

**JOSIAS BRITO FRAZÃO**

**EFEITO DO IFN- $\gamma$  E TNF- $\alpha$  SOBRE A EXPRESSÃO  
GÊNICA DE CYBB E PROCESSAMENTO DE SEUS  
TRANSCRITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO  
2014

**JOSIAS BRITO FRAZÃO**

**EFEITO DO IFN- $\gamma$  E TNF- $\alpha$  SOBRE A EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *CYBB* E PROCESSAMENTO DE SEUS  
TRANSCRITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

Versão original

SÃO PAULO  
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Frazão, Josias Brito.

Efeito do IFN-gama e TNF-alfa sobre a expressão gênica de CYBB e processamento de seus transcritos / Josias Brito Frazão. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia Aplicada.

Versão do título para o inglês: The effect of IFN-gamma e TNF-alpha on CYBB gene expression and its transcripts processing.

1. Doença Granulomatosa Crônica 2. Splicing 3. IFN-gama  
4. Ligado ao X 5. CYBB 6. NADPH-Oxidase I. Condino Neto,  
Antonio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB021/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Josias Brito Frazão.

Título da Tese: Efeito do IFN-gama e TNF-alfa sobre a expressão gênica de CYBB e processamento de seus transcritos.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Condino Neto.

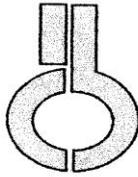
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

**PARECER 887/CEP**

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 93ª reunião realizada em 24.003.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Influenciado ifn-gama e tnf-alfa sobre a expressão genica de cybb e processamento de seus transcritos*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo.Sr.  
JOSIAS BRITO FRAZÃO  
Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedico este trabalho...

...Ao meu pai, Edson, que sempre foi e será modelo de dedicação, profissionalismo, honestidade, dignidade e perseverança. Por todo seu amor dedicado à nossa família, obrigado pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões; e incentivo constante para a realização dos meus sonhos.

...À minha mãe, Stella, pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, por seu amor, incentivo e compreensão. Muito obrigado por me ensinar a lutar pelos meus sonhos, por acreditar em mim e por copartilhar muito de minhas angústias e conquistas.

...Aos meus avós, que foram sempre alicerce para todas as conquistas.

...Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre me deram apoio, carinho e sempre estiveram presentes ao longo desta caminhada.

...À Carolina Kina e sua família, por me apoiarem em todos os momentos e incentivarem cada vez mais em seguir em frente. Agradeço pelo companheirismo e amor que me dá forças para superar obstáculos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Antonio Condino Neto, minha eterna gratidão por aceitar a difícil tarefa de orientar um trabalho em andamento e contribuir decisivamente com a qualidade do mesmo. Obrigado pela orientação, amizade, apoio, confiança na minha capacidade profissional, oportunidade e incentivo que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Peter Newburger, pela solidariedade que sempre lhe foi peculiar, por sua competência teórica e seus ricos ensinamentos durante todo o doutorado que tornaram a experiência da realização do presente trabalho um processo profissionalmente engrandecedor.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade, que juntamente com todos os seus alunos e funcionários, me fizeram sentir à vontade todas as vezes que estive em seu laboratório, que me propiciou a possibilidade de grande conhecimento e crescimento profissional. Muito obrigado pela colaboração, pelo apoio em todos os momentos e, principalmente, pela amizade.

Ao Dr. Michal Okoniewski, meus sinceros agradecimentos à contribuição imprescindível na realização desta tese e pelos seus ensinamentos em bioinformática. Obrigado pela forma cuidadosa como me orientou neste processo.

Aos amigos de hoje e sempre...

...Christina Kubo e Silvana Lucchini, que, com seus trabalhos cotidianos, ajudaram na produção do presente trabalho, além da amizade constante criada durante o tempo de convívio.

...Paulo Vitor e Walmir, amigos desde faculdade cuja amizade e companheirismo estarão sempre ao meu lado.

... Patrícia Macchiaverni, Paolo, Marília Kanegae, Zé Antonio, Eric e Edgar cuja companhia pude contar da mesma forma nos momentos de dificuldade, quanto nos de alegria. Obrigado por todos os ensinamentos diários fundamentais para a realização deste trabalho.

