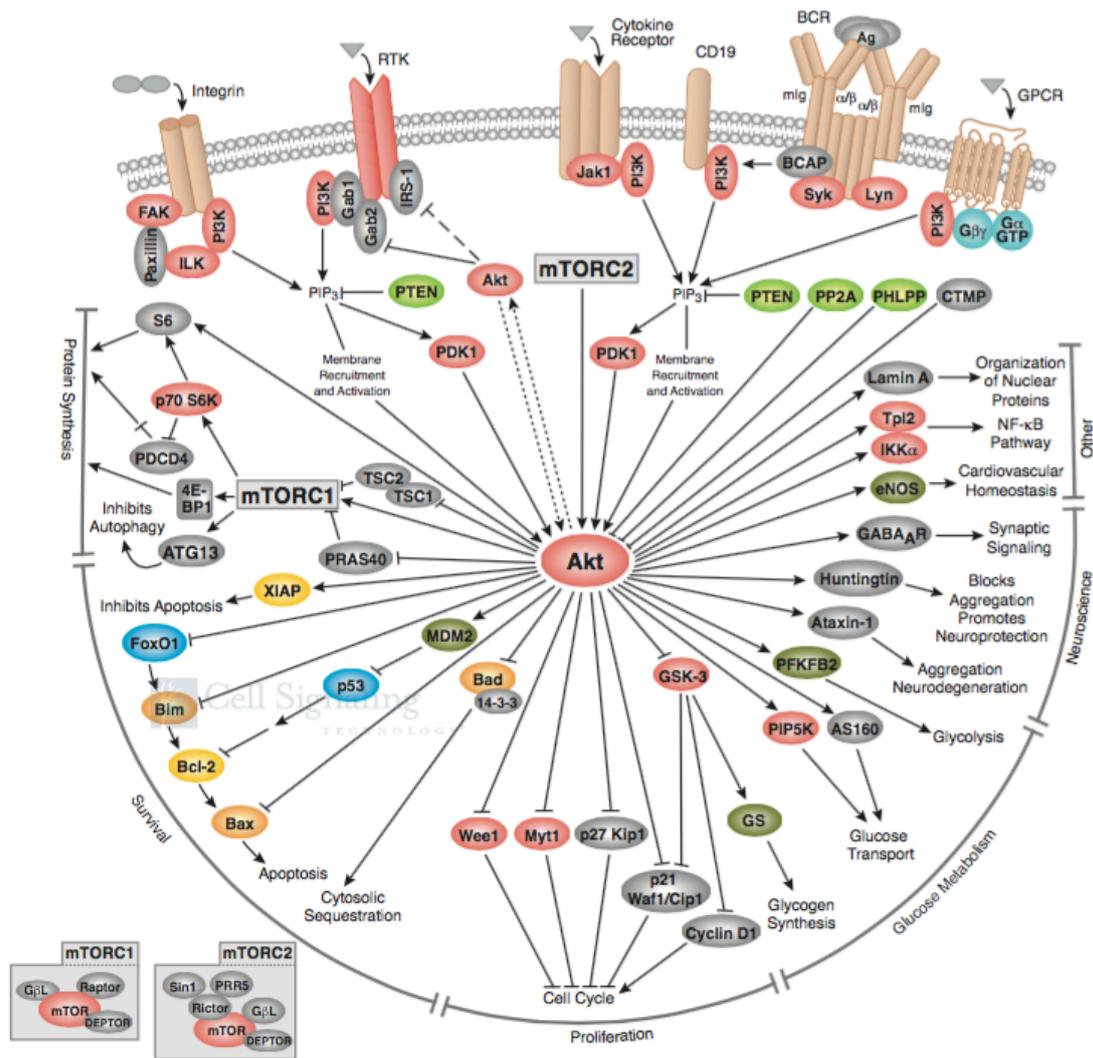


Figura 4: Desenho esquemático demonstrando o complexo sistema de sinalização celular que a PI3K desencadeia. Fonte: [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)

### 1.3 TLRs, PI3Ks e inflamação

Como demonstrado até agora, tanto os TLRs quanto as PI3K são importantes para que o hospedeiro consiga localizar e montar uma resposta inflamatória eficiente em resposta a um dano tecidual, seja ele causado por um microrganismo ou por uma lesão estéril. Entretanto, a própria resposta imune montada pelo hospedeiro que outrora se mostrou benéfica, pode se tornar o principal responsável pela lesão tecidual observada caso ela seja exacerbada, como no caso de influenza, dengue e sepse (GARCIA et al., 2010).

Com a descoberta de que TLR4 está envolvido no reconhecimento de LPS, surgiu a ideia de que a hiperresponsividade dos TLRs pode também estar associado a doenças, como por exemplo na sepse. Evidências da literatura demonstram que a reatividade exacerbada dos TLRs está associada não só a

sepsis (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010), mas também em outros quadros clínicos como em lesões hepáticas (MARQUES et al., 2012), psoríase (RAHMANI; REZAEI, 2016), doenças do trato gastrointestinal (FROSALI et al., 2015), esclerose múltipla (MIRANDA-HERNANDEZ et al., 2011) e outras doenças como lúpus, artrite reumatoide, Alzheimer e asma (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016).

Além dos TLRs, muitos outros receptores relacionados ao sistema imune se enquadram ou como tirosinas cinases ou como GPCRs, dessa forma, eles possuem potencial para também ativarem as PI3Ks. De fato, o número de publicações relacionando as diferentes isoformas de PI3K ao funcionamento do sistema imune vem crescendo e, dentre estas atribuições podemos listar: recrutamento celular (JONES et al., 2003; SMITH et al., 2006), ativação das células, diferenciação e função dos leucócitos (GRACIAS et al., 2016; HAWKINS; STEPHENS, 2015; KULKARNI et al., 2011; OKKENHAUG, 2013; SASAKI et al., 2000).

Uma vez que PI3Ks possuem a capacidade de regular respostas imunes, os leucócitos expressam estas proteínas e a sinalização dos TLRs é dependente de tirosinas cinases, grande importância tem sido dada ao estudo das interações TLR:PI3K e suas consequências.

Dados da literatura demonstram que PI3K é capaz de regular a resposta imune induzida por ligantes de TLR como: CpG, LPS, flagelina e subprodutos de infecções virais (ISHII et al., 2002; OJANIEMI et al., 2003; SARKAR et al., 2004; YU et al., 2006), entretanto, seu papel nessa modulação parece ter efeitos contrários em situações diversas (FUKAO; KOYASU, 2003; RUSE et al., 2006). Alguns autores demonstram que a PI3K tem um papel pró-inflamatório ou seja, que sua atividade é importante para que a estimulação de TLR seja efetiva e assim induzir resposta celular (ARBIBE et al., 2000; GUIDUCCI et al., 2008; LEE et al., 2010; OJANIEMI et al., 2003; RHEE et al., 2006). De maneira contrária, outros estudos demonstram que PI3K age de maneira anti-inflamatória, ou seja, controlando a ativação de TLR e que, uma vez inibida, resulta em uma resposta TLR dependente exacerbada (AKSOY et al., 2012; FUKAO et al., 2002; LIEW et al., 2005; MEDINA; MORRIS; BERTON, 2010; OJANIEMI et al., 2003).

## 2 Justificativa

Como exposto anteriormente, tanto a estrutura quanto a função básica das PI3K são bastante conhecidas. No entanto, como estas proteínas se acoplam com outras moléculas acima delas na via de sinalização bem como seu papel funcional relativo ainda precisam ser melhores descritos (VANHAESEBROECK et al., 2010).

Como revisado por Ruse em 2006 (RUSE et al., 2006), muito dos trabalhos que envolveram o estudo entre PI3K e TLR utilizaram fármacos não seletivos para as isoformas de PI3K, mais especificamente wortmanina ou LY294002 o que torna difícil a distinção do papel individual de cada isoforma nas respostas inflamatórias. Tal diferenciação só foi possível a partir do fim da década de 1990 quando os primeiros animais deficientes para as isoformas  $\gamma$  ou  $\delta$  foram desenvolvidos e posteriormente, a partir de 2003, quando os primeiros fármacos com inibição específica começaram a ser desenvolvidos (VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012).

Além do mais, como revisado por Fukao em 2003 (FUKAO; KOYASU, 2003), grande parte dos estudos que demonstram o papel contraditório da PI3K na sinalização de TLRs foram feitos em linhagens celulares ou células primárias específicas isoladas, o que demonstra que, na verdade, PI3K poderia ter efeitos diferentes sobre a sinalização celular de TLR dependendo do tipo de célula analisado e das condições experimentais.

Apesar de parecerem controversos, os estudos envolvendo PI3K e inflamação levaram ao desenvolvimento de compostos com potencial de serem usados na clínica para tratamento de doenças. Dessa forma, experimentos que se assemelham mais ao que é observado na clínica como o estudo de modelos *in vitro* mais complexos (ex.: cultura celular mista) e modelos *in vivo* que utilizem de inibidores específicos para PI3K são necessários para que se elucide melhor o papel destas enzimas e dê embasamento ao seu uso em humanos.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar a o papel da enzima PI3K $\gamma$  no contexto da resposta imune mediada pela ativação de TLR9

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da inibição de PI3K na produção de citocinas em resposta a agonistas de TLR *in vitro*
  - Estudar os efeitos da inibição de PI3K $\delta$  em PBMCs quando estimulados com diferentes tipos de agonistas de TLR;
  - Avaliar o efeito da inibição específica das diferentes isoformas de PI3K em PBMCs quando estimulados com agonista específico de TLR9;
  - Avaliar a ativação de PI3K quando as células são estimuladas com um ligante específico de TLR9;
- Padronizar um modelo de pleurisia induzida por CpG
  - Determinar a melhor dose de CpG para indução da pleurisia;
  - Determinar o melhor tempo para a avaliação da inflamação;
  - Avaliar o efeito da inibição de PI3K $\gamma$  no modelo de pleurisia;
- Estudar os efeitos da inibição de PI3K $\gamma$  em 2 diferentes modelos murinos de inflamação:
  - Silicose
    - Avaliar os parâmetros da inflamação pulmonar
    - Avaliar os parâmetros da mecânica pulmonar
  - Lesão hepática induzida por paracetamol
    - Avaliar os parâmetros inflamatórios da doença
    - Avaliar o dano remoto causado pela doença
    - Avaliar um possível tratamento para a doença

## **4 Metodologia**

### **4.1 Estudos *in vitro***

#### **4.1.1 Isolamento de PBMCs**

PBMCs foram isolados a partir de doadores saudáveis. Para isso, 25 mL de sangue foi aplicado sobre 15 mL de histopaque 1077 (Sigma) e o gradiente centrifugado a 25°C, a 400 g por 35 minutos, sem aceleração e sem freio. Após a centrifugação, a interface histopaque/plasma foi transferida para um novo tubo de 50 mL e o volume completado para 50 mL. As células foram centrifugadas a 25°C, a 600 g por 10 min, o sobrenadante descartado e depois ressuspendidas com 10 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% SFB (Cultilab). As células viáveis foram contadas usando o azul de tripan (Dinâmica) (proporção 1:10) e a concentração de células corrigida para  $2 \times 10^7$  cel/mL. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo *NRES Committee East of England – Cambs & Herts Reserach Ethics Committee*, nº 07/H0311/103, e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, nº CAAE – 00907612.0.0000.5149.

#### **4.1.2 Estimulação e tratamento de PBMCs com agonistas específicos para TLR e inibição de PI3K, proteína G e AKT**

Para os ensaios *in vitro*, 50 µL da suspensão de células ( $1 \times 10^6$  cel/poço) foram plaqueados em placas de cultivo celular de 96 poços e fundo em U (Nunc). Após o plaqueamento, as células receberam 25 µL de DMSO, dos inibidores (GSK'045 (anti PI3δ) 200 nM; GSK'723 (anti PI3Kγ) 12 µM ou GSK'740 (anti PI3Kpan) 4µM), de toxina pertussis 300 ng/mL (Sigma); ou de Inibidor X de AKT 60 µM (Calbiochem) e foram incubadas por 1 hora. Depois desse período, mais 25 µL de meio contendo os agonistas específicos para TLR (Invivogen/Miltenyi/IDT) foram adicionados a cada poço e as células incubadas. A drogas inibidoras da enzima PI3K foram doadas pela empresa GlaxoSmithKline. A tabela com os valores de  $-\log I_{C_{50}}$  estão no material suplementar (Tabela 3).

#### **4.1.3 Quantificação de citocinas**

Os níveis das citocinas IFN-γ; IL-10; IL-12p70; IL-13; IL-1β; IL-4; IL-6; IL-8; IL2; TNF-α foram mensurados utilizando o sistema MSD (Mesoscale Disco-

very) com o kit V-Plex. Este método é baseado na metodologia do ELISA sanduíche convencional, entretanto, dependendo do kit, ele te permite dosar entre 1 a 10 citocinas simultaneamente no mesmo poço. As citocinas IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\beta$  e IP-10 foram dosadas independentemente. Interferon- $\alpha$ 2a e IFN- $\beta$ , foram dosados utilizando a tecnologia MSD com os kits *Human IFN- $\alpha$ 2a Tissue Culture Kit* e *Human IFN- $\beta$  Tissue Culture Kit*, respectivamente. A dosagem de IP-10 foi feita através da metodologia convencional do ELISA sanduíche (R&D Systems). Para ambas as metodologias, 50  $\mu$ L do sobrenadante dos PBMCs foram utilizados para as dosagens e o protocolo seguido foi o sugerido pelo fabricante seguindo as instruções específicas para cada kit.

#### **4.1.4 Quantificação de proteínas intracelulares**

Os níveis das proteínas AKT total e p-AKT foram dosados pelo método do MSD. Para isso, nos *timepoints* específicos, a estimulação dos PBMCs foi parada adicionando-se PBS gelado e colocando as células a 4°C. As células foram então centrifugadas a 600 *g* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante retirado.

A relação p-AKT/AKT Total foi medida pelo método do MSD e, para isso, as células foram tratadas conforme o protocolo do kit. Brevemente, as células foram lisadas com uma solução já fornecida pelo fabricante contendo detergentes, anti-proteases e anti-fosfatases. A lise foi realizada no gelo e, para a detecção das proteínas, foi realizado um ensaio utilizando o kit Phospho(Ser473)/Total Akt Whole Cell Lysate Kit.

#### **4.1.5 Teste de viabilidade celular – Live/Dead**

Para analisar a viabilidade dos PBMCs após o bloqueio de PI3K e estimulação com CpG,  $1 \times 10^5$  PBMCs foram plaqueados em placas de cultura celular de 96 poços (Nunc). O protocolo experimental utilizado foi o mesmo já descrito anteriormente (item 4.1.2). Após as 24 horas de incubação, as células foram marcadas com anti-Anexina V e com Iodeto de Propídeo como descrito no protocolo fornecido pelo fabricante, BD Pharmigen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD), e lidas no citômetro de fluxo BD Accuri 6 (Becton Dickinson).

## 4.2 Estudos *in vivo*

### 4.2.1 Animais

Camundongos do tipo “selvagem” (WT) da linhagem C57BL/6 foram adquiridos do Biotério Central da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais). Camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes para a enzima PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) foram criados no biotério do laboratório de Imunofarmacologia localizado no ICB, UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório até que atingissem a idade ideal para experimentação (8 a 12 semanas de idade) em condição *specific pathogen-free* (SPF). Todos os animais foram tratados com ivermectina 1% por pelo menos quatro semanas antes de sua utilização e mantidos sob temperatura controlada (25°C), ciclos de iluminação de 12 horas e ração e água disponível *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, nº 51/2011.

### 4.2.2 Modelo de Pleurisia induzida por CpG e lavado pleural

Camundongos WT ou PI3K $\gamma^{-/-}$  foram injetados com quantidades variadas de CpG (IDT) ou, como controle, com salina 0,9% pela via intrapleural. A injeção do CpG foi realizada com uma seringa de insulina 30U (BD), na lateral ventral direita do animal e entre a última e a penúltima costela do animal com um volume de 100  $\mu$ L. Em casos específicos, animais WT foram tratados com um inibidor de PI3K $\gamma$ , o AS605240 (Echelon Biosciences, Inc.), na dose de 20 mg/Kg diluído em salina 0,9% com 0,5% CMC e 0,1% Tween20. O tratamento consistiu de duas administrações: 1 hora antes da injeção de CpG e 6 horas depois da injeção de CpG.

Neste modelo, apenas o lavado pleural foi coletado após 6; 12; 24 e 48 horas após a indução da pleurisia. Para a coleta do lavado, os animais foram anestesiados com câmara de CO<sub>2</sub>. Após a morte dos animais, a cavidade abdominal foi aberta e o diafragma, sem lesões, exposto. Com o auxílio de uma pipeta *pasteur* descartável (Falcon), a cavidade interna do tórax foi lavada 3 vezes com 1 mL de PBS EDTA 10 mM, duas vezes, tentando recuperar o maior volume possível (total de aproximadamente 2 mL) sem danificar a estrutura interna. Com este material foi analisado a contagem total de células assim como a contagem diferencial, como descrito no item 4.2.9.

### **4.2.3 Modelo de Silicose**

A sílica utilizada neste trabalho foi doada pela professora Patrícia Martins Silva, da FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Neste modelo, camundongos WT ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram anestesiados com cetamina 80 mg/Kg e xilasina 15 mg/Kg para a instilação intranasal da sílica. A suspensão de sílica foi preparada com solução salina 0,9% numa concentração de 250 mg/mL e sempre vortexada imediatamente antes de qualquer uso.

Uma vez que os camundongos estavam anestesiados, eles foram colocados em posição anatômica e 40  $\mu$ L da suspensão de sílica (250 mg/mL) previamente homogeneizada foi pipetada na narina do animal. Logo após o termino da instilação os animais foram colocados na posição vertical e observados até que a respiração deles se estabilizasse no padrão normal. Os animais foram então observados por 28 dias e, ao final desse período, a espirometria foi realizada e o BAL e os pulmões foram coletados como descritos nos itens 4.2.7 e 4.2.8.

### **4.2.4 Modelo de lesão hepática induzida por drogas – DILI**

Camundongos WT ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram deixados em jejum por 15 horas e, após esse período, receberam paracetamol – APAP (Sigma) 600 mg/Kg por gavagem. Os animais foram observados por 24 horas e após este período espirometria foi realizada e o soro, fígado, BAL e pulmões foram coletados como descrito nos itens 4.2.7; 4.2.6 e 4.2.8.

Neste modelo, os animais WT também foram tratados com o inibidor de PI3K $\gamma$ , AS605240 (Echelon Biosciences, Inc.) ou com n-Acetilcisteína (NAC) (Fluka), um antioxidante. O tratamento dos animais consistiu na administração, por gavagem, de: (1) AS605240 6 e 12 horas após a administração do APAP; (2) NAC 6 e 12 horas após a administração do APAP; ou NAC 1 hora antes da administração do APAP. O AS605240 foi diluído em salina 0,9% com 0,5% CMC e 0,1% Tween20 e administrado na dose de 20 mg/Kg e o NAC foi diluído em salina 0,9% e administrado na dose de 600 mg/Kg, ambos pela via oral.

### **4.2.5 Quimeras**

Para a realização das quimeras, animais WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> sofreram duas sessões de irradiação gama (Fonte de Cobalto 60, CDTN-UFMG). Na primeira

sessão, os animais foram submetidos a 4 Gy de irradiação absorvida. Três horas após a primeira dose, os animais foram submetidos a uma segunda sessão que, dessa vez foi de 5 Gy. Imediatamente após a segunda dose, os animais receberam  $1 \times 10^7$  células derivadas da medula (sem hemácias) através do plexo orbital. As quimeras geradas foram:

WT  $\rightarrow$  WT;

WT  $\rightarrow$  PI3K $\gamma^{-/-}$ ;

PI3K $\gamma^{-/-}$   $\rightarrow$  WT;

PI3K $\gamma^{-/-}$   $\rightarrow$  PI3K $\gamma^{-/-}$

Os animais que foram submetidos à “quimerização” sofreram também um tratamento intensivo com antibióticos. Este tratamento começou um dia antes das sessões de irradiação e foi suspenso 10 dias depois do procedimento de transplante (MCDONALD et al., 2010). Na sexta semana após o transplante, as células circulantes totais foram contadas para garantir que o processo foi bem-sucedido e só então os animais foram liberados para experimentação.

#### **4.2.6 Coleta do soro e fígado**

Para a coleta do soro, os animais foram anestesiados com cetamina 80 mg/Kg e xilasina 15 mg/Kg. Após a anestesia dos animais, a cavidade abdominal foi aberta, os órgãos rebatidos até que se tivesse acesso à bifurcação da veia cava com a veia renal. Nesse ponto foi feito um corte e o sangue que extravasou foi coletado com uma pipeta *pasteur* descartável e colocado num tubo de microcentrífuga. O sangue foi então incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e depois por mais 10 minutos a 4°C. Após a incubação, a sangue foi centrifugado a 847 g por 10 minutos a 4°C e, uma vez centrifugado, o sobrenadante (soro) foi coletado com o mínimo de hemácias possível.