...todos do Laboratório de Imunologia Humana (LIH), pelas ricas trocas de experiências que tornamos possíveis durante esse percurso, pelos auxílios prestados e por todos os momentos de convívio e paciência.

Às colegas, Ana Lucia, Elaine, Camila, Mariana, Simone, Fabiana, Rosana, Gerlandia, Patricia, Flavia e Leuridan pela convivência e companheirismo dentro e fora do laboratório. Muito obrigado pela grande amizade.

Aos amigos do LIF, por quem guardo eterno carinho, estima e muita saudade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia da USP, por partilharem seus conhecimentos.

Aos companheiros pós-graduandos de todos os andares e laboratórios, pelo apoio, auxílio e amizade construída.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Lepique e Dr. Marcelo de Franco que aceitaram o meu convite e contribuíram de forma muito construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do nosso trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Imunologia: Amanda, Jotelma e Enir, pelo desempenho e dedicação em todos os momentos em que precisei. Ao Miltoninho, Otacílio e Moisés que estão sempre sorridentes e dispostos a ajudar.

Aos grandes e eternos amigos por todos os momentos (apesar de cada vez mais raros).

Aos pacientes que tornaram possível este estudo.

À Universidade de São Paulo pelo apoio institucional, ao investir no meu aperfeiçoamento.

Agradecimento ao apoio financeiro da FAPESP: processo nº 2008/58840-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

**Nelson Mandela**

## RESUMO

Frazão, JB. Efeito do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sobre a expressão gênica de *CYBB* e processamento de seus transcritos. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema NADPH oxidase fagocítico humano é responsável pela geração de superóxido e outros reativos intermediários do oxigênio, críticos na defesa contra patógenos. Defeitos neste sistema resultam na doença granulomatosa crônica (DGC), caracterizado por infecções recorrentes graves. Nesta tese de doutorado, investigamos o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos pós-transcricionais relativos à expressão do gene *CYBB* (gene da gp91-*phox*) em leucócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com DGC ligada ao X, ocasionada por defeitos de *splicing*. Analisamos a influência do IFN- $\gamma$  sobre o padrão de expressão das proteínas que compõem o *spliceossomo*, o padrão de expressão dos transcritos totais do gene *CYBB*, determinando o nível de expressão total dos transcritos e a atividade do sistema NADPH oxidase medindo a liberação de superóxido, avaliada antes e após o tratamento com IFN- $\gamma$ . A análise dos mecanismos que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida. Os mecanismos que levam as diferentes formas clínicas de DGC não estão bem esclarecidos, da mesma forma que o efeito do IFN- $\gamma$  sobre esse sistema enzimático, justificando o presente estudo. Os dados obtidos nos permitem concluir que o IFN- $\gamma$  *in vitro* aumenta a expressão de transcritos do gene *CYBB* e *NCF1* tanto de células THP1, U937 e GM12878, quanto de células de linhagem B-EBV de indivíduos sadios e dos pacientes estudados. Além disso, o IFN- $\gamma$  causa modificações na expressão de genes relacionados à transcrição, ao processo de *splicing*, à genes de fatores de transcrição, genes relacionados à via do TNF- $\alpha$  e genes com *splicing* alternativos em células THP1, U937 e B-EBV. Observamos que o IFN- $\gamma$  *in vitro* diminui a expressão do gene *SRPK1* em células THP1, diminui a expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1* e *UPF3A* e aumenta de expressão de *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células de paciente DGC secundária a defeitos de *splicing*. Identificamos que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  induzem a ativação celular causando aumento da expressão das proteínas envolvidas no processo do *splicing*, ativando o *spliceossoma*. No modelo experimental utilizado, em camundongos, a presença do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  induzem um aumento da presença de neutrófilos ativados no sítio da inflamação e influem na produção de neutrófilos e na ativação destes na medula óssea. O IFN- $\gamma$  e o LPS aumentam a expressão dos genes do sistema NADPH oxidase mediante modificação de padrões de expressão de transcritos (isoformas, pseudogenes ou formas variantes em regiões codantes de mRNA). Concluímos que o IFN- $\gamma$  apresenta uma ação pleiotrópica sendo capaz de aumentar a expressão de genes importantes para uma resposta eficiente do sistema imunológico. Dentre os quais incluímos o sistema NADPH oxidase e genes e proteínas relacionados ao processo de *splicing*, que podem estar relacionados aos efeitos benéficos observados no uso do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC, ocasionada por defeitos de *splicing*.