Após a coleta do sangue, o fígado foi coletado. Manuseando o órgão através da vesícula biliar, separou-se o fígado do diafragma cortando-se os ligamentos e depois cortou-se os ligamentos que uniam o órgão ao jejuno-íleo. Uma vez com o órgão extraído, ele foi lavado com PBS e retirou-se uma parte da porção medial do maior lobo para a histologia. O resto do órgão foi guardado para análise de MPO, glutathiona, citocinas e expressão gênica.

#### **4.2.7 Espirometria**

Para os testes de espirometria cada animal foi pesado previamente à anestesia e recebeu uma dose de anestésico pela via subcutânea com cetamina 200 mg/Kg e xilasina 15 mg/Kg, protocolo sugerido pelo fabricante do espirômetro Buxco Max II. Uma vez anestesiados, a traqueia dos animais foi exposta e canulada com a cânula de calibre médio que vem com o próprio equipamento. Após este procedimento, os animais foram colocados ligados ao espirômetro através da cânula e o protocolo de medições foi iniciado com o respirador automático ligado, frequência respiratória de 160.

#### **4.2.8 Lavado Bronco-alveolar (BAL) e coleta dos pulmões**

Após a eutanásia do animal, com sobredose de anestésico (dose 5x maior que a necessária para induzir anestesia para a instilação), o primeiro procedimento realizado foi a coleta do BAL.

O BAL foi feito através da exposição da traqueia do animal e com posterior canulação da mesma com um cateter intravenoso calibre 18G (Medcateter). Após a canulação, com uma seringa de 1 mL, fez-se o lavado das vias aéreas 1 vez com cada 1 mL de PBS EDTA 10mM, duas vezes, tentando recuperar o maior volume possível (total de aproximadamente 2 mL) sem danificar a estrutura interna.

Após a coleta do BAL, o pulmão esquerdo (lobo único) foi coletado para a histologia e o pulmão direito (4 lobos) para posterior processamento e análise de: (1) deposição de colágeno, (2) citocinas/quimiocinas, (3) atividade de N-acetil-glicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO).

#### **4.2.9 Contagem total e diferencial de células**

Logo após coleta, as células (BAL ou lavado pleural) foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e o *pellet* foi ressuscitado com 100 µL de tampão PBS 1x contendo BSA 1%.

Para a contagem total, as células foram coradas com solução de Turk e contadas com uma Câmara de Neubauer em uma diluição 1:10 utilizando um

microscópio óptico com uma objetiva de 40x. No momento da diluição o volume de cada amostra foi computado para posterior correção.

Para a contagem diferencial,  $5 \times 10^4$  células foram diluídas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1x contendo BSA 3% e preparadas por *cytospin* (Cytospin III, Shandon) – centrifugação por 5 minutos a 450 rpm em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com panótico e a contagem foi feita em microscópio óptico com uma objetiva de 100x utilizando-se óleo de imersão. Os caracteres de diferenciação das células foram: morfologia nuclear, coloração nuclear e coloração citoplasmática, permitindo a diferenciação das células em: eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares.

#### **4.2.10 Processamento tecidual para dosagem de citocinas/quimiocinas, NAG e MPO**

Após a coleta dos órgãos, 50 mg de tecido direito foi pesado para o processamento para análise de citocinas, NAG e MPO.

A amostra foi homogeneizada em 1 mL de uma de uma solução para extração de citocinas (NaCl 0,4 M,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzotônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI aprotinina) e então centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um novo microtubo e congelado para análises posteriores.

O precipitado foi homogeneizado novamente, porém em 1,9 mL de solução tampão 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M  $\text{NaPO}_4$ , 0,015 M NaEDTA; pH 4,7) e novamente centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi submetido a uma lise hipotônica (1,5 mL de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de NaCl 1,6% + Glicose 5%, após 30 segundos) e uma nova homogeneização.

Neste ponto o processamento das amostras para NAG e MPO se diferenciam, por isto, as amostras foram divididas em 2 tubos diferentes. Após a divisão, todos os tubos foram novamente centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado.

Nos tubos para NAG, foi adicionado 0,8 mL de uma solução Salina 0,9%/Triton X-100 0,1%, as amostras foram homogeneizadas e congeladas. Nos tubos para MPO, foi adicionado 0,8 mL de tampão 2, (0,05 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0,5% HTAB; pH 5,4). As amostras foram homogeneizadas e congeladas.

#### **4.2.11 Dosagem da atividade de NAG tecidual**

A reação se inicia com a adição de 100 µL do reagente p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM a 100 µL das amostras previamente processadas, diluídas em tampão citrato/fosfato e plaqueadas em placa de micro ensaio com 96 poços. Incuba-se a reação por 10 minutos a 37°C e, ao final desse tempo, foi adicionado às amostras 100 µL do tampão glicina 0,2 M (Glicina 0,26 M, NaCl 0,26 M, NaOH 0,26 M; pH 10,6). As leituras das placas foram feitas no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 405 nm.

O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva-padrão de NAG, feita pela coleta de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados).

#### **4.2.12 Dosagem da atividade de MPO tecidual**

O ensaio começa com uma lise térmica (criofatura). Para isso, as amostras já processadas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas 3 vezes consecutivas. Após a lise, 25 µL das amostras diluídas em tampão 2 são plaqueadas em uma placa de 96 poços. Foi adicionado então 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) a concentração final de 1,6 mM e incubou-se a placa a 37°C por 5 minutos,

Ao final deste período, foi adicionado às amostras 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluída em tampão 2 a uma concentração fina de 0,002% e incubou-se a placa novamente por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> às amostras para parar a reação e a placa foi lida no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base em curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de caseína 5% (dados não mostrados).

#### **4.2.13 Quantificação de Hidroxiprolina (OH-prolina) tecidual**

O ensaio de OH-prolina visa estimar a quantidade de colágeno depositada em determinado tecido, desta forma, podemos identificar e quantificar se um órgão sofreu um processo de fibrose após um processo inflamatório o ensaio foi feito seguindo um protocolo modificado (REDDY et al., 1996).

Para o ensaio, 50 mg de tecido pulmonar foi pesado, homogeneizado com um homogeneizador de tecidos (Power Gen 1000, Fisher Scientific) em solução salina 0,2% e liofilizado. Após liofilização, o tecido foi novamente pesado e passou por uma hidrólise alcalina (NaOH 2M) a 120°C por 30 minutos em autoclave.

Feita a hidrólise, as amostras foram mantidas a 65°C para se manterem líquidas e 50 µL das amostras, padrões e branco (água destilada) foram transferidos para um microtubo de 2 mL. Após, o reagente oxidante Cloramina T (0,056 M) foi adicionado ao tubo e este foi incubado em temperatura ambiente por 25 minutos. A reação é detectada com a adição do Reagente de Erlich (1M), que é o cromóforo, e incubação a 65°C por mais 25 minutos. Parou-se a reação colocando as amostras no freezer por 10 minutos.

Duzentos microlitros amostras e padrões foram então transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita no leitor de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 550 nm.

#### **4.2.14 Quantificação dos níveis de ALT plasmático**

A quantificação dos níveis de ALT plasmático foi feita através do uso do kit Transaminase ALT (TGP) Cinética, da Bioclin. Nesse procedimento, 20 µL de soro foi misturado com 200 µL do reagente de trabalho e 4 leituras de absorbância em intervalos regulares de tempo foram realizadas com o comprimento de onda de 340 nm. Após o procedimento, calculou-se a variação média da absorbância entre cada leitura e, com este valor, através de uma fórmula fornecida pelo fabricante, foi possível calcular a quantidade de ALT presente no meio.

Todo o procedimento foi feito com a temperatura controlada em 37°C. Após o ensaio, uma análise crítica dos resultados foi feita com o objetivo de detectar dados falso negativos. Caso alguma amostra falsa negativa fosse detectada, ela foi diluída com salina 0,9% (10; 20 ou 30 vezes) e o ensaio repetido.

#### **4.2.15 Quantificação dos níveis de glutathiona hepática**

O ensaio de glutathiona hepática visa quantificar os níveis de glutathiona total no fígado e assim avaliar os níveis metabólicos dos hepatócitos. O ensaio baseia-se na reação da GSH com o DNTB (também conhecido como reagente de Ellman) que produz um cromóforo, o TNB, que absorve luz no comprimento de 412 nm. Este ensaio foi baseado no artigo de Rahman e colaboradores (RAHMAN; KODE; BISWAS, 2006).

Para o ensaio, 150 mg de tecido hepático foi pesado e homogeneizado com 150 µL de PBS. Após a homogeneização, 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado e o tecido homogeneizado novamente. Depois dessa etapa, as amostras foram centrifugadas a 847 g e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para o ensaio bioquímico e o *pellet* descartado.

Para o ensaio, uma curva padrão de razão 2 e com 7 pontos foi construída com o ponto mais alto em 500 µg/mL de GSH. Em uma placa de 96 poços, 40 µL de branco, padrões e amostras foi pipetado em duplicata. Após, 240 µL de Tris-HCl 0,4 M e 10% TCA foi adicionado às amostras. Por último, 20 µL de DNTB (3,69 mg/mL em metanol) foi adicionado aos poços. As amostras foram lidas a 415 nm 30 segundos após a aplicação do DNTB.

#### **4.2.16 Análise histológica**

No modelo de silicose foi coletado o lobo esquerdo do pulmão dos camundongos e, no modelo de falência hepática, foram coletados o maior lobo do fígado e o lobo esquerdo do pulmão. Após coletados, os órgãos foram lavados com PBS 1x e depois ficados em formol 4% tamponado com PBS para posterior inclusão em parafina. Lâminas histológicas foram montadas contendo três cortes histológicos de 4 µm de espessura em intervalos de 70 µm para cada animal. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e, no caso do modelo de silicose, a coloração de Gomori também foi utilizada além da H&E.

##### **4.2.16.1 Modelo de Silicose**

Para o modelo de silicose, foi realizado escore histopatológico seguindo o protocolo de Hubbs (HUBBS et al., 1997; 2002). Este caracteriza o tipo de inflamação (neutrofílica, granulomatosa, necrótica) e, para o valor final, leva em consideração dois aspectos: (1) a intensidade da inflamação (nenhuma, mínima,

leve, moderada, acentuada e grave) e (2) a extensão da inflamação (nenhuma, focal, localmente extensa, multifocal, multifocal a coalescente e difusa). Cada avaliação pode variar de 0 a 5 e o escore final é o resultado da soma destes dois aspectos.

#### **4.2.16.2 Modelo de falência hepática**

Para o modelo de falência hepática tanto o fígado quanto o pulmão foram avaliados.

O escore de lesão no fígado foi feito através do cálculo médio da razão entre área de necrose hepática e área total de tecido. Os cortes histológicos foram analisados em 8x e tanto a área de necrose quanto a área total de tecido presentes na fotomicrografia foram medidas para cada uma das três seções. O valor de cada animal foi obtido através da média de todas as suas medições e esse valor foi computado para calcular a área de necrose do grupo.

Para o pulmão, foi realizado um escore histológico seguindo o protocolo de Su. Nele o grau de lesão pulmonar é realizado avaliando-se o edema alveolar e intersticial, infiltração de leucócitos e hemorragia. Cada escore varia de 0 a 4 pontos e a gravidade da lesão é pontuada seguindo as características: sem lesão; 0-25% do campo; 26-50%; 51-75% e difusa (76-100%). O escore de lesão total é obtido através da soma de cada um dos escores individuais.

#### **4.2.17 Análise dos resultados**

Os *Heatmaps* foram gerados com o programa *Multiexperiment Viewer* v4.8.1, que está disponível livremente na página <http://www.tm4.org/mev.html>. Para a geração das imagens, os valores absolutos das dosagens de proteína foram transformados em  $\log_{10}$  e então plotadas em uma matriz com as citocinas na vertical e tratamento, doses do agonista e doadores na horizontal. Como é impossível calcular o logaritmo de "0", quando este valor bruto apareceu, ele foi substituído por um valor 10 vezes menor que o menor valor daquele grupo. Os valores de saturação mínimo, mediano e máximo da escala foram definidos como -4:0:4 e o agrupamento hierárquico foi realizado utilizando a correlação de Pearson.

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos foram feitas com o uso do programa GraphPad Prism 6 da empresa GraphPad Software, Inc (www.graphpad.com).

Antes de qualquer análise estatística, os conjuntos de dados foram analisados quanto à sua distribuição (*D'Agostino-Pearson omnibus normality test* ou *Kolmogorov-Smirnov test*, dependendo do n disponível): se eles respeitavam uma distribuição normal, utilizou-se os testes paramétricos, se não, empregou-se testes não paramétricos.

Os testes estatísticos utilizados neste estudo foram: análise de variância (One-way ANOVA) com o pós-teste de Tukey (quando cada grupo foi analisado contra todos os grupos) ou Dunnett (quando cada grupo foi analisado contra o grupo controle) (dados paramétricos), análise de variância (teste de Kruskal-Wallis) com o pós teste de Dunn (dados não paramétricos) ou a análise de variância (Two-way ANOVA) com pós teste de Tukey (quando os elementos analisados pertenciam a grupos diferentes) ou Sidak (quando os elementos analisados pertenciam ao mesmo grupo).

A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando o p valor foi menor que 0,05.

## 5 Resultados

### 5.1 Ligantes de TLR são capazes de estimular PBMCs, porém somente a atividade de TLR9 é inibida com o bloqueio de PI3K $\delta$

O experimento inicial, realizado nos laboratórios da GSK, Inglaterra, consistiu na estimulação de PBMCs provenientes de 6 doadores saudáveis com um painel de agonistas de TLR (1-9) (Invivogen), em diferentes concentrações (concentração-resposta), e na presença ou ausência do inibidor de GSK'045 (anti-PI3K $\delta$ ). Como método de avaliação, nós medimos a produção de um painel de citocinas que incluiu: CXCL10, IFN- $\alpha$ ; IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$ . Os valores das concentrações dos diferentes agonistas de TLR estão representados na Tabela 4.

Nossos resultados mostraram que todos os diferentes agonistas de TLR foram capazes de estimular as células (Figura 5) por meio da produção de citocinas, entretanto, após a inibição de PI3K $\delta$ , somente o TLR9 (estimulado por CpG) teve sua atividade reduzida (Figura 5 painel inferior direito). A Figura 5 é um conjunto de mapas de calor. Nele, está representado o valor logarítmico da produção de citocina para cada doador nas diferentes concentrações de agonistas. Nesta representação gráfica, os valores são representados através de um dégradé de cores no qual quanto mais azul, menor foi a produção de determinada citocina, quanto mais vermelho, maior e a cor branca representa os valores intermediários.

Mais especificamente, no caso do TLR9 podemos observar que a estimulação dos PBMCs com CpG foi capaz de induzir a produção de todas as citocinas, com exceção de IFN- $\alpha$ . Já o tratamento com GSK'045 foi capaz de inibir a produção de todas as citocinas com exceção da CXCL10. Esta interação observada apenas entre TLR9 e PI3K $\delta$  nos levou a focar, a partir deste momento, unicamente no TLR9.

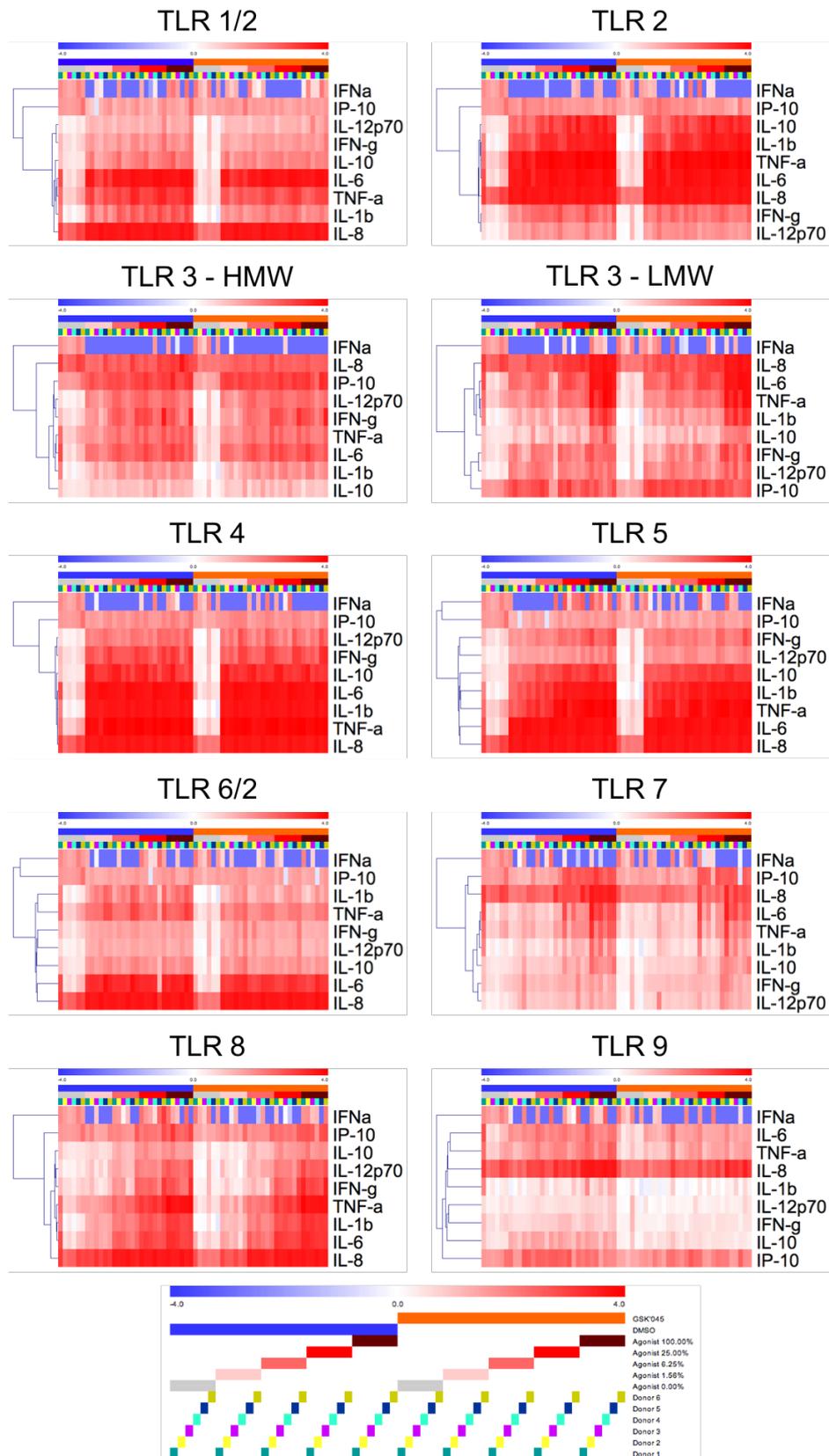


Figura 5: A produção de citocinas de PBMCs estimulados com CpG é prejudicada após a inibição de PI3K $\alpha$ .

PBMCs de 6 doadores saudáveis foram estimulados por 24 horas com diferentes estímulos específicos para cada TLR em diferentes concentrações e na presença ou ausência do inibidor GSK'045. Os níveis de citocinas no sobrenadante das células foi analisado por MSD.

## 5.2 A inibição de diferentes isoformas da PI3K também inibe a atividade de TLR9

Este experimento também foi realizado na GSK e constituiu na estimulação de PBMCs de 3 doadores diferentes com uma dose-resposta do agonista CpG (Miltenyi) na presença ou ausência dos inibidores GSK'045 ou GSK'723. O objetivo foi avaliar se a propriedade inibitória que observamos ao inibir PI3K $\delta$  é exclusiva desta isoforma ou se outras isoformas da enzima, como por exemplo PI3K $\gamma$ , também possuem esta característica.

Nossos resultados indicaram que ao inibir a isoforma gama da PI3K também obtivemos uma redução na produção de citocinas após a estimulação com CpG, entretanto, esta redução foi ainda maior que aquela observada pela PI3K $\delta$  (Figura 6). Os gráficos individuais para cada citocinas estão representados na Figura Suplementar 1.