**Palavras-chave:** Doença Granulomatosa Crônica ligado ao X. X-DGC. *Splicing*. IFN-gama. TNF-alpha.

## ABSTRACT

Frazão, JB. The effect of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on *CYBB* gene expression and its transcripts processing. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

The human phagocyte NADPH oxidase is responsible for the generation of superoxide and other reactive oxygen intermediates, critical in the defense against pathogens. Defects in this system result in chronic granulomatous disease (CGD), which is characterized by severe recurrent infections. In this PhD Thesis, we investigated the effect of IFN- $\gamma$  on post-transcriptional events related to the expression of *CYBB* gene (gene of gp91-phox) in leukocytes of healthy individuals and of patients with X-linked CGD, caused by splicing defects. We analyzed the influence of IFN- $\gamma$  on the expression pattern of the proteins that composes the spliceosome, the expression pattern of total *CYBB* gene transcripts, determining the level of total expression of transcripts, and the NADPH oxidase activity by measuring superoxide release before and after IFN- $\gamma$  treatment. The analysis of the mechanisms that regulate the expression and function of this system is of great importance for the understanding of the physiology of phagocytic cells and its microbicidal activity. The mechanisms that leads to different clinical forms of CGD are not clear, as well as the IFN- $\gamma$  effect on this enzymatic system, justifying the present study. The obtained data allow us to conclude that *in vitro* IFN- $\gamma$  increases the mRNA expression of *CYBB* and *NCF1* gene transcripts, in THP1, U937, and GM12878 cells, as well as in the EBV-B cell lineage of healthy individuals and studied patients. In addition, IFN- $\gamma$  causes changes in the expression of genes related to transcription, splicing, genes related to the TNF- $\alpha$  pathway and genes with alternative splicing in THP1, U937, and B-EBV cell lines. We observed that *in vitro* IFN- $\gamma$  decreases *SRPK1* gene expression in THP1 cells, and decreases the expression of *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A* genes, and increases the expression of *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1*, and *C2* genes in cells from CGD patients, due to splicing defects. We found that IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce cell activation causing increased expression of proteins involved in the splicing process, thus activating the spliceosome. In the used experimental model, in mice, the presence of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce an increase of the number of activated neutrophils at the inflammation site and influence the production of neutrophils and its activation at the bone marrow. IFN- $\gamma$  and LPS increase the expression of the genes encoding the NADPH oxidase system by modifying expression patterns of transcripts (isoforms or variant pseudogenes in mRNA coding regions). We conclude that IFN- $\gamma$  present a pleiotropic effect able to increase the expression of important genes for an effective immune response. Among them we include the NADPH oxidase system, and genes and proteins related to the *splicing* process, which may be related to the beneficial effects related to the use of IFN- $\gamma$  in CGD patient caused by splicing defects.