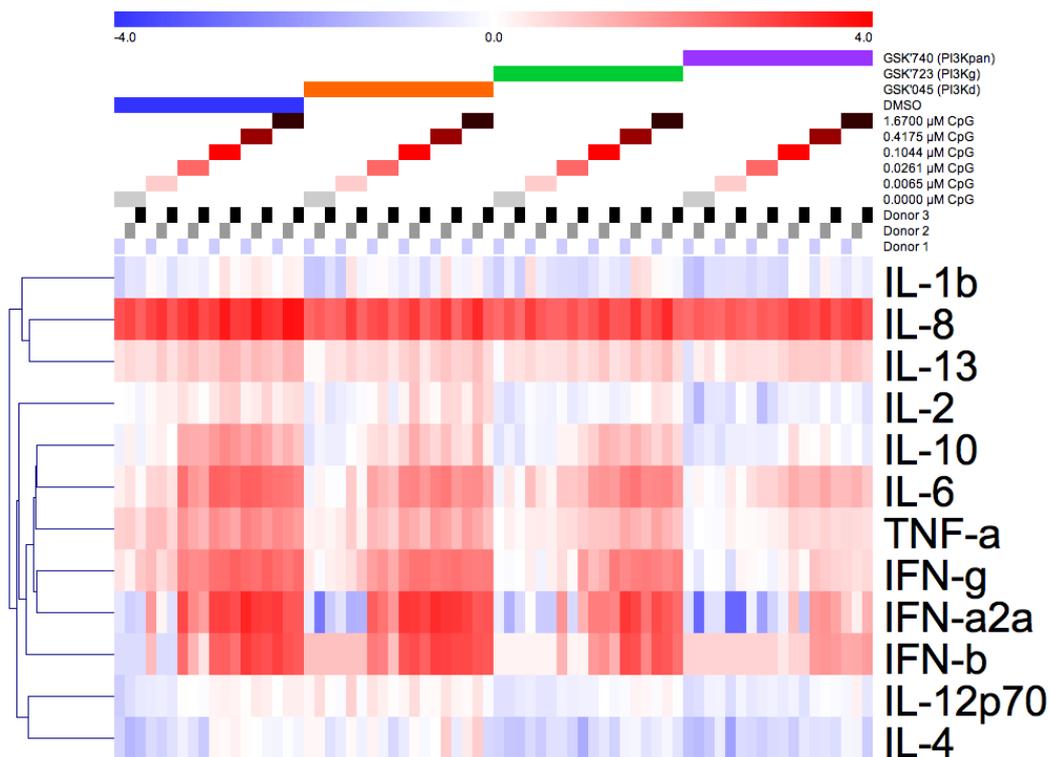


Figura 6: PI3K $\gamma$  está mais envolvida na produção de citocinas perante estimulação de TLR9 do que PI3K $\delta$ , no entanto, as duas isoformas agem de forma sinérgica para a função completa do receptor.

PBMCs de 3 doadores saudáveis após 24 horas de estimulação com CpG em diferentes concentrações e na presença ou ausência do inibidor de GSK'045, GSK'723 ou GSK'740. Os níveis de citocinas no sobrenadante das células foi analisado por MSD.

De maneira interessante, pudemos notar que a mudança para o CpG tipo C não causou alterações nos resultados obtidos com as citocinas 1ue sofrem

influência da regulação por NFκB, entretanto, IFN-α e IFN-β passaram a ser fortemente estimulados. Neste ponto, observamos uma diferença entre PI3Kδ e PI3Kγ: as duas parecem agir de forma semelhante na produção das citocinas moduladas por NFκB, porém, quando analisamos os IFNs, vemos que, ao contrário de PI3Kγ, PI3Kδ tem nenhuma ou muito pouca influência na sua síntese e liberação.

Apesar de terem um papel importante para a função de TLR9, a inibição individual de qualquer das duas isoformas de PI3K não foi capaz de abolir completamente a função de TLR9 em induzir a produção de citocinas. Desta forma, outra pergunta que nos fizemos foi se as diferentes formas da enzima poderiam ter um efeito complementar/sinérgico na produção de citocinas pelas células. Para responder esta pergunta, além dos dois inibidores já utilizados neste trabalho, também tratamos as células com o composto GSK'740, que é um pan inibidor de PI3K.

Nossos resultados mostraram que ao inibir todas as isoformas de PI3K, a produção de citocinas induzida por CpG é bastante afetada, demonstrando que as isoformas γ e δ da enzima agem em conjunto para a completa atividade do TLR9 (Figura 6 e Figura Suplementar 1).

### **5.3 Estimulação de PBMCs com CpG leva a ativação de PI3Kγ**

Até o momento, nossos dados demonstram que a presença de PI3Kγ é importante para que a estimulação com CpG seja eficiente e resulte na liberação de citocinas. No entanto, nos perguntamos se, de fato, PI3K estava ativada após a estimulação dos PBMCs com CpG e, caso positivo, quando ela começa a participar do evento. Para responder esta pergunta, analisamos os níveis de p-AKT, principal produto da ativação de PI3Kγ, em dois experimentos distintos: (1) em uma cinética de estimulação com CpG e (2) inibindo a PI3Kγ com o fármaco GSK'723.

Como resultado observamos que após a estimulação específica de TLR9 com CpG, há o aparecimento de p-AKT de maneira dependente à concentração de CpG (Figura 7A) sugerindo fortemente a ativação de PI3Kγ no processo. Esta hipótese foi confirmada com o segundo experimento, no qual PI3Kγ foi inibida. Os resultados deste experimento mostraram que ao inibir PI3Kγ, os níveis de p-

AKT foram reduzidos para baixo do valor basal em torno de 40% em todos os grupos (Figura 7B). Este é um resultado particularmente interessante, pois nos indica que grande parte da AKT ativa nas células, mesmo em condições basais, são provenientes da PI3K $\gamma$  e que toda forma fosforilada de AKT que surge na célula depois da estimulação com CpG também é proveniente desta enzima.

Outra observação que estes experimentos nos permitem fazer é que a participação de PI3K $\gamma$  na estimulação de PBMCs por CpG é algo tardio e não imediato, pois se inicia entre 10 e 30 minutos após o estímulo (Figura 7A).

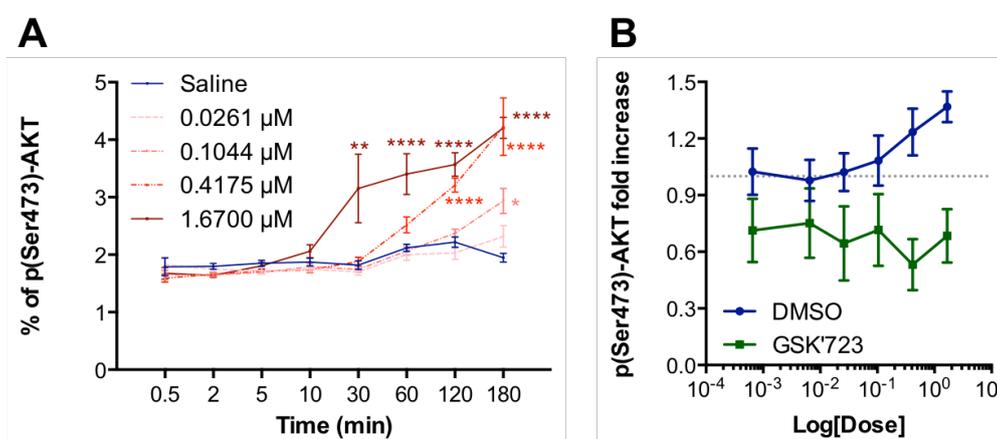


Figura 7: A estimulação de PBMCs com CpG leva a formação de p-AKT de forma PI3K $\gamma$  dependente.

(A) PBMCs de 3 doadores saudáveis, independentes, foram estimulados com diferentes concentrações de CpG e a porcentagem de p/AKT/AKT total foi medida em tempos diferentes por MSD. Gráfico representa a porcentagem média dos três doadores  $\pm$  erro padrão da média. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparados com o grupo "Salina".

(B) PBMCs de 4 doadores saudáveis, independentes, foram estimulados com diferentes concentrações de CpG e a porcentagem de p/AKT/AKT total foi medida por MSD após uma hora. Gráfico representa a média da razão entre o grupo estimulado e não estimulado com CpG, com e sem inibidor de PI3K $\gamma$  dos 4 doadores  $\pm$  95% CI.

#### 5.4 A estimulação de CpG concomitante com a inibição de PI3K $\gamma$ não diminui a viabilidade celular

Nossos resultados demonstram claramente que PI3K $\gamma$  participa do processo de produção de citocinas por PBMCs quando estimulados com CpG e que a inibição de PI3K prejudica a produção de citocinas destas células. É importante notar que PI3K é uma proteína relevante para a célula pois é uma enzima importante na via de sobrevivência celular impedindo que ela morra em situações de estresse. Uma vez que nossa estratégia consiste em inibir essa enzima, decidi-

mos investigar se a diminuição na produção de citocinas poderia ter sido causada pela morte das células durante o tempo de estimulação. A partir deste momento, os experimentos passaram a ser realizados no Brasil.

Para responder esta questão, PBMCs de 3 doadores foram estimulados com 0,4175  $\mu$ M de CpG (IDT) por 24 horas com ou sem o fármaco GSK'723 e, ao final deste período, as células foram marcadas com Anexina V/PI e lidas em um citômetro de fluxo. Com esta marcação podemos delimitar 4 grupos distintos: (1) AnxV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> que indica apoptose tardia; (2) AnxV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> que indica necrose; (3) AnxV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> que indica apoptose; e (4) AnxV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> que indica células viáveis.

Nossos resultados indicaram que a viabilidade celular, após 24 horas, não se alterou. A porcentagem de células marcadas duplo negativa no grupo Salina<sub>DMSO</sub> foi de 88,2%  $\pm$  1,6; a do CpG<sub>DMSO</sub>, 89,7%  $\pm$  0,87; a do Salina<sub>GSK'723</sub>, 89,27%  $\pm$  0,75; e a do CpG<sub>GSK'723</sub>, 90,4%  $\pm$  0,95 (Figura 8). Dessa forma, concluímos que o fato das células tratadas com inibidor de PI3K $\gamma$  terem produzido menos citocinas foi devido a outro fator que não uma maior mortalidade das células durante a experimentação.

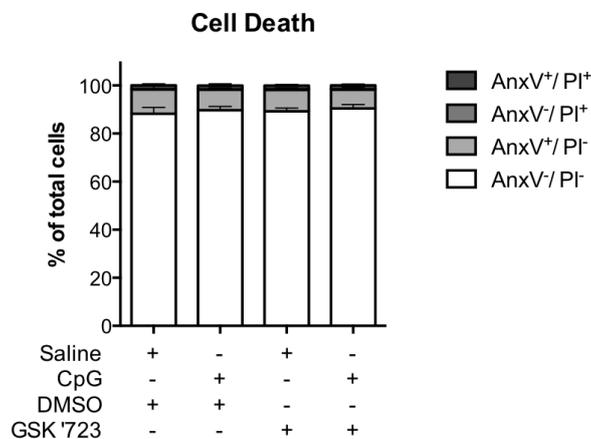


Figura 8: PBMCs estimulados com CpG e tratados com o GSK'723 não tem a sua viabilidade alterada.

PBMCs de três doadores saudáveis, independentes, foram estimulados com CpG com e sem a presença do fármaco GSK'723 por 24 horas e depois marcados com Anexina V e PI. Gráfico representa a porcentagem média dos três doadores independentes  $\pm$  erro padrão da média.

## 5.5 Padronização de um modelo de pleurisia induzida por CpG

Todos os nossos dados até o momento mostraram que PI3K $\gamma$  participa do processo de ativação das células induzidas por CpG/TLR9 e que sua inibição prejudica a produção de citocinas. Dessa forma, nos perguntamos se o tratamento com um inibidor de PI3K $\gamma$  seria eficiente para tratar doenças no qual a

superatividade de TLR9 fosse importante para o desenvolvimento da enfermidade. Com o objetivo de testar esta hipótese, primeiramente elaboramos uma prova de conceito que foi padronizar um modelo de inflamação no qual o agente etiológico fosse o CpG e depois testar esse modelo na ausência de PI3Ky.

O modelo de escolha foi a pleurisia. Esta cavidade é, por definição, livre de agentes infecciosos e, devido a este caráter estéril, possui células residentes que são, em sua totalidade, mononucleares. Devido a este conjunto de fatores qualquer perturbação neste microambiente é de fácil detecção, o que faz dele uma boa escolha para se padronizar um modelo.

O primeiro passo tomado foi testar o efeito de uma curva dose-resposta de CpG injetada na pleura de camundongos C57BL/6 e analisar o infiltrado celular após 24 horas. Com isso, foi possível achar a dose mais eficiente de CpG capaz de induzir recrutamento celular no espaço pleural.

Após 24 horas, a injeção de CpG foi capaz de induzir recrutamento celular para o espaço pleural e a dose mais eficiente para induzir este fenômeno foi a de 750 ng/cavidade (Figura 9A). Através da contagem diferencial das células pudemos verificar que as células recrutadas para a cavidade pleural foram neutrófilos e células mononucleares (Figura 9B e C).

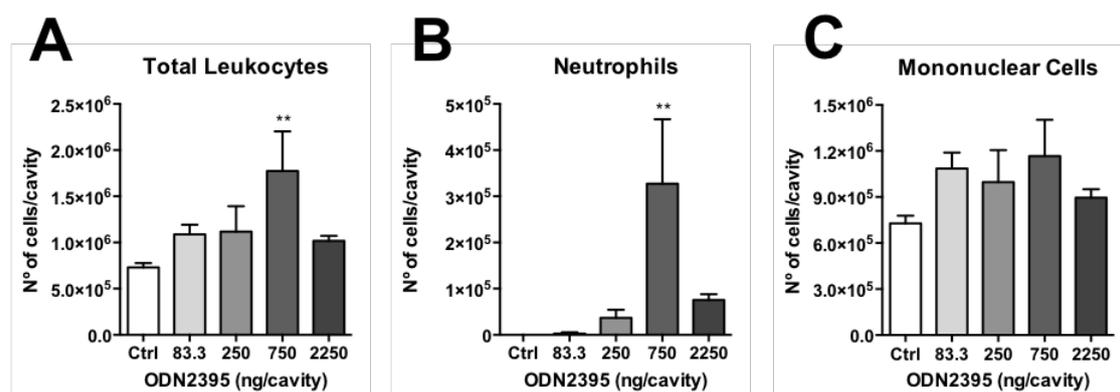


Figura 9: Injeção de CpG na pleura induz o recrutamento de células para a cavidade pleural.

Camundongos C57BL/6 foram injetados com quantidades crescentes de CpG na pleura e o recrutamento celular foi avaliado 24 horas após o desafio. Foi analisado o número total de células (A); número de neutrófilos (B); e o número de células mononucleares (C). Gráficos representam a contagem média do número de células  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo. \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo "Controle"

Depois de definida a melhor dose de CpG para a indução da pleurisia, o próximo passo foi avaliar a cinética do recrutamento celular. Para isso, 750 ng

de CpG foi injetado na pleura de camundongos C57BL/6 e o infiltrado inflamatório foi analisado em diferentes tempos após a injeção: 6; 12; 24 e 48 horas. Este experimento não só confirmou os dados prévios de que os neutrófilos são as principais células recrutadas para a cavidade pleural, mas também nos informou que o pico da inflamação induzida por CpG acontece 12 horas após o estímulo ser administrado (Figura 10).

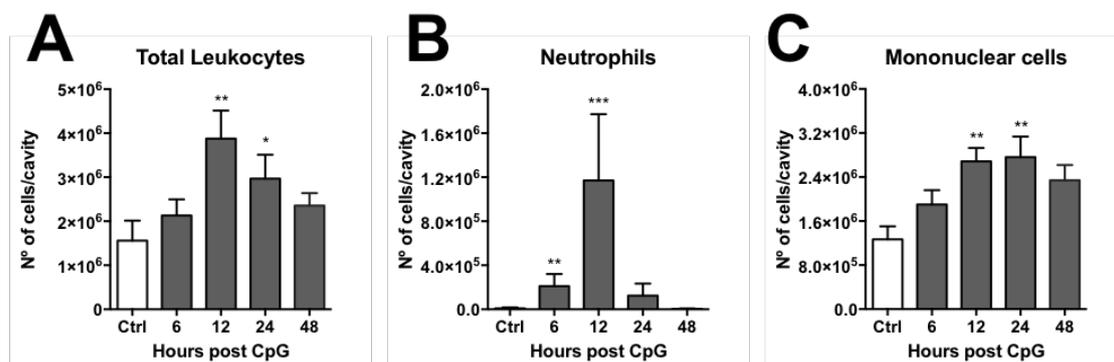


Figura 10: A inflamação pleural induzida por CpG tem seu pico com 12 após o estímulo.

Camundongos C57BL/6 foram injetados com 750 ng de CpG na cavidade pleural e o recrutamento celular foi avaliado 6; 12; 24 e 48 horas após o desafio. Foi analisado o número total de células (A); número de neutrófilos (B); e o número de células mononucleares (C). Gráficos representam a contagem média do número de células  $\pm$  erro padrão da média. N=5 ou mais por grupo. \* $p < 0,01$  comparado com o grupo "Controle"

## 5.6 Ausência de PI3K $\gamma$ diminui o recrutamento de células causado por CpG na pleura

Com o modelo de pleurisia induzida por CpG padronizado pudemos validar nossa prova de conceito com um último experimento que foi testar se a inflamação induzida por CpG seria menor em animais deficientes para PI3K $\gamma$  ou tratados com um inibidor de PI3K $\gamma$  *in vivo* (AS605240). Para isso, animais C57BL/6 WT, C57BL/6 tratados com AS605240 e Deficientes para PI3K $\gamma$  foram estimulados com CpG e o infiltrado inflamatório foi observado depois de 12 horas.

Os resultados obtidos por nós demonstraram que, como padronizado, o CpG foi capaz de induzir inflamação nos animais WT. Além do mais, de maneira a corroborar nossa hipótese e também seguindo a mesma direção dos dados *in vitro* a inibição ou ausência de PI3K $\gamma$  impediu que CpG causasse inflamação pleural (Figura 11A). Analisando diferencialmente as células do infiltrado, con-

cluimos também que a inibição da inflação induzida por CpG se deu pela diminuição tanto do recrutamento dos neutrófilos quanto também pela inibição do recrutamento das células mononucleares para o sitio da inflamação (Figura 11B e C).

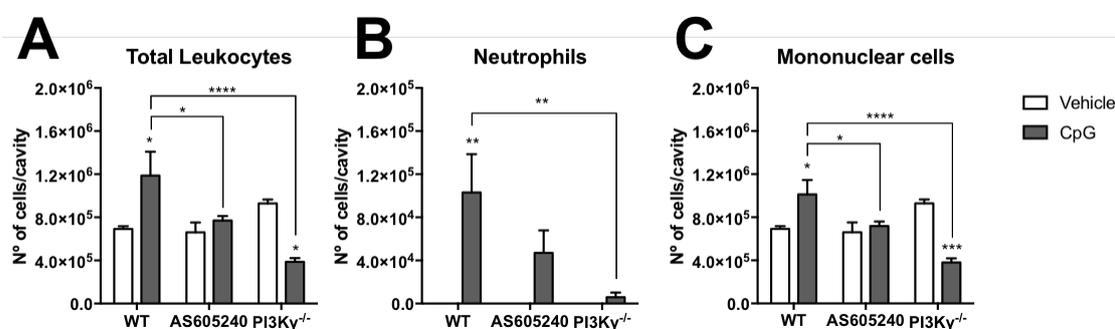


Figura 11: A ausência de PI3K $\gamma$  diminui a inflamação na pleura induzida por CpG.

Camundongos C57BL/6 WT, WT tratados com AS6052040 e Deficientes para PI3K $\gamma$  foram injetados com 750 ng de CpG na cavidade pleural e o recrutamento celular foi avaliado com 12 horas após o desafio. Foi analisado o número total de células (A); número de neutrófilos (B); e o número de células mononucleares (C). Gráficos representam a contagem média do número de células  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo de animais WT e n=3 ou mais por grupo de animais KO. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 comparado com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

Assim, com os resultados representados nas Figuras 9; 10 e 11, nós conseguimos mostrar que: (1) CpG sozinho foi capaz de induzir recrutamento celular e que a dose ideal é de 750 ng/cavidade; (2) que o recrutamento celular induzido por CpG foi composto por neutrófilos e células mononucleares; (3) que o pico da resposta inflamatória foi de 12 horas após a injeção e (4) que se PI3K $\gamma$  for inibida, seja por intervenção farmacológica ou por alteração genética, o recrutamento celular induzido por CpG diminui.

Dessa forma a prova de conceito foi validada e nos permite avançar no nosso trabalho que agora será estudar o papel de PI3K $\gamma$  em dois modelos cujo papel de TLR9 é comprovadamente importante para o estabelecimento da doença. Esses modelos são: (1) silicose e (2) lesão hepática induzida por overdose de paracetamol, ambos já padronizados no Laboratório de Imunofarmacologia da UFMG.

### **5.7 Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tem menos inflamação e fibrose pulmonar induzidas por sílica e conseqüentemente melhores parâmetros funcionais do pulmão**

Para o experimento de silicose, camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram instilados com sílica e mantidos por 28 dias. Ao final do período foi realizado a análise de função pulmonar e coleta do lavado broncoalveolar e pulmões.

Analisando as células totais coletadas no BAL, nossos resultados mostraram que a instilação de sílica induziu um aumento de células nas vias aéreas nos dois grupos de animais, entretanto, o grupo PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> teve um menor número de células no BAL (Figura 12A). Avaliando as células de modo diferencial, verificamos que o modelo de sílica induz o recrutamento tanto de neutrófilos como também de células mononucleares e que, como visto para as células totais, os animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tiveram menos dessas células recrutadas para o local da inflamação (Figura 12B e C).

Analisando bioquimicamente o parênquima pulmonar desses animais, vimos que os neutrófilos e células mononucleares seguem o mesmo padrão observado no BAL. A sílica induz o acúmulo dessas células no parênquima após 28 dias de exposição, resultando também no aumento da quantidade de colágeno (índice de fibrose) nos pulmões desses animais. No entanto, de maneira mais expressiva que no BAL, os animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tem menor acúmulo dessas células que os animais WT e, como consequência disso, também tiveram uma menor deposição de colágeno quase que nula, se assemelhando bastante aos animais controle.

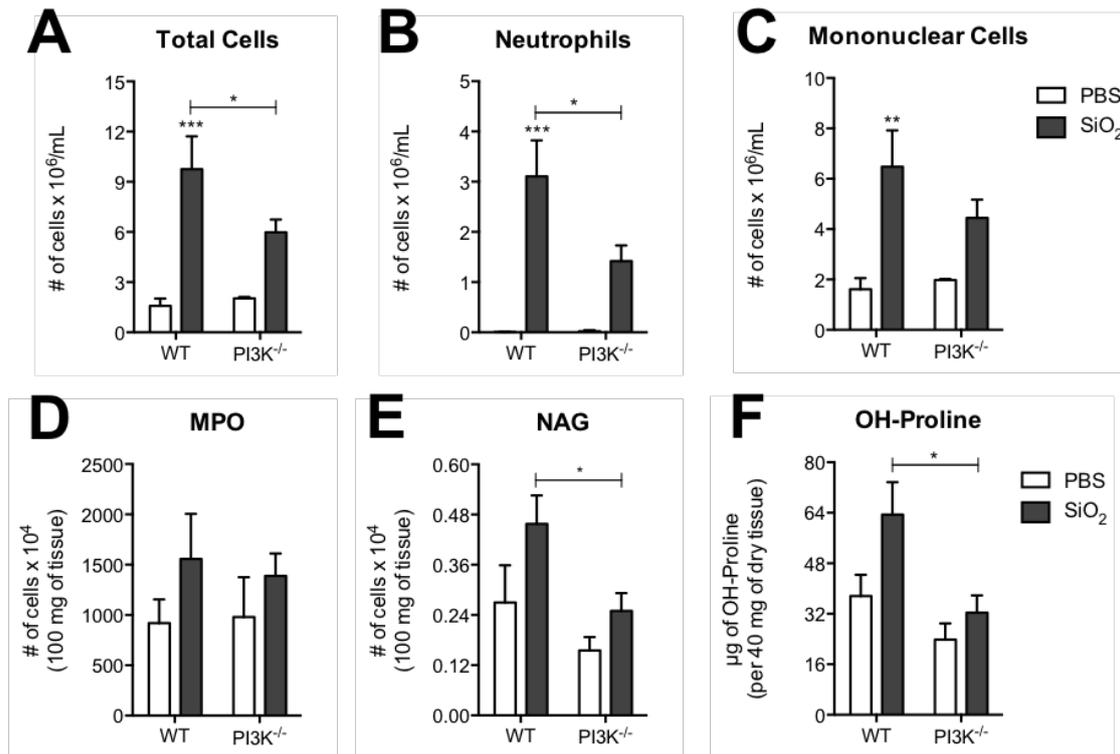


Figura 12: A ausência de PI3K $\gamma$  resulta em menor inflamação e fibrose pulmonar induzida por sílica.

Camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram instilados com 10 mg de sílica e avaliados 28 dias após a instilação. No BAL foram analisados o número total de células (A), de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C). No parênquima pulmonar foram estimados o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO (D), de macrófagos pelo ensaio de NAG (E) e a quantidade de colágeno pelo ensaio de hidroxiprolina (F). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo de animais WT e n=3 ou mais por grupo de animal KO. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 comparados com o grupo PBS ou quando indicado.

Os pulmões também foram analisados histologicamente através da coloração de Hematoxilina e Eosina, para a avaliação dos parâmetros inflamatórios, e também com Tricrômio de Gomori, para avaliação da deposição de colágeno no parênquima.

Analisando os cortes corados com H&E (Figura 13) pudemos observar que os animais WT tiveram um infiltrado no parênquima pulmonar de caráter granulomatoso com prevalência de células mononucleares. Os focos inflamatórios estavam na maioria das vezes associados a estruturas cristalinas bastante refringentes e, em alguns casos, estavam também presentes células ou pequenas áreas necróticas. Nos animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, apesar das estruturas cristalinas, mesmo que em menor quantidade, estarem presentes, o infiltrado mononuclear foi menor e as estruturas granulomatosas não foram observados. Neste caso, o que se percebeu foram células agrupadas em pequenos focos ou esparsas pelo tecido.

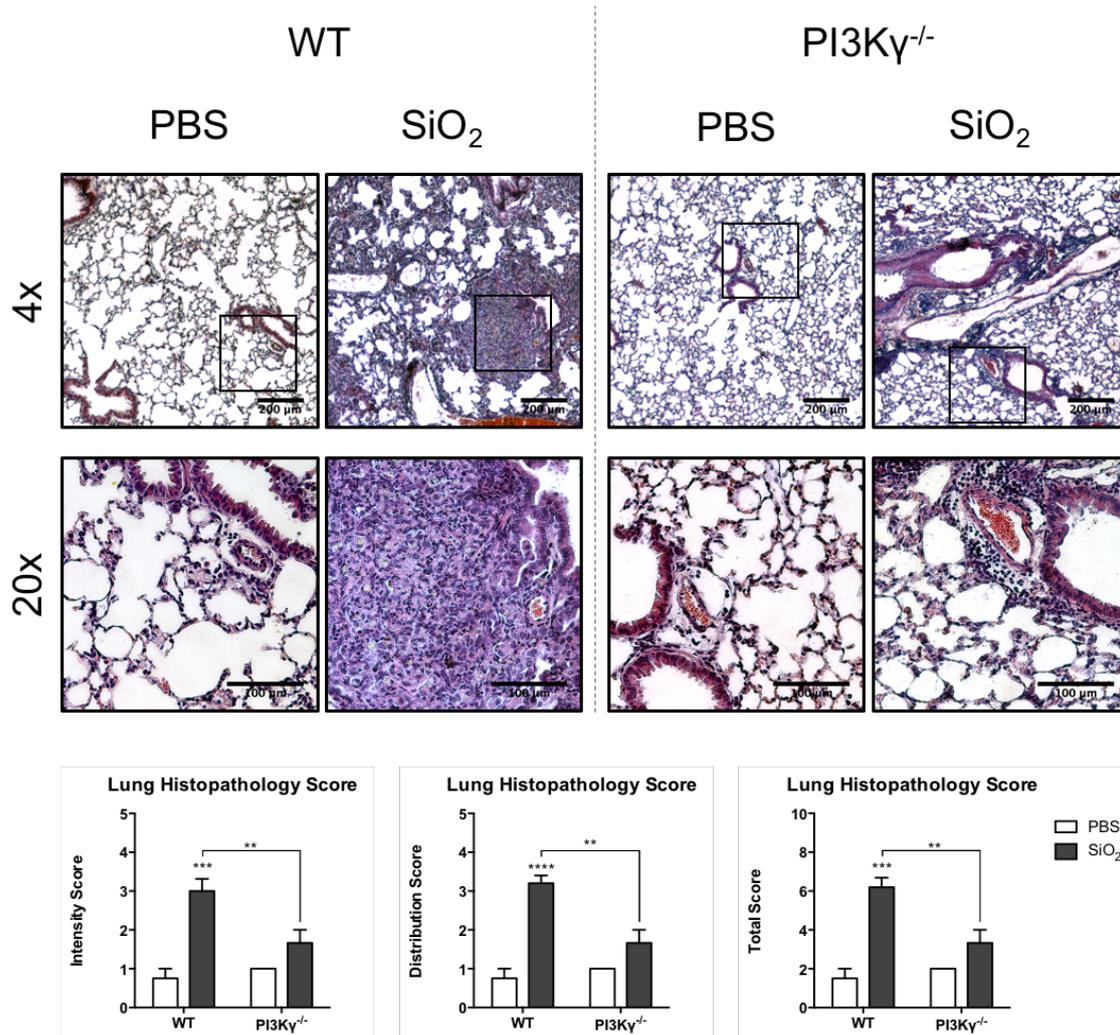


Figura 13: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> possuem menor infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar que os animais WT.

Camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram instilados com 10 mg de sílica e avaliados 28 dias após a instilação. As lâminas foram coradas com H&E para análise do infiltrado inflamatório e o escore histopatológico foi realizado por um patologista seguindo os critérios definidos nos materiais e métodos. Para as micrografias com aumento de 4x a barra de escala representa 200  $\mu$ m e, para as de 20x, 100  $\mu$ m. Os dois primeiros gráficos representam cada escore individualmente (intensidade e distribuição) e o terceiro gráfico representa o escore final, que é a soma dos dois primeiros. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo de animais WT e n=3 ou mais por grupo de animal KO. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 comparados com o grupo PBS ou quando indicado.

A coloração com Tricrômio de Gomori (Figura 14) foi realizada para confirmar os dados obtidos a partir do ensaio de hidroxiprolina. Neste ensaio constatamos que os animais WT tiveram mais deposição de colágeno no parênquima pulmonar que os animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Este resultado foi corroborado com a técnica histológica, uma vez nós pudemos observar que os animais WT possuem áreas mais esverdeadas que os animais deficientes para PI3K $\gamma$ . Vale observar que nesta coloração, áreas ricas em colágeno adquirem uma coloração esverdeada.

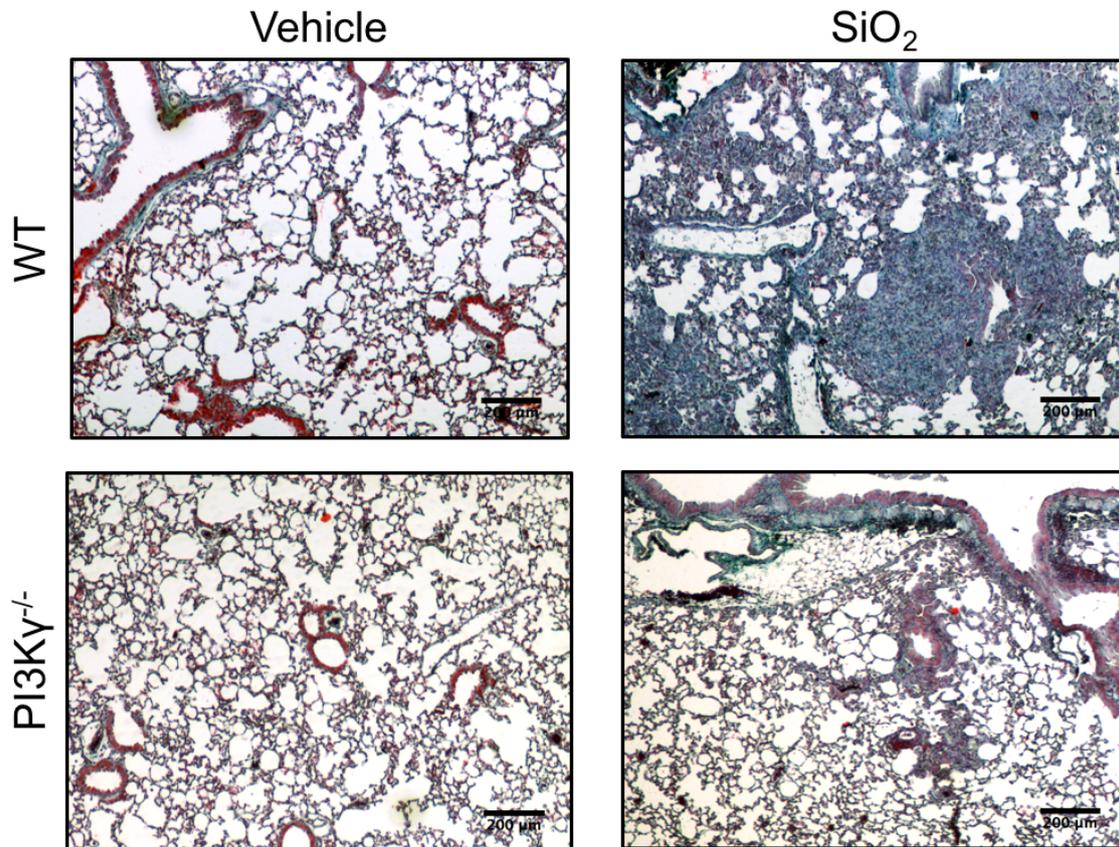


Figura 14: Animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  possuem menor deposição de colágeno no parênquima pulmonar que os animais WT.

Camundongos C57BL/6 WT e  $PI3K\gamma^{-/-}$  foram instilados com 10 mg de sílica e avaliados 28 dias após a instilação. As lâminas foram coradas com Tricrômio de Gomori para a avaliação da deposição de colágeno no parênquima pulmonar. As micrografias estão representadas com aumento de 4x e a barra de escala representa 200  $\mu$ m. Fotos representativas de cada grupo experimental sendo que espaço amostral foi de  $N=4$  ou mais por grupo de animais WT e  $n=3$  ou mais por grupo de animal KO.

Tamanho diferença nos aspectos inflamatórios e principalmente na deposição de colágeno entre os animais WT e  $PI3K\gamma^{-/-}$  nos levou também a analisar os parâmetros funcionais pulmonares desses animais. Para isso, após 28 dias de exposição à sílica, os animais foram submetidos a uma análise espirométrica.

Com a espirometria dos camundongos, pudemos perceber que a exposição à sílica causou uma menor complacência e uma maior resistência pulmonar nos animais WT (Figura 15A e B). Isto significa que, sob uma mesma pressão de ar, os pulmões dos animais expostos à sílica irão inflar menos. Estes resultados vão de acordo com o dado de hidroxiprolina, pois estas características são típicas de doenças restritivas, que tem como característica o enrijecimento do parênquima pulmonar, como é o caso da fibrose pulmonar idiopática, COPD, a própria silicose e outras.

Analisando o parâmetro FEV<sub>100</sub> (quantidade de ar expirada pelo camundongo nos primeiros 100 ms da expiração forçada) dos animais ficou claro também que, além das evidências restritivas, a administração de sílica induziu alterações obstrutivas nos pulmões desses camundongos. No caso do nosso modelo, vimos que os animais WT expostos à sílica expeliram por volta de 18% menos ar que os animais controle, o que indica que as vias aéreas desses animais estavam congestionadas. De maneira contrária, os animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros fisiológicos analisados, mostrando que, além de uma menor inflamação, a ausência de PI3K $\gamma$  também preservou os parâmetros funcionais dos pulmões dos camundongos (Figura 15A; B e C).

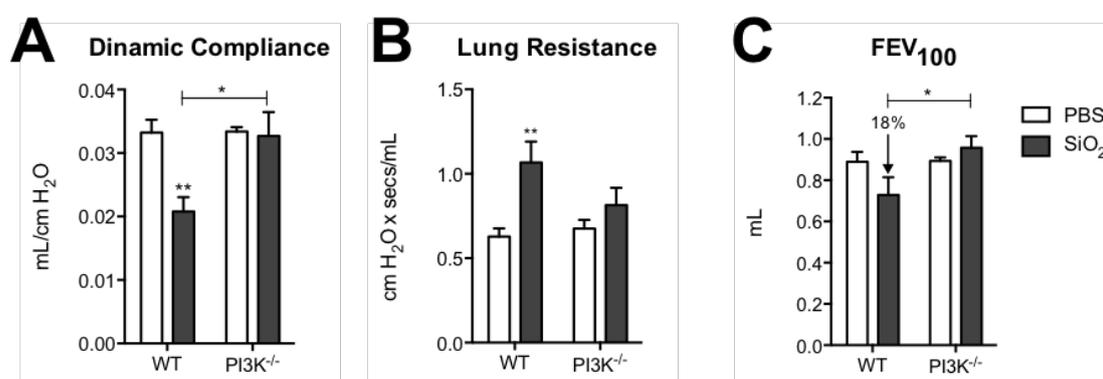


Figura 15: A ausência de PI3K $\gamma$  preserva os parâmetros fisiológicos dos pulmões dos camundongos expostos à sílica.

Camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram instilados com 10 mg de sílica e 28 dias após a instilação foi feita a espirometria desses animais. Foram analisados a complacência pulmonar (A), a resistência pulmonar (B) e o volume forçado de ar expirado nos primeiros 100 ms (C). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo de animais WT e n=3 ou mais por grupo de animal KO. \*p<0,05; \*\*p<0,01 comparados com o grupo PBS ou quando indicado.

Devido à relevância dos dados obtidos até o momento com o modelo de fibrose pulmonar decidimos validar nossa hipótese em um segundo modelo inflamatório, o de lesão hepática induzida por paracetamol.

### 5.8 Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou tratados com AS605240 são protegidos da lesão hepática induzida por paracetamol

Para o experimento de lesão hepática induzida por paracetamol, camundongos C57BL/6 WT; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 foram administrados, pela via oral, com uma sobredose da droga e analisados 24 horas após a

sua administração. Ao final do período foram realizadas análise da função pulmonar, coletados o sangue, fígado, BAL e os pulmões.

Analisando o sangue dos animais WT gavados com APAP, verificamos que os níveis séricos de ALT estão elevados, o que indica que a sobredose de paracetamol induziu lesão hepática nesses animais. Entretanto, os animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  e a animais WT tratados com AS tiveram menores níveis circulantes dessa enzima mostrando que esses animais tiveram lesões hepáticas menos graves (Figura 16A). Da mesma forma, a administração de APAP causou um aumento do número de neutrófilos (ensaio de MPO) no fígado, evento que também foi minimizado nos animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  e nos WT tratados com AS (Figura 16B).

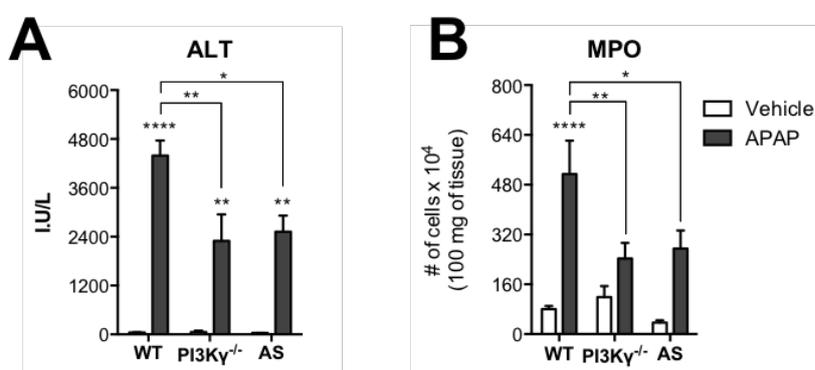


Figura 16: A ausência de  $PI3K\gamma$  resulta em menor lesão hepática induzida por paracetamol e também em menor recrutamento de neutrófilos para o fígado.

Camundongos C57BL/6 WT;  $PI3K\gamma^{-/-}$  e WT tratados com AS605240 foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. No sangue foi analisado o nível séricos de ALT (A) e no fígado foi estimado o número de neutrófilos (B). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média.  $N=3$  ou mais por grupo de animais WT e AS, e  $n=4$  ou mais por grupo de animal KO. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

Também foi analisada a histologia hepática através da coloração de seções do órgão com Hematoxilina e Eosina. Seguindo os dados de ALT, pudemos notar através das micrografias que a administração de paracetamol induziu extensas áreas de necrose nos animais WT (delimitadas pela linha tracejada) e que estas áreas estavam bastante reduzidas nos animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  e também nos animais WT tratados com AS6053240 (Figura 17 – micrografias). Por meio de um escore patológico conseguimos demonstrar que estas diferenças observadas morfológicamente eram significativamente diferentes (Figura 17 – gráfico).