**Key Words:** X linked Chronic Granulomatous Disease. X-CGD. Splicing. IFN-gamma. TNF-alpha.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Sistema NADPH-oxidase.....	20
<b>Figura 2:</b> Vias de ativação celular mediado pelo IFN- $\gamma$ .....	24
<b>Figura 3:</b> Região promotora do gene <i>CYBB</i> .....	26
<b>Figura 4:</b> A formação do Spliceossoma e a representação do <i>Splicing</i> .....	27
<b>Figura 5:</b> Liberação de superóxido por células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (PBMC) e linfócitos B imortalizados com vírus EBV (B-EBV) de um indivíduo sadio.....	44
<b>Figura 6:</b> Liberação de superóxido por linfócitos B imortalizados com vírus EBV (B-EBV) de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com X-DGC ocasionados por defeitos de <i>splicing</i> e por mutações <i>non-sense</i> .....	45
<b>Figura 7:</b> Análise de similaridade de genes detectados nos ensaios GeneArray.....	47
<b>Figura 8:</b> Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 3 em células B-EBV.....	50
<b>Figura 9:</b> Análise de clusters e comparação de amostras em linfócitos B-EBV de indivíduo saudável (AJ) e paciente X-DGC com defeito de <i>splicing</i> (RJ) através do dChip dos dados obtidos com o <i>WT Gene Array</i> .....	51
<b>Figura 10:</b> Comparação dos dados adquiridos por meio do WT GeneArray em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de <i>splicing</i> e paciente DGC ocasionado por mutação <i>nonsense</i> :.....	53
<b>Figura 11:</b> Análise dos dados referente à expressão dos genes do sistema NADPH oxidase em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de <i>splicing</i> e paciente DGC ocasionado por mutação <i>nonsense</i> .....	54
<b>Figura 12:</b> Análise dos genes relacionados ao processo de <i>splicing</i> induzidos pelo IFN $\gamma$ em células BEBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de <i>splicing</i> e paciente DGC ocasionado por mutação <i>nonsense</i> .....	55
<b>Figura 13:</b> Análise funcional da rede de interações dos genes que se demonstraram induzidos pelo IFN $\gamma$ e que são relacionados ao processo de <i>splicing</i> em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de <i>splicing</i> e paciente DGC ocasionado por mutação <i>nonsense</i> .....	55
<b>Figura 14:</b> Análise da expressão gênica do sistema NADPH-oxidase por Real-Time PCR.....	57
<b>Figura 15:</b> Análise da expressão gênica dos genes <i>CXCL10</i> , <i>IRF1</i> e <i>IFI44L</i> por Real-Time PCR.....	58
<b>Figura 16:</b> Marcação das proteínas do spliceossoma em linfócitos B imortalizados com EBV.....	59
<b>Figura 17:</b> Modificações na distribuição da marcação das proteínas do spliceossoma em linfócitos B imortalizados com EBV.....	60
<b>Figura 18:</b> Marcação das proteínas do spliceossoma em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico.....	61
<b>Figura 19:</b> Modificações na distribuição da marcação das proteínas do spliceossoma em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico.....	62
<b>Figura 20:</b> Análise de similaridade de genes detectados nos ensaios GeneArray.....	73

<b>Figura 21.</b> Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 5 em células THP1.....	78
<b>Figura 22.</b> Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 6 em células U937.....	79
<b>Figura 23.</b> Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 7 em células GM12878.....	80
<b>Figura 24.</b> Análise de clusters e comparação de amostras em células THP1, U937 e GM12878 através do dChip dos dados obtidos com o <i>WT Gene Array</i> .....	81
<b>Figura 25.</b> Comparação dos dados adquiridos por meio do WT GeneArray em células THP1, U937 e GM12878.....	83
<b>Figura 26.</b> Análise dos dados referente à expressão dos genes do sistema NADPH oxidase em células U937, THP1 e GM12878.....	84
<b>Figura 27.</b> Análise dos genes relacionados ao processo de splicing induzidos pelo IFN $\gamma$ em células U937, THP1 e GM12878.....	84
<b>Figura 28.</b> Análise funcional da rede de interações dos genes que se demonstraram induzidos pelo IFN $\gamma$ em células U937, THP1 e GM12878 e que são relacionados ao processo de <i>splicing</i> .....	85
<b>Figura 29.</b> Análise da expressão gênica do sistema NADPH-oxidase por Real-Time PCR em células U937, THP1 e GM12878.....	86
<b>Figura 30.</b> Análise da expressão gênica dos genes <i>CXCL10</i> , <i>IRF1</i> e <i>IFI44L</i> por Real-Time PCR em células U937, THP1 e GM12878.....	87
<b>Figura 31.</b> Expressão das moléculas CD11b e 7/4 em neutrófilos selecionados negativamente provenientes da medula óssea e da cavidade peritoneal.....	93
<b>Figura 32.</b> Análise de RNA-seq para os transcritos dos genes do sistema NADPH oxidase em neutrófilos selecionados negativamente provenientes da medula óssea de camundongos C57/BL6 tratados <i>in vitro</i> com LPS e IFN- $\gamma$ .....	940

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Pacientes com mutações no gene <i>CYBB</i> que foram avaliados neste estudo...	33
<b>Tabela 2:</b> Lista de <i>primers</i> usados na reação de qPCR em tempo real.....	39
<b>Tabela 3:</b> Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$ em células B-EBV.....	49
<b>Tabela 4:</b> Lista de <i>primers</i> usados na reação de qPCR em tempo real.....	71
<b>Tabela 5:</b> Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$ em células THP1.....	74
<b>Tabela 6:</b> Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$ em células U937.....	76
<b>Tabela 7:</b> Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$ em células GM12878.....	77