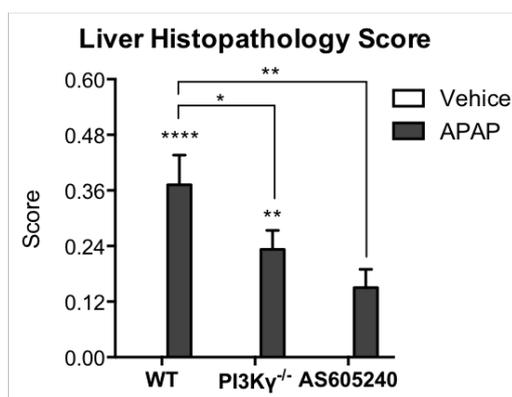
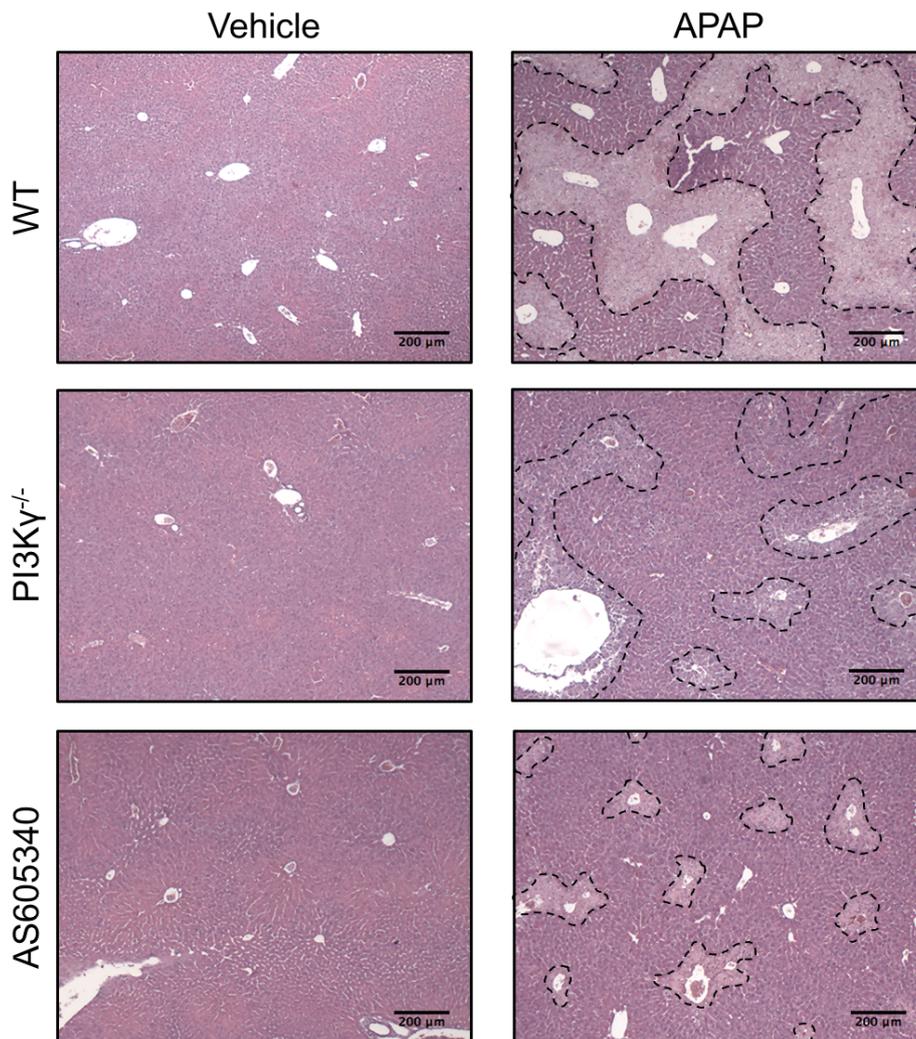


Figura 17: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605340 possuem menor área de lesão hepática induzida por paracetamol que os animais WT.

Camundongos C57BL/6 WT; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. No fígado foi considerado como critério de avaliação a razão  $\frac{\text{área de necrose}}{\text{área de tecido total}}$ . A área necrótica está delimitada com uma linha tracejada. Magnificação 40x. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. N=3 ou mais por grupo de animais WT e AS, e n=4 ou mais por grupo de animal KO. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

Durante a lesão hepática grandes quantidades de material intracelular, são liberados pelos hepatócitos em necrose. De fato, um aumento considerável de DNA mitocondrial pode ser detectado na circulação periférica, indicando que, além da falência hepática, estes animais possivelmente também sofrem danos remotos devido à ativação sistêmica dos leucócitos. Alguns relatos na literatura indicam que além do fígado, a sobredose de paracetamol também afeta as funções cerebrais, renais, cardiovasculares e também respiratórias (BERNAL et al., 2010; HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010; LEE et al., 2015; MARQUES et al., 2012). Dessa forma, também avaliamos no nosso modelo o dano remoto induzido por paracetamol causado no pulmão após 24 horas.

Nossos resultados indicaram que, após a administração de APAP, os animais tiveram intenso influxo de leucócitos para as vias aéreas e que tipo celular predominante neste influxo foram as células mononucleares. No entanto, os animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  e os animais WT tratados com AS605240 tiveram menos células no lavado broncoalveolar (Figura 18A-C).

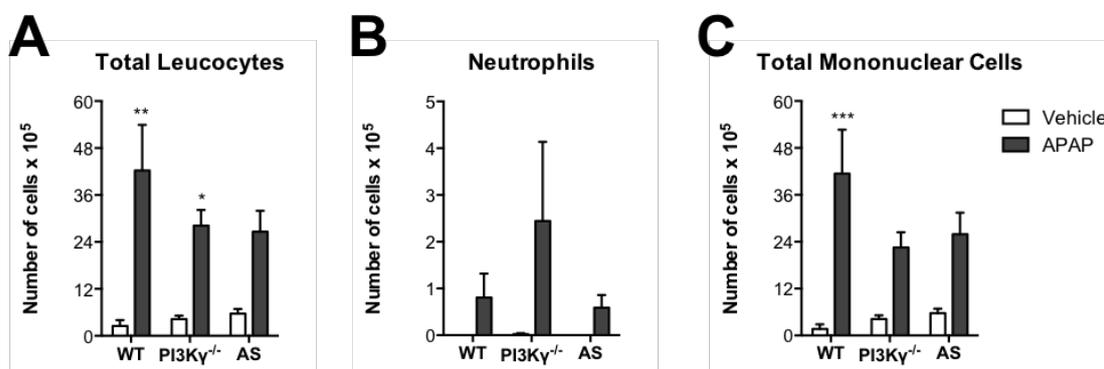


Figura 18: A ausência de  $PI3K\gamma$  resulta em menos células migradas para as vias aéreas após a administração de paracetamol.

Camundongos C57BL/6 WT;  $PI3K\gamma^{-/-}$  e WT tratados com AS605240 foram gavadados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. Foi analisado no BAL a quantidade de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=3 ou mais por grupo de animais WT e AS, e n=4 ou mais por grupo de animal KO. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

Da mesma forma, ao analisarmos histologicamente seções dos pulmões destes animais, observamos que a administração de APAP causou nos animais WT discretos edema e focos hemorrágicos (nem sempre presentes) além de intenso infiltrado inflamatório perivascular constituído de células mononucleares, aspectos que nos animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  e animais WT tratados com AS605240 estavam atenuados (Figura 19 fotomicrografias). De fato, quando analisamos estes

resultados utilizando um escore histológico, concluímos que as diferenças observadas entre os grupos WT, PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 são significativamente diferentes (Figura 19 gráfico).

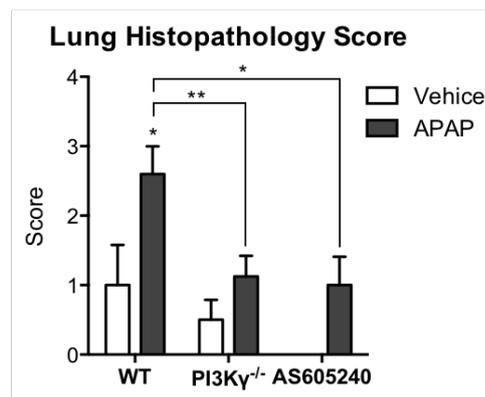
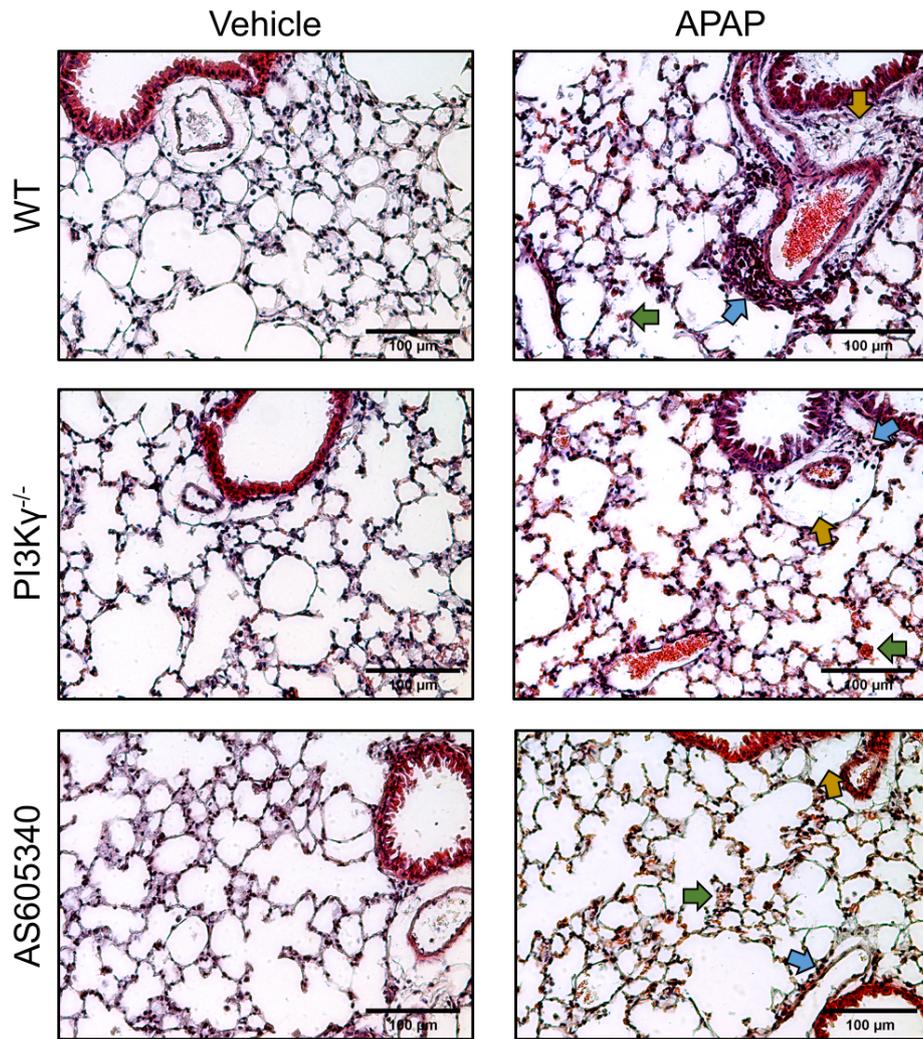


Figura 19: Animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 possuem menor lesão remota pulmonar induzida por paracetamol do que animais WT.

Camundongos C57BL/6 WT; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. No pulmão foram considerados como critério de avaliação edema (seta amarela), infiltrado inflamatório (seta azul) e hemorragia (seta verde). Magnificação 1000x. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. N=5 animais por grupo WT e KO. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

Devido às mudanças tanto inflamatórias quanto histológicas observadas, decidimos também avaliar os camundongos quanto à função pulmonar. Como esperado, a administração de APAP diminuiu as capacidades funcionais dos pulmões dos animais WT como: redução da complacência, aumento da resistência e diminuição do valor de FEV<sub>100</sub> (Figura 20A-C). Por outro lado, quando analisamos o papel da PI3K $\gamma$  no contexto da função pulmonar dos camundongos, observamos que os animais KO tiveram uma pequena melhora, mas significativa, nos três parâmetros em comparação com os animais WT e que a maior proteção observada aconteceu nos animais WT tratados com AS605240 (Figura 20A-C).

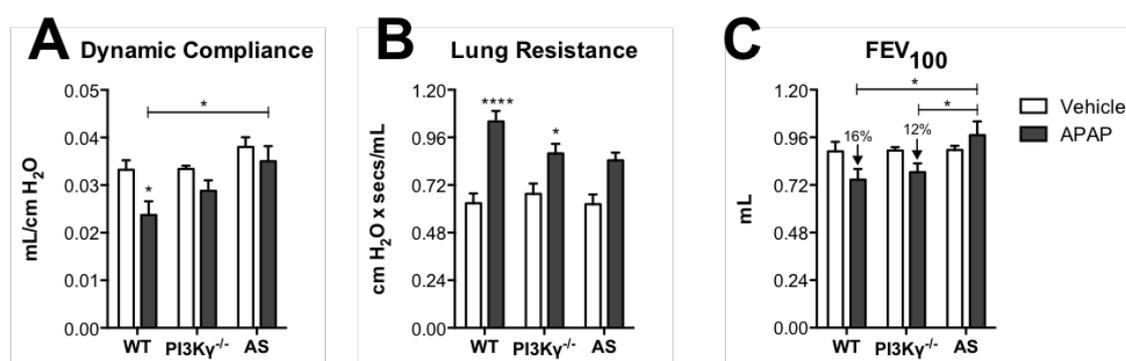


Figura 20: A ausência de PI3K $\gamma$  resgata o fenótipo WT dos parâmetros fisiológicos dos pulmões dos camundongos com falência hepática induzida por paracetamol.

Camundongos C57BL/6 WT; PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e WT tratados com AS605240 foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. Foram analisados a complacência pulmonar (A), a resistência pulmonar (B) e o volume forçado de ar expirado nos primeiros 100 ms (C). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais por grupo de animais WT e n=3 ou mais por grupo de animal KO. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

De posse de todos esses resultados que demonstram que a inibição de PI3K $\gamma$  é eficiente em reverter o quadro de lesão hepática por paracetamol, nos perguntamos se a melhora observada não seria devido a uma deficiência metabólica que a ausência de PI3K $\gamma$  estaria induzindo nos camundongos. Uma vez que a toxicidade induzida por APAP se inicia com o acúmulo de NAPQI no citoplasma, uma menor taxa de conversão do paracetamol pelo citocromo poderia resultar em uma menor lesão devido a menores concentrações do metabolito secundário. Para responder esta questão, camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram tratados com APAP e os níveis de glutathiona oxidada e ALT no sangue foram medidos após 2 horas.

Nossos resultados indicaram que, como esperado, tanto os camundongos WT quanto os PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> tiveram os níveis de glutathiona bastante reduzidos, demonstrando que o metabolismo do paracetamol não estava alterado nos dois camundongos (Figura 21A) e que a proteção que observamos na lesão hepática se dá por outro motivo que não um problema de metabolismo da droga. Um dado interessante é que, ao analisar os níveis séricos de ALT desses animais, percebemos que após duas horas de sobredose, os níveis dessa enzima no sangue são iguais tanto no camundongo WT quanto no camundongo KO (Figura 21B).

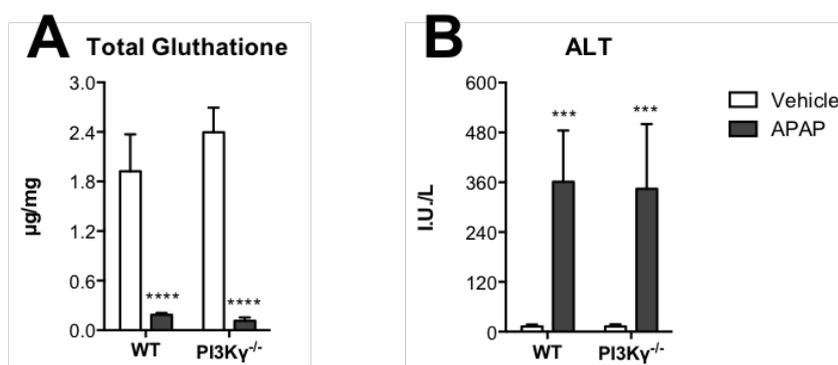


Figura 21: Tanto animais WT quanto PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> possuem níveis similares de glutathiona reduzida e ALT séricos após 2 horas de lesão hepática.

Camundongos C57BL/6 WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 2 horas depois. No fígado foi analisado a quantidade de glutathiona total (A) e no sangue foi analisado os níveis séricos de ALT (B). Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=5 por grupo WT e KO. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparados com o grupo "Vehicle".

Decidimos também investigar em qual tipo de tecido, parênquima ou mielóide, o bloqueio de PI3K $\gamma$  contribui para a diminuição da lesão hepática.

Para isso, desenvolvemos animais quimeras na qual fizemos transplantes de medula entre animais WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> e desafiamos estes animais com APAP. Ao mesmo tempo, utilizamos animais WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> isogênicos para controle interno do experimento. A adição deste último grupo foi necessária pois os animais quimeras precisam de um tempo muito longo de espera para estarem aptos ao uso experimental, o que acarreta em idades bastante avançadas que poderiam comprometer o resultado do experimento. Então, para garantir que os resultados obtidos a partir deste experimento fossem válidos, optamos por incluir este grupo no desenho experimental.

Nossos resultados mostraram que embora mais velhos, a administração de APAP nos animais isogênicos foi capaz de induzir lesão hepática nos camundongos WT e que os animais  $PI3K\gamma^{-/-}$  foram protegidos da lesão (Figura 22) demonstrando que o experimento foi viável.

Ao analisarmos os dados obtidos com os animais quimeras, também observamos que os animais WT→WT também desenvolveram lesão hepática induzida por paracetamol e que os animais  $PI3K\gamma^{-/-}$ → $PI3K\gamma^{-/-}$  também foram protegidos da lesão, assim como nos animais isogênicos. No entanto, o bloqueio parcial da atividade de  $PI3K\gamma$  tanto apenas nas células do parênquima (animais WT→ $PI3K\gamma^{-/-}$ ) quanto apenas nas células mielóides (animais  $PI3K\gamma^{-/-}$ →WT) resultou apenas em uma proteção parcial da lesão nesses animais (Figura 22).

Este dado nos mostra que, para que se tenha um efeito significativo de proteção contra a lesão hepática induzida por APAP, a atividade da enzima  $PI3K\gamma$  precisa ser bloqueada nos dois tipos celulares, o que favorece uma possível transformação desta abordagem em uma técnica terapêutica.

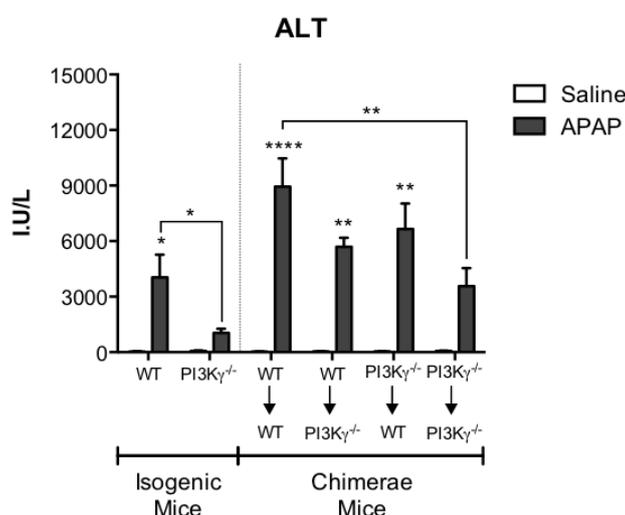


Figura 22:  $PI3K\gamma$  precisa estar ausente tanto nas células mielóides quanto nas células do parênquima para que se tenha proteção completa da lesão hepática induzida por paracetamol.

Camundongos C57BL/6 e  $PI3K\gamma^{-/-}$  foram transplantados com medula WT ou KO para criar animais quimeras, gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. Foi analisado nesses animais os níveis séricos de ALT. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=5 ou mais por grupo

de animais isogênicos, e n=3 ou mais por grupo de animal quimera. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001 comparados com o grupo "Saline" ou quando indicado.

## 5.9 O Tratamento com AS605240 é mais eficiente que NAC na reversão da lesão hepática

De posse de todos os resultados obtidos até o momento neste trabalho e observando o grande potencial que existe em se inibir a PI3Ky, decidimos comparar o tratamento com AS605240 com o padrão ouro NAC no modelo de lesão hepática induzida por paracetamol.

Para isto, camundongos C57BL/6 foram administrados com APAP e tratados com NAC ou AS previamente ou após a medicação com paracetamol de acordo com o esquema da Figura 23, painel direito.