## LISTA DE SÍMBOLOS

DGC - Doença Granulomatosa Crônica  
cit b<sub>558</sub> - Citocromo b<sub>558</sub>  
IFN- $\gamma$  - Interferon-gama  
JAK1 - Janus Kinases 1  
JAK2 - Janus Kinases 2  
STAT1 - *Signal transducer and activator of transcription 1*  
GAS - *Gamma-activated sequence*  
Ser727 - Serina 727  
PKC-delta - *Protein kinase C delta*  
CaMK II - *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*  
PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*  
AKT - *v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog*  
c-Cbl - sequência transformadora ecotrópica retroviral  
PDPK1 - *3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1*  
CrkL - *v-CRK avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like*  
C3G - *Rap guanine nucleotide exchange factor 1*  
PLC-gamma 2 - *Phospholipase C gamma 2*  
DAG - Diacilglicerol  
c-Src - *tyrosine-protein kinase SRC-1*  
AFAP - *Actin filament associated protein*  
ICAM-1 - *Intercellular adhesion molecule 1*  
SMAD7 - *SMAD family member 7*  
IRF1 - *Interferon regulatory factor 1*  
c-Myc - *v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*  
p21 - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*  
SOCS-1 - *Suppressor of cytokine signaling-1*  
CBP - *CREB-binding proteins*  
MCM5 - *Minichromosome maintenance protein 5*  
BRCA1 - *Breast cancer susceptibility gene 1*  
Pyk2(FAK2) - *PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta*  
MEKK4 - *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*  
MEK6 - *Mitogen-activated protein kinase kinase 6*

ATF-2 - *Activating transcription factor 2*  
SHP-2 - *Protein-tyrosine phosphatase 2C*  
MEKK1 - *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*  
MEK1 - *Mitogen-activated protein kinase kinase 1*  
ERK1/2 - *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 e 3*  
C/EBP-beta - *CCAAT/enhancer binding protein beta*  
IRF9 - *Interferon regulatory factor 9*  
EDA-ID - Displasia ectodérmica anidrótica  
X-DGC - DGC ligado ao X  
snRNPs - pequenas ribonucleoproteínas nucleares  
SAP - *spliceosome-associated proteins*  
B-EBV - Linfócitos B transformados com o vírus Epstein-barr  
PMN - Células polimorfonucleares  
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico  
SOD - Superóxido dismutase  
WT GeneArray - *Whole Transcriptome Microarray*  
DABG - *Detection Above Background*  
FAN - Fatores Anti-nucleares  
IFI - Imunoflorescência Indireta  
WB - *Western Blot*  
RRM - *RNA Recognition Motif*  
RNP - proteínas ribonucleares  
SFRS2 - *splicing factor arginine/serine-rich 2*  
ncRNA - regiões não codantes de RNA  
SR - domínio rico em serina/arginina  
MO - Medula óssea  
P -cavidade peritoeal  
ip - intraperitoneal  
tRNAs - RNAs transferidores  
rRNAs - RNAs ribossomais  
snRNAs - pequenos RNAs nucleares (*Small nucleolar RNAs*)  
miRNAs - microRNAs  
siRNA - RNAs de Interferência Curtos (*Small interfering RNA*)  
snRNAs - Pequenos RNAs nucleares (*Small nuclear RNAs*)

*exRNAs - Extracellular RNA*

*piRNAs - Piwi-interacting RNA*

*RNA-Seq - high throughput RNA sequencing*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Doença Granulomatosa Crônica (DGC)</b> .....	19
<b>1.2 Interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>) e Doença Granulomatosa Crônica (DGC)</b> .....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	29
<b>4 OBJETIVO GERAL</b> .....	30
<b>5 CAPÍTULO 1 – Efeito do IFN-<math>\gamma</math> em células B-EBV de pacientes com DGC ligada ao X secundária a defeitos de splicing e indivíduos saudáveis</b> .....	31
<b>5.1 Objetivos Gerais</b> .....	31
<b>5.2 Objetivos Específicos</b> .....	31
<b>5.3 Casuística e Métodos</b> .....	32
5.3.1 <i>Pacientes</i> .....	32
5.3.2 <i>Cultura de linfócitos B imortalizados com EBV</i> .....	33
5.3.3 <i>Tratamento com IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math> in vitro</i> .....	33
5.3.4 <i>Dosagem de Superóxido por Redução do Citocromo C</i> .....	34
5.3.5 <i>Obtenção de RNA</i> .....	34
5.3.6 <i>Whole Transcriptome Microarray (WT GeneArray)</i> .....	36
5.3.7 <i>Análise do WT GeneArray</i> .....	36
5.3.8 <i>Validação dos resultados de WT GeneArray por Real Time PCR</i> .....	38
5.3.9 <i>Visualização das proteínas do spliceossomo por Imunofluorescência Indireta</i> .....	40
<b>5.4 Resultados</b> .....	43
5.4.1 <i>Dosagem de Superóxido por Redução do Citocromo C</i> .....	43
5.4.2 <i>Análise do WT microarray</i> .....	46
5.4.3 <i>Validação dos resultados de Microarrays</i> .....	56
5.4.4 <i>Visualização das proteínas do spliceossomo por Imunofluorescência Indireta</i> .....	58
<b>5.5 Resumo dos resultados desta etapa</b> .....	63
<b>6 CAPÍTULO 2 – Análise em células THP1, U937 e GM12878</b> .....	65
<b>6.1 Objetivos Gerais</b> .....	65
<b>6.2 Objetivos Específicos</b> .....	65
<b>6.3 Materiais e Métodos</b> .....	66
6.3.1 <i>Cultura de células</i> .....	66
6.3.2 <i>Tratamento com IFN-<math>\gamma</math> in vitro</i> .....	66
6.3.3 <i>Obtenção de RNA</i> .....	66
6.3.4 <i>Whole Transcriptome Microarray (WT GeneArray)</i> .....	68
6.3.5 <i>Análise do WT GeneArray</i> .....	69
6.3.6 <i>Validação dos resultados de WT GeneArray por Real Time PCR</i> .....	70
<b>6.4 Resultados</b> .....	72
6.4.1 <i>Análise do WT microarray</i> .....	72
6.4.2 <i>Validação dos resultados de microarrays</i> .....	85
<b>6.5 Sumário dos resultados</b> .....	88
<b>7 CAPÍTULO 3 – Análise em células Murinas</b> .....	89

<b>7.1 Objetivos Gerais</b> .....	89
<b>7.2 Objetivos Específicos</b> .....	89
<b>7.3 Materiais e Métodos</b> .....	90
7.3.1 <i>Ativação de Neutrófilos Murinos com IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math> produzidos fisiologicamente</i> .....	90
7.3.2 <i>RNA-Seq</i> .....	91
<b>7.4 Resultados</b> .....	92
7.4.1 <i>Ativação Fisiológica de Neutrófilos Murinos com IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math></i> .....	92
7.4.2 <i>RNA-Seq</i> .....	94
<b>7.5 Súmula dos resultados</b> .....	95
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	96
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	106
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107
<b>ANEXOS</b> .....	117
ANEXO A.....	118
ANEXO B.....	119
ANEXO C.....	120

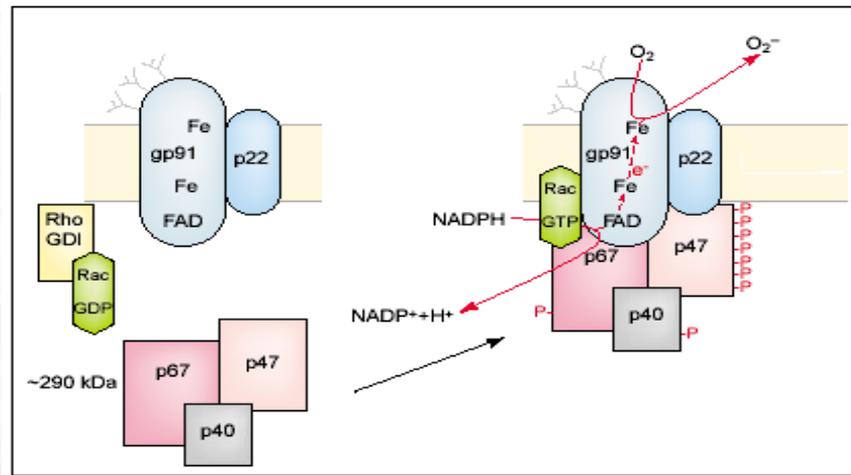
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença Granulomatosa Crônica (DGC)