Como já descrito previamente no trabalho, a medicação com sobredose de APAP induziu o aumento de ALT no soro dos animais. Nossos resultados mostraram que a administração prévia de NAC, 1 hora antes do tratamento com paracetamol, foi bastante eficiente em evitar a lesão hepática. Entretanto, quando sua administração foi feita tardiamente, mesmo que duas vezes, ela não fez diferença na progressão da lesão induzida pelo paracetamol. De maneira contrária, o tratamento tardio com AS605240 foi capaz de reduzir em 50% os níveis de ALT no sangue desses animais, indicando que, mesmo na fase mais avançada da doença, ele foi bastante eficiente em diminuir a progressão da lesão (Figura 23 painel esquerdo).

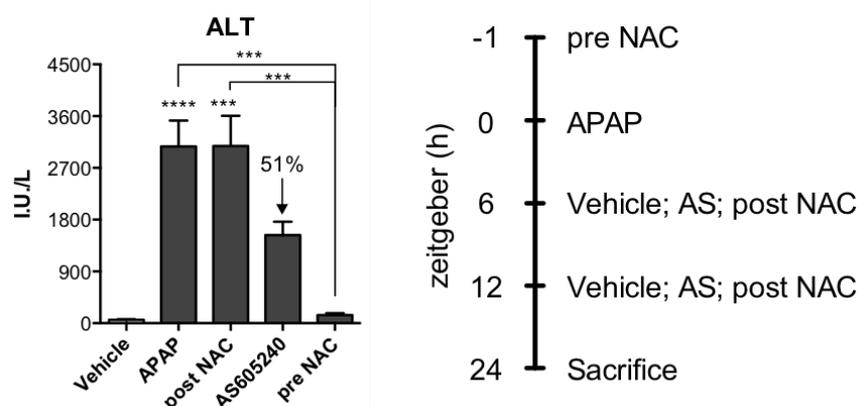


Figura 23: a inibição de PI3Ky é eficaz no tratamento da lesão hepática induzida por paracetamol mesmo em janelas terapêuticas na qual o tratamento com o padrão-ouro, NAC, não é mais eficaz.

Camundongos C57BL/6 WT e WT tratados com AS605240 ou NAC foram gavados com 600 mg/Kg de paracetamol e avaliados 24 horas depois. Os tratamentos foram feitos de acordo com o cronograma acima. Foi analisado nesses animais os níveis séricos de ALT. Os gráficos representam a média  $\pm$  erro padrão da média. N=4 ou mais animais por grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 comparados com o grupo "Vehicle" ou quando indicado.

## 6 Discussão

Tanto os receptores do tipo *Toll* quanto as PI3Ks são proteínas bastante importantes para o hospedeiro, pois estão envolvidas em processos cruciais para o início e desenvolvimento apropriado dos processos inflamatórios e, dessa forma, para a proteção do mesmo. Ambas as proteínas foram descobertas no final do século XX (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012) e tão logo seus papéis foram elucidados, surgiu também o interesse no entendimento de como estas proteínas interagem entre si e modulam a resposta imune (FUKAO; KOYASU, 2003; HAMERMAN et al., 2016; TROUTMAN; BAZAN; PASARE, 2012).

No entanto, este entendimento se tornou mais complexo que o imaginado, pois estudos em tecidos variados demonstraram funções diferentes ou até mesmo opostas em determinadas ocasiões. Entretanto, alguns autores argumentam que estas divergências são devidas ao fato de que a grande maioria dos estudos foram desenvolvidos com inibidores não seletivos de PI3K como a Wortmanina e a LY294002, dessa forma, ao se inibir todas as isoformas de uma vez o papel específico de cada uma é perdido e o que se analisa é o efeito global de sua inibição. Além disso, outros estudos utilizam o método da transfecção para avaliar os efeitos da PI3K, o que pode ser um problema pois o ambiente citoplasmático da célula modelo pode não conseguir reproduzir o ambiente intracelular da célula de interesse (HAZEKI; NIGORIKAWA; HAZEKI, 2007; PITTINI et al., 2016).

Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho foi tentar demonstrar os efeitos que a inibição de isoformas específicas (principalmente  $\gamma$ ) da PI3K é capaz de causar na resposta induzida por ligantes de TLR tanto em modelos utilizando células primárias *in vitro* quanto em modelos murinos *in vivo*.

Este estudo teve seu início nos laboratórios da GSK, na Inglaterra. Naquela ocasião, o objetivo era entender o papel de PI3K $\delta$  na regulação negativa da sinalização de TLR num quadro de COPD. Além da literatura apresentar relatos que suportam a ideia de que a inibição de PI3K $\delta$  aumenta a liberação de citocinas por BMDMs estimulados com agonistas de TLR 2; 4; 5 e 9 (AKSOY et al., 2012; MARSHALL et al., 2012; MOLNARFI et al., 2008; UNO et al., 2010), a

GSK também tinham dados internos que iam de encontro com a literatura apresentada e, dessa forma, suportavam a hipótese deles de que a alta incidência de infecções virais e bacterianas por parte dos pacientes com COPD poderia ser revertida ao inibir PI3K $\delta$  melhorando assim a resposta imune do hospedeiro e evitando novas exacerbações.

Dessa forma, inicialmente realizamos uma triagem com o objetivo de verificar quais ligantes de TLR estimulam PBMCs e qual TLR teria a atividade mais alterada após a inibição da PI3K $\delta$ . Para isso utilizamos um painel com 10 agonistas específicos para cada tipo de TLR e analisamos o resultado através da dosagem de um painel de citocinas. Como esperado, todos os agonistas de TLR foram capazes de induzir a produção de todas as citocinas analisadas de forma concentração-dependente, entretanto, o tratamento com o inibidor GSK'045 não gerou o resultado previsto. Com exceção do TLR9, todos os grupos tratados com o inibidor GSK'045 (anti-PI3K $\delta$ ) não tiveram nenhuma modulação na produção de citocinas.

No caso específico do TLR9, a modulação observada foi o contrário da esperada, uma vez que as células tratadas produziram menos citocinas que as não tratadas (Figura 5). Apesar de controverso, nossos resultados também estão de acordo com outros trabalhos publicados na literatura (ARBIBE et al., 2000; GUIDUCCI et al., 2008; LEE et al., 2010; OJANIEMI et al., 2003; PARK; LEE; SUNG, 2002; RHEE et al., 2006) que também observaram a diminuição da produção de citocinas quando se inibe PI3Ks.

TLR9, assim como TLR4, é capaz de ativar a via dos IRFs e levar a produção de IFNs mesmo não utilizando TRIF na sua via de sinalização (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013). Notavelmente, neste experimento não observamos a indução de IFN- $\alpha$ . Após uma busca na literatura, constatamos que a incapacidade do ODN2006 de induzir a produção dessa molécula é devida à sua estrutura. Sendo um oligonucleotídeo não metilado do tipo B, sua estrutura linear é um forte estimulante da via do NF $\kappa$ B, mas um fraco indutor de IFN- $\alpha$  ([www.invivogen.com](http://www.invivogen.com)). Portanto, a partir deste momento, utilizamos apenas CpG do tipo C, pois estes são capazes de estimular tanto TLRs no endossomo primário quanto no endossomo tardio e assim, estimular tanto a via do NF $\kappa$ B quanto a do IRF.

Os trabalhos citados até o momento que suportam nossos achados tem 2 pontos em comum: (1) sugerem que interação entre a PI3K e o TLR é feita através do reconhecimento de tirosinas fosforiladas e (2) todos eles usaram inibidores não específicos para PI3K, Wortmanina ou LY294002. Dessa forma, esses autores não podem concluir sobre a importância de uma isoforma específica da PI3K para os seus achados.

Devido a essa lacuna, decidimos executar o próximo experimento para avaliar se os resultados encontrados por nós eram específicos para a isoforma  $\delta$  ou se a inibição de uma outra isoforma também abundante nos leucócitos, a  $\gamma$ , levaria ao mesmo o resultado.

Para tal, PBMCs de novos doadores foram coletados e estimulados com uma dose-resposta de CpG e tratados com inibidores específicos de PI3K $\delta$  e  $\gamma$ . Nossos resultados indicaram novamente que a inibição de PI3K  $\delta$  ou  $\gamma$  leva a uma diminuição nos níveis de citocinas liberados pelos PBMCs, entretanto, a isoforma  $\gamma$  é ainda mais importante que a  $\delta$  para a função de TLR9 visto que sua inibição foi capaz de modular a produção de IFNs do tipo 1 (fato que a PI3K $\delta$  não fez) além de reduzir mais os níveis da produção de algumas citocinas, como IFN $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ .

Como até o momento trabalhamos com inibições de isoformas específicas da PI3K e a literatura tem se mostrado conflituosa quanto ao efeito da inibição de PI3K, nos perguntamos se a inibição de todas as isoformas com um fármaco não seletivo reproduziria um efeito diferente do observado até agora por nós ou resultaria numa inibição ainda mais potente do TLR9. Para nossa surpresa, a inibição combinada de todas as isoformas resultou numa inibição ainda maior da produção de citocinas pelos PBMCs, mostrando que as diferentes isoformas podem tem um papel complementar (Figura 6).

Nosso conjunto de dados até agora demonstra que a presença de PI3K $\gamma$  é importante para que a produção e liberação de citocinas induzida por TLR9 seja eficiente. No entanto, ainda não demonstramos claramente a participação de PI3K $\gamma$  nesse processo. Além disso, dados da literatura sugerem que o uso de inibidores de PI3K estão associados a alguns problemas como por exemplo no

caso do análogo inativo do LY294002, o LY303511, em que o uso desse composto levou aos mesmos resultados referentes à resposta dos TLRs, mas com um porém: LY303511 não inibe PI3K (HAZEKI; NIGORIKAWA; HAZEKI, 2007).

Dessa forma, para responder estas duas perguntas, investigamos no nosso modelo a fosforilação da enzima central na via das PI3Ks: a AKT. Realizamos um experimento em que analisamos PBMCs estimulados com uma dose-resposta de CpG longo do tempo. Conseguimos observar com este experimento que os PBMCs estimulados passam a expressar p-AKT de maneira tempo e dose dependente (Figura 7A), o que sugere fortemente que PI3K está envolvida no processo. A prova definitiva de que PI3K $\gamma$  está envolvida na ativação de TLR9 veio com o próximo experimento, no qual PBMCs foram tratados com o fármaco GSK'723 e estimulados com CpG numa dose de 0.4175  $\mu$ M por uma hora. Quando analisamos os níveis de p-AKT destas células, observamos que eles estavam diminuídos e abaixo do nível basal das células controles (Figura 7B).

Outra observação que pudemos fazer neste experimento foi o fato de que p-AKT foi detectada tardiamente após a estimulação com CpG, algo em torno de 10 a 30 minutos. Dessa forma, acreditamos que a ativação de PI3K $\gamma$  durante o processo de estimulação por CpG acontece de forma secundária, devido a algum segundo sinal produzido pelas células.

Park e colaboradores demonstraram que a estimulação de células dendríticas com CpG é capaz de induzir fortemente nestas células uma via de sobrevivência dependente de AKT e que, quando esta é inibida, essa via é completamente desativada o que reduz a sobrevivência das células após 48 horas (PARK; LEE; SUNG, 2002). Desta forma, a hipótese de que os PBMCs poderiam estar morrendo durante a estimulação com CpG e por isso observamos a diminuição na produção de citocinas quando PI3K $\gamma$  é inibida surgiu. Nossos resultados demonstraram que após a estimulação de PBMCs a viabilidade celular era igual para todas os grupos testados, demonstrando que o fato de encontrarmos menos citocinas no sobrenadante celular não era devido a uma menor produção das citocinas devido à morte celular, mas devido à ausência da PI3K $\gamma$  ativa nas células (Figura 8).

Nossos resultados até o momento nos indicam fortemente que PI3K $\gamma$  participa ativamente de alguma forma para que a sinalização do TLR9 ocorra de

maneira adequada nos leucócitos, entretanto, eles não nos permitem afirmar como. A PI3K $\gamma$  participa na ativação celular (PRINCE et al., 2011), dessa forma, pode ser que ela atue como um segundo passo para a completa ativação da célula e que, quando ela é inibida, a produção de citocinas fica prejudicada pois a célula não está completamente ativada. Outra possibilidade para explicar este fato é a de que quando ativada, PI3K ativa AKT/mTOR que por fim inibe a proteína 4E-BP-1 (inibidora de eIF4E, importante fator para a tradução do mRNA) (WALKER et al., 2016) facilitando assim a tradução do mRNA, dessa forma, poderíamos pensar que enquanto os TLRs sinalizam e induzem a transcrição de genes pro inflamatórios, a ativação de PI3K $\gamma$  seria importante para a tradução dos mRNAs gerados. Entretanto, estas duas hipóteses são apenas especulações que esse trabalho não ainda permite nos afirmar.

Uma vez que definimos o papel positivo de PI3K $\gamma$  para a ativação de TLR9 decidimos aplicar estes dados em modelos *in vivo* para testar se a inibição de PI3K $\gamma$  e, como consequência, a menor atividade de TLR9 resultariam em menor inflamação e dano tecidual em modelos murinos onde a hiperreatividade do sistema imune é prejudicial para o hospedeiro.

Antes de testar a nossa hipótese em modelos já pré-estabelecidos, padronizamos um modelo de pleurisia induzido por CpG baseado no modelo de pleurisia por LPS já estabelecido no nosso laboratório. A pleura é um ambiente livre de agentes infecciosos e dessa forma o microambiente é povoado apenas por células mononucleares que vasculham o tecido. Dessa forma, pequenas variações no modelo são facilmente detectadas. A inflamação induzida por LPS na pleura é caracterizada por um rápido infiltrado inflamatório de caráter neutrofílico, com seu pico entre 12 e 24 horas e que, a medida que a inflamação se resolve, o número de neutrófilos diminui à medida que o número de células mononucleares aumenta (VAGO et al., 2015).

Nossos resultados apresentaram-se semelhantes ao modelo já padronizado de LPS. A inflamação induzida por CpG se mostrou de caráter primariamente neutrofílico, com um pico em 12 horas e que, 48 horas após a injeção de CpG a inflação já esta no seu processo resolutivo. Nesta etapa, os neutrófilos não são mais encontrados na cavidade e o número de células mononucleares já está diminuindo para os níveis basais (Figura 9 e Figura 10).

Com o modelo de pleurisia padronizado realizamos nossa prova de conceito: se PI3K $\gamma$  é importante para que TLR9 sinalize apropriadamente e, dessa forma, induzir inflamação, a resposta inflamatória na pleura no modelo de pleurisia induzida por CpG deve ser menor nos animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> que nos animais WT. Ao testar esta hipótese, observamos que o resultado obtido a partir deste experimento corroborou nossas expectativas mostrando que os animais deficientes para PI3K $\gamma$  tiveram um menor infiltrado inflamatório 12 horas após o desafio com CpG e que, as células que mais sofreram redução em seu número foram os neutrófilos Figura 11. Com a prova de conceito finalizada, decidimos testar nossa hipótese em outros modelos já descritos na literatura e no nosso laboratório que são: a silicose e a falência hepática induzida por drogas.

Silicose é um quadro de inflamação pulmonar grave e irreversível causado pela inalação de partículas de sílica. Esta doença é caracterizada por um quadro inflamatório agudo e crônico que resulta em um processo fibrótico granulomatoso que, apesar do painel terapêutico disponível atualmente, esta é uma doença irreversível (FERREIRA et al., 2013). Embora não completamente elucidado, estima-se que ao inalar micropartículas de sílica, macrófagos alveolares residentes reconhecem estas partículas e são ativados via NLRP3 culminando na produção de IL-1 $\beta$  e IL-18. Uma vez que a via do inflamassoma é ativado, as partículas de sílica que foram fagocitadas por estes macrófagos são novamente liberadas para o meio reiniciando o ciclo inflamatório. Este processo cíclico é acompanhado pelo influxo de neutrófilos e linfócitos que, juntamente com outras citocinas e metabólitos como TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ , LTB4 e PGE<sub>2</sub>, amplificam e cronificam a inflamação (GREENBERG; WAKSMAN; CURTIS, 2007; LEUNG; YU; CHEN, 2012).

Apesar de não haver relatos na literatura que relacionam diretamente silicose com TLR9, outros autores demonstraram que a expressão aumentada de TLR9 correlaciona com uma maior gravidade e até mesmo rapidez na evolução do quadro de fibrose pulmonar em modelos como a fibrose pulmonar idiopática (HOGABOAM; TRUJILLO; MARTINEZ, 2012; KIRILLOV et al., 2015; TRUJILLO et al., 2010) e no modelo de fibrose pulmonar induzida por paraquat (QIAN et al., 2015). Aliados a essas evidências literárias, dados prévios não publicados do

nosso grupo também demonstraram que animais deficientes para TLR9 possuem menos inflamação (com menor recrutamento de neutrófilos e células mononucleares para as vias aéreas) e fibrose pulmonar indicada pela quantificação de hidróxiprolina) quando desafiados com sílica (Figura Suplementar 2). Devido a essa forte evidência da participação de TLR9 na fibrose pulmonar, escolhemos este modelo para avaliar o papel da PI3K $\gamma$  na modulação da resposta imune induzida por TLR9..

Nossos resultados demonstraram que, de acordo com o encontrado nos resultados anteriores, os animais deficientes para PI3K $\gamma$  apresentaram menor infiltrado inflamatório nas vias aéreas, principalmente de neutrófilos e menor acúmulo de células mononucleares no parênquima pulmonar quando comparados com os animais WT.

A presença de neutrófilos está relacionada com a liberação de elastases e metaloproteinases, que são enzimas responsáveis pelo afrouxamento e estresse da matriz extracelular. No pulmão, isto permite a transmigração celular para o espaço alveolar e o remodelamento tecidual. Entretanto, elas também induzem a diferenciação e ativação de fibroblastos em miofibroblastos e a transição epitelial-mesenquimal (reprogramação das células epiteliais pulmonares transformando-as em uma célula “fibroblasto-*like*”). Em uma situação onde há o acúmulo de neutrófilos, este efeito pode ser exagerado levando à deposição de matriz extracelular excessiva e fibrose. Da mesma forma, a presença excessiva de células mononucleares é um importante fator para a formação de granulomas, uma vez que estas células são as responsáveis por organizar e formar esta estrutura (FUJINO et al., 2012; WYNN, 2011).

Aliado ao menor infiltrado inflamatório nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ , também observamos que estes animais apresentaram menor fibrose pulmonar observada pelo método de hidroxiprolina, resultados que vão de encontro com outros achados na literatura, como por exemplo no modelo de bleomicina (RUSSO et al., 2011).

De fato, ao observar as fotomicrografias, encontramos nos animais deficientes para PI3K $\gamma$  possuem um infiltrado celular muito menor e também não apresentam as estruturas granulomatosas observadas nos animais WT (Figura 13). Como PI3K $\gamma$  está intimamente ligada à migração celular (JIN et al., 2008), esse

resultado pode ser explicado não só pela menor capacidade das células inflamatórias migrarem para o sítio lesado, mas também pela incapacidade delas de encontrarem os focos da lesão e se estruturarem para formar o granuloma.

As alterações na estrutura do parênquima pulmonar são as principais causas da perda de função, sendo que as suas diminuições estão relacionados a melhores funções fisiológicas (VANOIRBEEK et al., 2010). Como consequência da intensa inflamação que os animais WT apresentaram, foi observado que esses animais tiveram suas funções pulmonares bastante afetadas como baixa complacência, alta resistência e a baixo fluxo de ar pelas vias aéreas.

Baixa complacência e alta resistência significam que o parênquima pulmonar está rijo devido à grande deposição de colágeno por isso, fica mais difícil distender o órgão sob uma mesma pressão causando no indivíduo perdas de volumes pulmonares. Geralmente, menor fluxo está relacionado ao menor diâmetro das vias aéreas, entretanto, neste caso, por se tratar de uma doença restritiva, esta obstrução no fluxo de ar poderia ser justificada por um aumento de muco, edema próximo às vias aéreas superiores, ou até mesmo uma complicação do fluxo pulmonar devido aos vários granulomas. De maneira inversa, devido à menor inflamação crônica, observamos que os animais deficientes para PI3K $\gamma$  tiveram funções pulmonares mais bem preservadas ao final de 28 dias (Figura 15).

Os dados que obtivemos com camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> nos mostraram que a inibição de PI3K $\gamma$  tem um grande potencial terapêutico para tratar casos de silicose e, possivelmente outros casos de fibrose pulmonar, uma vez que sua ausência foi capaz de amenizar as consequências inflamatórias, fibrogênicas e alterações funcionais causadas no pulmão dos animais devido à exposição à sílica. O ideal seria realizarmos um próximo passo, no qual um experimento onde a atividade de PI3K $\gamma$  fosse inibida farmacologicamente fosse realizado, reproduzindo o que aconteceria na clínica de verdade. Entretanto, devido ao alto custo financeiro de se realizar um experimento desse tipo por causa do alto consumo de droga, este experimento não foi feito. Dessa forma, buscamos um modelo mais agudo para tentar entender um pouco mais os mecanismos da interação entre TLR9 e PI3K $\gamma$ . O modelo de escolha foi o de lesão hepática induzida por droga, mais especificamente, o paracetamol.

Paracetamol é o mais famoso e usado medicamento antitérmico e analgésico para o tratamento de sintomas inflamatórios leves. Introduzido na medicina em 1893 inicialmente apenas como um analgésico, seu uso se tornou popular após os anos 1960, mas seu uso ganhou força mesmo mais recentemente devido a novas descobertas relacionando o uso de aspirina a sangramentos gastrointestinais e à síndrome de Rye (HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010).

Embora farmacologicamente seguro em doses terapêuticas, seu uso abusivo, de forma intencional ou acidental, leva à geração excessiva de seu metabólito secundário muito reativo pelo citocromo P-450, o *N*-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQI), que se conjuga à glutatona oxidada causando sua depleção. No caso de uma intoxicação com paracetamol, os níveis de glutatona disponível na célula caem drasticamente e este composto começa a se acumular no citosol e a se ligar covalentemente a outras proteínas. Aliado a isso, devido à falta de glutatona, a célula começa a apresentar estresse oxidativo, metabolismo do cálcio desbalanceado e também disfunção mitocondrial. Com o potencial de membrana mitocondrial prejudicado, o hepatócito não consegue produzir mais ATP e entra em processo de necrose, liberando para o meio extracelular vários componentes intracelulares assim como DNA mitocondrial e genômico e proteínas como HGMB1 e HSP70. A liberação desse material juntamente com citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, vão ativar os neutrófilos que chegam ao local da lesão e, uma vez ativadas, exacerbam a lesão que foi iniciada pela sobredose de paracetamol (HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010; LEE et al., 2015; MARQUES et al., 2012).

Dados prévios do nosso grupo mostram que fígados intoxicados com paracetamol possuem extensas áreas com deposições massivas de DNA que coincidem com as áreas de necrose e que este DNA recobria os sinusóides hepáticos. Além disso, este trabalho também demonstrou que o reconhecimento do DNA pelos neutrófilos via TLR9 é de extrema importância para o progresso da lesão, pois camundongos que não tinham TLR9 ou que foram tratados com um antagonista para este receptor tinham menos necrose hepática, níveis séricos de ALT e TNF- $\alpha$  e DNA intravascular (MARQUES et al., 2015). Seguindo a lógica adotada nesta tese até o momento, hipotetizamos que os animais deficientes para PI3K $\gamma$  ou tratados com AS605240 seriam protegidos da lesão hepática.

Nossos resultados mostraram que de fato, os animais que apresentam a PI3K $\gamma$  inativa (geneticamente ou farmacologicamente) apresentaram menores níveis de ALT no soro (o que indica reduzida lesão hepática) e também menores níveis de MPO no tecido hepático (indicando que os animais tinham menor infiltrado inflamatório). Corroborando estes achados, a análise das micrografias dos fígados coradas por hematoxilina e eosina mostraram uma significativa proteção do tecido hepático (Figura 17).

Segundo relatos médicos, a segunda principal causa de complicações e morte após um quadro agudo de falência hepática são os danos em órgãos remotos que acometem o paciente, principalmente complicações respiratórias e cerebrais (BAUDOIN et al., 1995; BERNAL et al., 2010). Dessa forma, avaliamos se no nosso modelo, o pulmão dos animais acometidos à falência hepática estaria comprometido.

De maneira interessante, observamos que apesar de conferir uma proteção significativa contra o dano hepático, a inibição de PI3K $\gamma$  não foi muito eficiente em impedir a transmigração de leucócitos para as vias aéreas. Interessantemente, ao contrario do observado para o modelo de sílica, a predominância deste infiltrado inflamatório foi de células mononucleares (Figura 18). Algo mais interessante ainda, foi notar que, neste caso, as células migraram contra o gradiente de quimiocinas, uma vez que a concentração mais alta delas estava no sangue e não no espaço alveolar. As alterações histológicas encontradas nesse modelo foram bem discretas com áreas de edema e infiltrado inflamatório mononuclear que se localizava restrito a áreas perivasculares (Figura 19).

Apesar de causar uma pequena alteração morfológica, conseguimos detectar perda de função pulmonar, o que justifica a preocupação na clínica com este tipo de evento. Os camundongos WT tiveram significativa perda na complacência e aumento da resistência juntamente com menor fluxo de ar pelas vias aéreas, o que não foi detectado nos animais deficientes ou tratados com o AS605240 (Figura 20).

Como dito anteriormente, o dano hepático causado pelo metabolismo do paracetamol surge quando o acúmulo do metabólito tóxico NAPQI causa redução dos níveis de GSH causando estresse oxidativo e dano mitocondrial (HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010; JAMES et al., 2003). Dessa forma, decidimos

avaliar o estado metabólico do fígado dos animais após 2 horas da indução da falência hepática para avaliar se o menor dano hepático era devido há um menor metabolismo do APAP pelos hepatócitos ou se era realmente devido à inibição do sistema imune. Neste experimento mostramos que tanto nos animais WT quanto nos animais deficientes para PI3K $\gamma$  o nível de GSH intracelular eram os mesmos indicando a mesma taxa metabólica para o APAP. De maneira interessante, notamos também que os níveis de ALT no sangue dos dois grupos de animais eram os mesmos, o que nos dá um forte indício que o início da doença é igual tanto para os animais WT quanto para os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ , o que difere é a progressão da doença (Figura 21).

PI3K $\gamma$  é muito importante para a biologia dos leucócitos e os relatos na literatura evidenciam que PI3K $\gamma$  está primariamente mais expresso em leucócitos (DEANE; FRUMAN, 2004; VANHAESEBROECK et al., 2010; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012), entretanto, outros relatos também indicam que diferentes células, como o hepatócito, célula acinar no pâncreas e outras, também podem expressar esta enzima (BENIAS et al., 2012; GUKOVSKY et al., 2004; HG et al., 1998; HOHENESTER et al., 2010). Desta forma, decidimos investigar o papel desta enzima em tecidos diferentes no animal: no tecido mielóide (leucócitos) e no parênquima (hepatócitos) através do uso de animais quimeras.

De maneira bastante surpreendente observamos que para que se tenha um efeito protetor nos animais, a PI3K $\gamma$  deve estar ausente dos dois tipos de tecido, o que significa que ela não está atuando somente no tecido mielóide (Figura 22).

As razões para que a ausência de PI3K $\gamma$  contribui para uma menor função dos leucócitos e como consequência menor lesão tecidual já foram abordadas aqui: eles migram menos (JIN et al., 2008), se ativam menos (PRINCE et al., 2011; RUSSO et al., 2011) e produzem menos citocinas (GUIDUCCI et al., 2008). Entretanto, as razões do porquê a PI3K $\gamma$  estaria levando o hepatócito à lesão não são tão óbvias.

A explicação do porquê PI3K $\gamma$  é prejudicial para o hepatócito pode vir com o fato de que, além de expressar PI3K $\gamma$ , eles também expressam TLR9 (SUN et

al., 2016). É sabido que quando o hepatócito entra em colapso devido ao excesso de NAPQI no citoplasma uma das primeiras organelas a perderem função são as mitocôndrias e a maneira que o hepatócito encontra de superar este problema é induzindo a autofagia das organelas danificadas (NI et al., 2016). Uma vez que os hepatócitos expressam TLR9, o DNA proveniente da digestão mitocondrial nos autofagolisossomos seriam capazes de ativar estes receptores que por sua vez levariam a ativação de PI3K $\gamma$  (como demonstrado nesta tese). Uma vez ativadas, as PI3K $\gamma$  levariam à ativação da via AKT/mTOR que interessantemente tem o efeito de bloquear o processo autofágico (HU et al., 2015; LI et al., 2016). Dessa forma, os autofagolisossomos se acumulariam na célula e não haveria assim o *turnover* mitocondrial, uma vez que a mitofagia está alinhada com a mitogênese (MANNAM et al., 2014) resultando assim na depleção energética do hepatócito levando-o à necrose.

Uma vez que o quadro de lesão hepática foi diagnosticado, o tratamento padrão é a suspensão do agente causador da lesão, suporte médico, acompanhamento do paciente e administração de N-acetilcisteína (NAC) (FARMER; BRIND, 2011; LEISE; POTERUCHA; TALWALKAR, 2014). O principal modo de ação do NAC é servir como doador de cisteínas para a síntese *de novo* de GSH e assim aumentar a capacidade celular de absorver o excesso de NAPQI e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como por exemplo o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito (SAITO; ZWINGMANN; JAESCHKE, 2010; ZWINGMANN; BILODEAU, 2006). Entretanto, relatos na literatura indicam que, para que o NAC seja efetivo, os pacientes devem ser medicados ainda na fase inicial da doença, enquanto o APAP ainda está sendo metabolizado, e que, administrações tardias limitam a sua eficácia (BERNAL et al., 2010; SAITO; ZWINGMANN; JAESCHKE, 2010).

Como a janela terapêutica do NAC é bastante específica e reduzida, pois depende de um diagnóstico médico rápido, que nem sempre é possível, e também depende do paciente procurar ajuda médica ainda na fase inicial da doença, o que também nem sempre ocorre, faz da busca por novos meios de tratamento que ainda sejam eficazes mesmo quando o NAC não mais o é. Dessa forma, resolvemos comparar o tratamento com AS605240 com o padrão ouro da clínica NAC.

Nossos resultados demonstraram que, como esperado, o tratamento com NAC após 3 horas de indução da lesão hepática foi ineficiente na reversão do quadro da lesão. Isso se deve ao fato de que uma vez que os hepatócitos estão lesados e com vários adutos de NAPQI, o aporte de NAC para a síntese de GSH não consegue desfazer este efeito, uma vez que as ligações proteína:NAPQI são covalentes. Entretanto, o tratamento com o AS605240 foi capaz de reduzir em 50% os níveis de ALT no sangue dos animais demonstrando um bom efeito protetor nos animais. Como a inibição de PI3K $\gamma$  leva à inativação de AKT/mTOR, é razoável de se pensar que dessa forma o processo de autofagia seja restaurado e a célula consiga eliminar parte das proteínas e organelas danificadas.

Dessa forma, podemos concluir que o tratamento com AS605240 é mais eficiente que o NAC porque além de atuar no sistema imune evitando que os neutrófilos amplifiquem a lesão através do reconhecimento do DNA via TLR9, ele também atuaria evitando que o hepatócito entre em colapso pois ele possivelmente seria capaz de destravar a maquinaria da autofagia.

## 7 Conclusão

O presente estudo demonstra que PI3K $\gamma$  tem um importante papel para que a resposta imunológica induzida pela ativação do TLR9 ocorra. Este fenômeno é evidenciado pois, quando houve intervenção farmacológica ou genética na atividade desta enzima, a produção de citocinas, a migração celular e o dano tecidual desencadeados pela inflamação decorrente da ativação do receptor foram diminuídas tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. O efeito observado parece ser devido a 3 fatores: (1) limitação do recrutamento celular e (2) diminuição da ativação das células recrutadas e (3) resgate de funções celulares que antes estavam travadas. Portanto, este trabalho oferece informações relevantes para o estudo da inibição da PI3K $\gamma$  como alvo terapêutico de doenças na qual a atividade exacerbada do receptor TLR9 se mostra prejudicial para o hospedeiro.

## 8 Material suplementar

### 8.1 Valores de $-\log IC_{50}$ dos inibidores de PI3K

Composto	PI3K $\alpha$	PI3K $\beta$	PI3K $\delta$	PI3K $\gamma$	Liberação de elastase – Nø
GSK'045	6,4	5,8	9,1	6,8	7,5
GSK'723	4,8	6,0	5,9	8,6	5,8
GSK'740	7,4	7,5	8,5	7,4	7,5

Tabela 3: Valores de  $-\log IC_{50}$  para os inibidores específicos de PI3K.

Quanto maior o valor de  $-\log IC_{50}$ , menor a concentração necessária para inibir aquela isoforma específica. Uma diferença de 1 no valor de  $-\log IC_{50}$  significa 10x a concentração necessária para inibir a outra isoforma; uma diferença de 2, 100x e assim por diante. Valores cedidos pela GSK. Nø = neutrófilos

### 8.2 Tabela com os valores das curvas de estimulação para os agonistas representados na Figura 5

Agonista	TLR	Doses				Unidade
		100,00%	25,00%	6,25%	1,56%	
Pam3CSK4	TLR 1/2	2,43	0,61	0,12	0,04	$\mu\text{g/mL}$
HKLM	TLR 2	$1,27 \times 10^8$	$3,17 \times 10^7$	$7,92 \times 10^6$	$1,98 \times 10^6$	cels/mL
Poli(I:C)	TLR 3	66,67	16,67	4,17	1,04	$\mu\text{g/mL}$
Poli(I:C) LMW	TLR 3	66,67	16,67	4,17	1,04	$\mu\text{g/mL}$
LPS	TLR 4	6,67	1,67	0,42	0,10	$\mu\text{g/mL}$
Flagelina	TLR 5	0,83	0,21	0,05	0,01	$\mu\text{g/mL}$
FSL-1	TLR 6/2	1,57	0,39	0,10	0,02	$\mu\text{g/mL}$
Imiquimod	TLR 7	6,67	1,67	0,42	0,10	$\mu\text{g/mL}$
ssRNA40	TLR 8	6,67	1,67	0,42	0,10	$\mu\text{g/mL}$
ODN2006	TLR 9	26,67	6,67	1,67	0,42	$\mu\text{M}$

Tabela 4: Curvas de estimulação para os agonistas de TLR (Resultado 5.1)

### 8.3 Gráficos individuais de cada citocina plotada no Heatmap da Figura 6

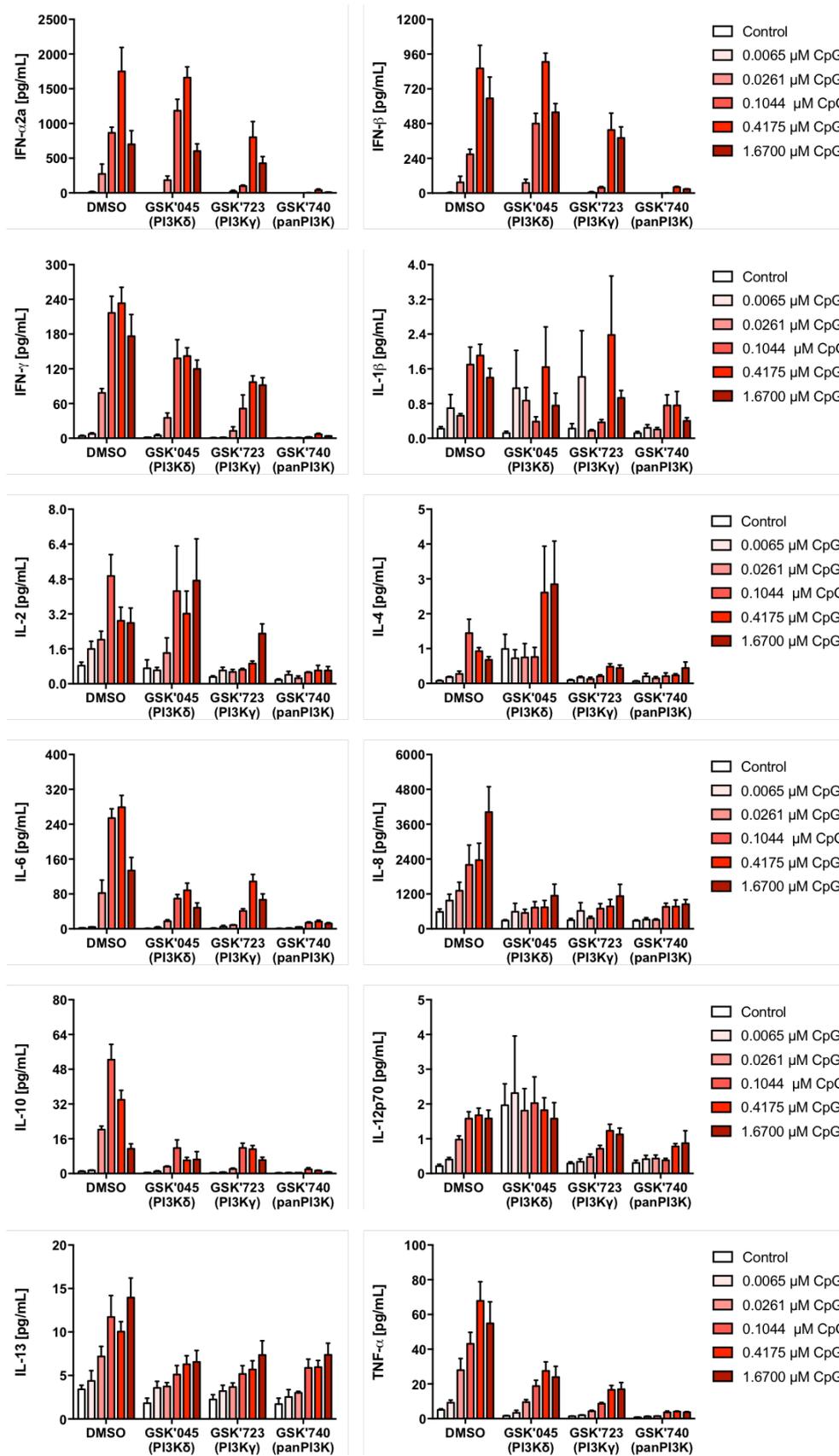


Figura Suplementar 1: Representação gráfica individual de cada citocina plotada no Heatmap da Figura 6.

## 8.4 Inflamação induzida por sílica em animais WT e TLR9<sup>-/-</sup>

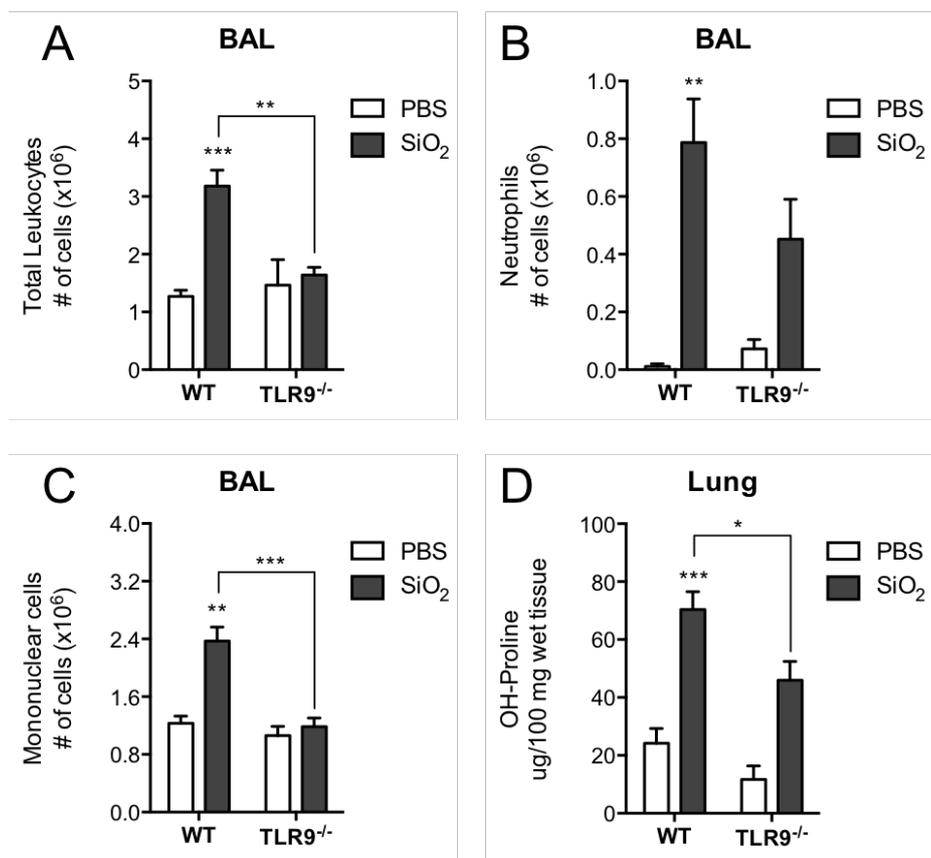


Figura Suplementar 2: A ausência de TLR9 resulta em menor inflamação e fibrose pulmonar induzida por sílica.

Camundongos C57BL/6 WT e TLR9<sup>-/-</sup> foram instilados com 10 mg de sílica e avaliados 28 dias após a instilação. No BAL foram analisados o número total de células (A), de neutrófilos (B) e de células mononucleares (C). No parênquima pulmonar foi estimado a quantidade de colágeno pelo ensaio de hidroxiprolina (D). Os gráficos representam a média ± erro padrão da média. N=3 ou mais por grupo de animais WT e KO. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 comparados com o grupo PBS ou quando indicado.

## Chemokines and Mitochondrial Products Activate Neutrophils to Amplify Organ Injury During Mouse Acute Liver Failure

Pedro E. Marques,<sup>1,2</sup> Sylvia S. Amaral,<sup>1,2</sup> Daniele A. Pires,<sup>1,2</sup> Laura L. Nogueira,<sup>1,2</sup> Frederico M. Soriani,<sup>2,9</sup> **Braulio H.F. Lima,**<sup>2</sup> Gabriel A.O. Lopes,<sup>2,3</sup> Remo C. Russo,<sup>2,3</sup> Thiago V. Ávila,<sup>2,4</sup> Juliana G. Melgaço,<sup>5</sup> André G. Oliveira,<sup>1</sup> Marcelo A. Pinto,<sup>5</sup> Cristiano X. Lima,<sup>2,6</sup> Ana Maria De Paula,<sup>7</sup> Denise C. Cara,<sup>1</sup> Maria F. Leite,<sup>3,8</sup> Mauro M. Teixeira,<sup>2</sup> and Gustavo Batista Menezes<sup>1,2</sup>

Acetaminophen (APAP) is a safe analgesic and antipyretic drug. However, APAP overdose leads to massive hepatocyte death. Cell death during APAP toxicity occurs by oncotic necrosis, in which the release of intracellular contents can elicit a reactive inflammatory response. We have previously demonstrated that an intravascular gradient of chemokines and mitochondria-derived formyl peptides collaborate to guide neutrophils to sites of liver necrosis by CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) and formyl peptide receptor 1 (FPR1), respectively. Here, we investigated the role of CXCR2 chemokines and mitochondrial products during APAP-induced liver injury and in liver neutrophil influx and hepatotoxicity. During APAP overdose, neutrophils accumulated into the liver, and blockage of neutrophil infiltration by anti-granulocyte receptor 1 depletion or combined CXCR2-FPR1 antagonism significantly prevented hepatotoxicity. In agreement with our *in vivo* data, isolated human neutrophils were cytotoxic to HepG2 cells when cocultured, and the mechanism of neutrophil killing was dependent on direct contact with HepG2 cells and the CXCR2-FPR1-signaling pathway. Also, in mice and humans, serum levels of both mitochondrial DNA (mitDNA) and CXCR2 chemokines were higher during acute liver injury, suggesting that necrosis products may reach remote organs through the circulation, leading to a systemic inflammatory response. Accordingly, APAP-treated mice exhibited marked systemic inflammation and lung injury, which was prevented by CXCR2-FPR1 blockage and Toll-like receptor 9 (TLR9) absence (TLR9<sup>-/-</sup> mice). **Conclusion:** Chemokines and mitochondrial products (e.g., formyl peptides and mitDNA) collaborate in neutrophil-mediated injury and systemic inflammation during acute liver failure. Hepatocyte death is amplified by liver neutrophil infiltration, and the release of necrotic products into the circulation may trigger a systemic inflammatory response and remote lung injury. (HEPATOLOGY 2012;00:000–000)

Acetaminophen (APAP) is a widely used over-the-counter analgesic and antipyretic drug used to relieve symptoms of mild inflammatory conditions. However, after accidental or intentional overdose, accumulation of the reactive metabolite, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone-imine, in hepatocytes leads to

*Abbreviations:* ALF, acute liver failure; ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; APAP, acetaminophen; BAL, bronchoalveolar lavage; CXCR2, CXC chemokine receptor 2; DCF-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DILI, drug-induced liver injury; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FPR1, formyl peptide receptor 1; gDNA, genomic DNA; GRI, granulocyte receptor 1; IgG, immunoglobulin G; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; IIR, ischemial reperfusion; IV, intravenous; IVM, intravital microscopy; LT, liver transplantation; Lysm-eGFP, lyszyme M promoter for enhanced green fluorescent protein; mitDNA, mitochondrial DNA; MPO, myeloperoxidase; nDNA, nuclear DNA; NO, nitric oxide; PCR, polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; ROS, reactive oxygen species; SEM, standard error of the mean; TLR9, Toll-like receptor 9; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais.

From the <sup>1</sup>Laboratório de Imunobiofísica, Departamento de Morfologia; <sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia; <sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica; <sup>4</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>5</sup>Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>6</sup>Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina; <sup>7</sup>Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>8</sup>Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD; and <sup>9</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Received March 12, 2012; accepted April 16, 2012.

1

Artigo 1: MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology* (Baltimore, Md.), v. 56, n. 5, p. n/a–n/a, 2012.

## 8.6 Artigo em processo de submissão

### PI3K-GAMMA REGULATES THE BALANCE BETWEEN ANTIVIRAL AND INFLAMMATORY RESPONSES DURING INFLUENZA A INFECTION

Cristiana C. Garcia<sup>1,2</sup>, Luciana P. Tavares<sup>2</sup>, Ana Carolina F. Dias<sup>2</sup>, Celso M. Queiroz-Junior<sup>3</sup>, Izabela Galvão<sup>2</sup>, **Braulio H. Lima<sup>2</sup>**, Ana Paula F. Gonçalves<sup>4</sup>, Frederico M. Soriani<sup>2,5</sup>, João T. Marques<sup>6</sup>, Alexandre M. V. Machado<sup>4</sup>, Lirlândia P. Sousa<sup>2,7</sup>, Remo C. Russo<sup>2,8</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>4</sup>Fiocruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil;

<sup>5</sup>Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>6</sup>Laboratório de RNA de Interferência, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

<sup>7</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

<sup>8</sup>Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Keywords:** PI3K $\gamma$ , Influenza, Innate Immunity, type-I IFN, Inflammation

**Corresponding author:** Cristiana C. Garcia

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo. Avenida Brasil 4365 - Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B105. Manguinhos, CEP 21040360 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

cristiana.garcia@ioc.fiocruz.br

*Artigo 2: Paper sobre a importância de PI3K $\gamma$  para a proteção do hospedeiro no modelo de infecção murina com Influenza A. Manuscrito pronto e em processo de submissão.*

## 9 Bibliografia

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015.
- ACHEK, A.; YESUDHAS, D.; CHOI, S. Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. **Archives of Pharmacal Research**, p. 1–18, 9 ago. 2016.
- AKSOY, E. et al. The p110 $\delta$  isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. **Nature Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1045–1054, nov. 2012.
- ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, ago. 2013.
- ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34 Suppl 1, p. 15–21, set. 2010.
- ANDERSON, K. V.; JÜRGENS, G.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. **Cell**, 1985.
- ARBIBE, L. et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. **Nature Immunology**, v. 1, n. 6, p. 533–540, dez. 2000.
- BACKER, J. M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The EMBO journal**, v. 11, n. 9, p. 3469–3479, set. 1992.
- BARNIE, P. A. et al. CpG-oligodeoxynucleotides suppress the proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells via toll-like receptor 9 signaling and upregulation of Runt-related transcription factor 3 expression. **Biomedical reports**, v. 2, n. 3, p. 374–377, maio 2014.
- BAUDOQUIN, S. V. et al. Acute lung injury in fulminant hepatic failure following paracetamol poisoning. **Thorax**, v. 50, n. 4, p. 399–402, abr. 1995.
- BENIAS, P. C. et al. Hepatic expression of toll-like receptors 3, 4, and 9 in primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis C. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, v. 36, n. 5, p. 448–454, out. 2012.
- BERNAL, W. et al. Acute liver failure. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9736, p. 190–201, 17 jul. 2010.
- BIRTOLO, C. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase: A Link Between Inflammation and Pancreatic Cancer. **Pancreas**, 2016.
- CARPENTER, C. L. et al. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 32, p. 19704–19711, 15 nov. 1990.
- CHEN, G. Y.; NÚÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 19 nov. 2010.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181–189, 1 ago. 2015.

DEANE, J. A.; FRUMAN, D. A. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 563–598, 2004.

FARMER, A. D.; BRIND, A. Drug-induced liver injury. **Medicine**, 2011.

FERREIRA, T. P. T. et al. IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, p. 5220–5229, 15 nov. 2013.

FROSALI, S. et al. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 489821, 2015.

FRY, M. J. et al. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase complex from bovine brain by using phosphopeptide affinity columns. **The Biochemical journal**, v. 288 ( Pt 2), p. 383–393, 1 dez. 1992.

FUJINO, N. et al. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice. **Experimental lung research**, v. 38, n. 1, p. 28–36, fev. 2012.

FUKAO, T. et al. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. **Nature Immunology**, v. 3, n. 9, p. 875–881, set. 2002.

FUKAO, T.; KOYASU, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends in immunology**, v. 24, n. 7, p. 358–363, jul. 2003.

GARCIA, C. C. et al. The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. **Discovery medicine**, v. 10, n. 55, p. 479–488, dez. 2010.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. **Drosophila Toll and IL-1 receptor**. Tradução. [s.l.] Nature, 1991.

GRACIAS, D. T. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 $\delta$  Isoform Regulates CD8<sup>+</sup> T Cell Responses during Acute Viral and Intracellular Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1186–1198, 1 fev. 2016.

GREENBERG, M. I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: a review. **Disease-a-month : DM**, v. 53, n. 8, p. 394–416, ago. 2007.

GUIDUCCI, C. et al. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 2, p. 315–322, 18 fev. 2008.

GUKOVSKY, I. et al. Phosphatidylinositide 3-kinase  $\gamma$  regulates key pathologic responses to cholecystokinin in pancreatic acinar cells. **Gastroenterology**, 2004.

HAMERMAN, J. A. et al. Negative regulation of TLR signaling in myeloid cells—implications for autoimmune diseases. **Immunological reviews**, v. 269, n. 1, p. 212–227, jan. 2016.

HAWKINS, P. T.; JACKSON, T. R.; STEPHENS, L. R. Platelet-derived growth factor

stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> by activating a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 3-OH kinase. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 157–159, 9 jul. 1992.

HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 6, p. 882–897, jun. 2015.

HAZEKI, K.; NIGORIKAWA, K.; HAZEKI, O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 9, p. 1617–1623, set. 2007.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740–745, 7 dez. 2000.

HG, B. et al. Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 44, n. 6, p. 973–983, set. 1998.

HINSON, J. A.; ROBERTS, D. W.; JAMES, L. P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 196, p. 369–405, 2010.

HOGABOAM, C. M.; TRUJILLO, G.; MARTINEZ, F. J. Aberrant innate immune sensing leads to the rapid progression of idiopathic pulmonary fibrosis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, n. Suppl 1, p. S3, 2012.

HOHENESTER, S. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase p110 $\gamma$  contributes to bile salt-induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human hepatoma cells. **Journal of hepatology**, v. 53, n. 5, p. 918–926, nov. 2010.

HORNUNG, V. et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)**, v. 168, n. 9, p. 4531–4537, 1 maio 2002.

HU, B. et al. Binding of the pathogen receptor HSP90AA1 to avibirnavirus VP2 induces autophagy by inactivating the AKT-MTOR pathway. **Autophagy**, v. 11, n. 3, p. 503–515, 2015.

HUBBS, A. F. et al. Acute lung injury induced by a commercial leather conditioner. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 37–46, mar. 1997.

HUBBS, A. F. et al. Necrosis of nasal and airway epithelium in rats inhaling vapors of artificial butter flavoring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2002.

ISHII, K. J. et al. Cutting edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase .... **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 2, p. 269–274, 15 jul. 2002.

JAMES, L. P. et al. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 75, n. 2, p. 458–467, out. 2003.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative ...**, 1989.

- JIN, T. et al. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 1–8, out. 2008.
- JONES, G. E. et al. Requirement for PI 3-kinase  $\gamma$  in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. **Experimental Cell Research**, 2003.
- KAPLAN, D. R. et al. Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 3624–3628, jun. 1986.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 25 mar. 2009.
- KIRILLOV, V. et al. Sustained Activation of Toll-Like Receptor 9 Induces an Invasive Phenotype in Lung Fibroblasts: Possible Implications in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **The American journal of pathology**, 7 fev. 2015.
- KULKARNI, S. et al. PI3K $\beta$  plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. **Science signaling**, v. 4, n. 168, p. ra23, 2011.
- LEE, I.-T. et al. Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rac1 in lipoteichoic acid-induced cPLA2/COX-2-dependent airway inflammatory responses. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 4, p. 1671–1684, abr. 2010.
- LEE, K. C. L. et al. Extracorporeal liver assist device to exchange albumin and remove endotoxin in acute liver failure: Results of a pivotal pre-clinical study. **Journal of hepatology**, v. 63, n. 3, p. 634–642, set. 2015.
- LEISE, M. D.; POTERUCHA, J. J.; TALWALKAR, J. A. Drug-induced liver injury. **Mayo Clinic proceedings**, v. 89, n. 1, p. 95–106, jan. 2014.
- LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973–983, 20 set. 1996.
- LEUNG, C. C.; YU, I. T. S.; CHEN, W. Silicosis. **The Lancet**, 2012.
- LI, X. et al. TLR9-ERK-mTOR signaling is critical for autophagic cell death induced by CpG oligodeoxynucleotide 107 combined with irradiation in glioma cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 27104, 2016.
- LIEW, F. Y. et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 6, p. 446–458, jun. 2005.
- MACARA, I. G.; MARINETTI, G. V.; BALDUZZI, P. C. Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2728–2732, maio 1984.
- MANNAM, P. et al. MKK3 regulates mitochondrial biogenesis and mitophagy in sepsis-induced lung injury. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 7, p. L604–L619, 1 abr. 2014.
- MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 56, n. 5, p. n/a–n/a, 21 ago. 2012.

- MARQUES, P. E. et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 61, n. 1, p. 348–360, jan. 2015.
- MARQUES, R. E. et al. Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 2, p. e27, 31 mar. 2016.
- MARSHALL, N. A. et al. Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN- $\gamma$ +IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors. **Cancer research**, v. 72, n. 3, p. 581–591, 1 fev. 2012.
- MCDONALD, B. et al. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. **Science (New York, NY)**, v. 330, n. 6002, p. 362–366, 14 out. 2010.
- MEDINA, E. A.; MORRIS, I. R.; BERTON, M. T. Phosphatidylinositol 3-kinase activation attenuates the TLR2-mediated macrophage proinflammatory cytokine response to Francisella tularensis live vaccine strain. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7562–7572, 15 dez. 2010.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, mar. 2010.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 24 jul. 1997.
- MIRANDA-HERNANDEZ, S. et al. Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 2, p. 791–804, 15 jul. 2011.
- MOLNARFI, N. et al. Differential regulation of cytokine production by PI3Kdelta in human monocytes upon acute and chronic inflammatory conditions. **Molecular immunology**, v. 45, n. 12, p. 3419–3427, jul. 2008.
- NI, H.-M. et al. Removal of acetaminophen protein adducts by autophagy protects against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of hepatology**, 2 maio 2016.
- O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. PERSPECTIVES. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 17 maio 2013.
- OJANIEMI, M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 3, p. 597–605, mar. 2003.
- OKKENHAUG, K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 675–704, 2013.
- PARK, Y.; LEE, S. W.; SUNG, Y. C. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)**, v. 168, n. 1, p. 5–8, 1 jan. 2002.

- PITTINI, Á. et al. International Immunopharmacology. **International Immunopharmacology**, v. 36, n. C, p. 213–217, 1 jul. 2016.
- PRINCE, L. R. et al. The role of TLRs in neutrophil activation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 397–403, 1 ago. 2011.
- QIAN, J. et al. Increased toll-like receptor 9 expression is associated with the severity of paraquat-induced lung injury in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 430–438, abr. 2015.
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature protocols**, 2006.
- RAHMANI, F.; REZAEI, N. Therapeutic targeting of Toll-like receptors: a review of Toll-like receptors and their signaling pathways in psoriasis. **Expert review of clinical immunology**, p. 1–10, 4 jul. 2016.
- REDDY, G. K. et al. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1 jun. 1996.
- RHEE, S. H. et al. Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2006.
- ROCK, K. L. et al. The Sterile Inflammatory Response. **Annual review of immunology**, v. 28, n. 1, p. 321–342, mar. 2010.
- ROMMEL, C. et al. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 191–201, mar. 2007.
- RUDERMAN, N. B. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 4, p. 1411–1415, fev. 1990.
- RUSE, M. et al. New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases. **Immunologic research**, v. 34, n. 1, p. 33–48, 2006.
- RUSSO, R. C. et al. Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 2, p. 269–282, fev. 2011.
- SAITO, C.; ZWINGMANN, C.; JAESCHKE, H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 1, p. 246–254, jan. 2010.
- SANDOR, F. et al. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. **Folia biologica**, v. 51, n. 6, p. 188–197, 2005.
- SARKAR, S. N. et al. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. **Nature structural & molecular biology**, v. 11, n. 11, p. 1060–1067, nov. 2004.
- SASAKI, T. et al. Function of PI3K $\gamma$  in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. **Science (New York, NY)**, 2000.

- SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, 1986.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 632–640, ago. 2013.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, dez. 2005.
- SKOLNIK, E. Y. et al. Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 83–90, 5 abr. 1991.
- SMITH, D. F. et al. Leukocyte phosphoinositide-3 kinase  $\{\gamma\}$  is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 6, p. 1491–1499, dez. 2006.
- STEPHENS, L. et al. A Novel Phosphoinositide 3 Kinase Activity in Myeloid-Derived Cells Is Activated by G Protein  $\beta\gamma$  Subunits. **Cell**, v. 77, p. 83–93, 8 abr. 1994.
- STEPHENS, L. R. et al. The G $\beta\gamma$  sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. **Cell**, 1997.
- STEPHENS, L. R.; HUGHES, K. T.; IRVINE, R. F. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. **Nature**, v. 351, n. 6321, p. 33–39, 2 maio 1991.
- STEPHENS, L.; HAWKINS, P. T.; DOWNES, C. P. Metabolic and structural evidence for the existence of a third species of polyphosphoinositide in cells: D-phosphatidylmyo-inositol 3-phosphate. **The Biochemical journal**, v. 259, n. 1, p. 267–276, 1 abr. 1989.
- STEWART, R. Dorsal, an embryonic polarity gene in Drosophila, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. **Science (New York, NY)**, v. 238, n. 4827, p. 692–694, 30 out. 1987.
- SUGIMOTO, Y. et al. Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 2117–2121, abr. 1984.
- SUN, L. et al. Expression of toll-like receptors in hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- TAKEDA, K. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 22 nov. 2004.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.
- TRAYNOR-KAPLAN, A. E. et al. An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 353–356, 28 jul. 1988.
- TRAYNOR-KAPLAN, A. E.; THOMPSON, B. L.; HARRIS, A. L. Transient increase in phosphatidylinositol 3, 4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during

activation of human neutrophils. **Journal of Biological ...**, 1989.

TROUTMAN, T. D.; BAZAN, J. F.; PASARE, C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. **Cell cycle (Georgetown, Tex)**, v. 11, n. 19, p. 3559–3567, 1 out. 2012.

TRUJILLO, G. et al. TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 57, p. 57ra82, 10 nov. 2010.

UNO, J. K. et al. Altered macrophage function contributes to colitis in mice defective in the phosphoinositide-3 kinase subunit p110 $\delta$ . **Gastroenterology**, v. 139, n. 5, p. 1642–53– 1653.e1–6, nov. 2010.

VAGO, J. P. et al. The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4940–4950, 1 maio 2015.

VANHAESEBROECK, B. et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329–341, maio 2010.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 195–203, mar. 2012.

VANOIRBEEK, J. A. J. et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 96–104, jan. 2010.

WALKER, N. M. et al. Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) and mTORC2 as Key Signaling Intermediates in Mesenchymal Cell Activation. **The Journal of biological chemistry**, p. 1–19, 11 jan. 2016.

WEICHHART, T.; HENGSTSCHLÄGER, M.; LINKE, M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 599–614, out. 2015.

WHITHAM, S. et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1101–1115, 23 set. 1994.

WHITMAN, M. et al. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. **Nature**, v. 315, n. 6016, p. 239–242, maio 1985.

WHITMAN, M. et al. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. **Nature**, v. 332, n. 6165, p. 644–646, 14 abr. 1988.

WYNN, T. A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 7, p. 1339–1350, 4 jul. 2011.

YU, Y. et al. TLR5-mediated phosphoinositide 3-kinase activation negatively regulates flagellin-induced proinflammatory gene expression. **The Journal of Immunology**, 2006.

ZWINGMANN, C.; BILODEAU, M. Metabolic insights into the hepatoprotective role of

N-acetylcysteine in mouse liver. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 43, n. 3, p. 454–463, mar. 2006.

[http://www.proteinatlas.org/search/pik3\\*](http://www.proteinatlas.org/search/pik3*) (visitado em 19/02/2016)

<https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt-signaling-pathway/pathways-akt-signaling> (visitado em 27/08/2016)

<http://www.invivogen.com/tlr9-agonist> (visitado em 27/08/216)