A doença granulomatosa crônica (DGC), (OMIM # 306400, 233690, 233700, 233710, 608203) é uma imunodeficiência congênita caracterizada pela ocorrência precoce de infecções graves e recorrentes que afetam inicialmente as barreiras naturais do organismo, como os pulmões, nódulos linfáticos, pele e, eventualmente, órgãos como o fígado, baço, ossos e cérebro. A ocorrência de abscesso hepático é uma característica da DGC. A incidência estimada desta doença é 1/250.000 nascidos vivos por ano (1).

As infecções são geralmente causadas por bactérias catalase negativas, como *Staphylococcus aureus* e bacilos gram-negativos, e espécies de fungos, tais como *Aspergillus* e *Candida* (1). Outros patógenos incluem *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Nocardia*, e *Serratia marcescens* invasivos. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, a vacina BCG causa efeitos adversos em até 20% dos pacientes com DGC (2).

O mecanismo imunopatológico da DGC é uma atividade microbicida defeituosa nos fagócitos, associada a uma falha da NADPH-oxidase de fagócitos ao produzir radicais livres derivados do oxigênio. Os defeitos moleculares que causam a DGC decorrem da ausência ou baixa expressão de um ou mais componentes do sistema NADPH-oxidase, levando a uma falha na explosão respiratória de fagócitos (1). A forma ligada ao X da doença é a mais frequente (aproximadamente 60%) e causada por defeitos na gp91-*phox* (proteína codificada pelo gene *CYBB*) (1). As formas autossômicas recessivas são causadas por defeitos em um dos componentes citosólicos da NADPH-oxidase: p47-*phox* (associado a aproximadamente 30% dos casos e codificado pelo gene *NCF1*), p67-*phox*, p22-*phox*, ou p40-*phox* (codificados pelos genes *NCF2*, *CYBA* e *NCF4* respectivamente; respondem em conjunto por 10% dos casos) (1). A p22-*phox* e gp91-*phox*, são os componentes de membrana e se associam formando o citocromo *b*<sub>558</sub> (cit b<sub>558</sub>) (3). Além destes, existem dois casos relatados de deficiência de RAC2 associada a uma explosão respiratória defeituosa e deficiência de adesão de leucócitos (4). Uma figura esquemática do sistema NADPH-oxidase é apresentada abaixo (**Figura 1**).



**Figura 1:** Sistema NADPH-oxidase. As duas subunidades de membrana, gp91-*phox* e p22-*phox*, formam o citocromo  $b_{558}$ . No citosol, após estímulo do sistema, as proteínas p40-*phox*, p47-*phox* e p67-*phox* formam um complexo que sofre alterações conformacionais e translocam-se até a membrana, ligando-se ao citocromo  $b_{558}$ . É no interior da gp91-*phox* que ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio molecular.

A classificação atual da DGC foi proposta de acordo com o defeito molecular específico (5). O padrão de herança é definido por "A" para autossômica ou "X" para ligados ao X, enquanto o componente defeituoso é representado pelo peso molecular da proteína, "91", "22", "47", "67", ou "40", e o nível de expressão de proteína é designado como "0" para ausente, "+" para o presente, e "-" para reduzido. O fenótipo X91<sup>0</sup> é o mais frequente, resultado da ausência de expressão da gp91-*phox* e ausência de explosão respiratória. O fenótipo X91<sup>-</sup> é menos frequente e designa a forma variante leve da DGC. O fenótipo X91<sup>+</sup> possui níveis normais de gp91-*phox*, no entanto, a explosão respiratória é reduzida ou ausente. A maioria das formas autossômicas recessivas da DGC não apresenta expressão residual do componente defeituoso (fenótipos A22<sup>0</sup>, A47<sup>0</sup>, A67<sup>0</sup>). Dentre os defeitos genéticos encontrados em pacientes com DGC, existem deleções, inserções ou substituições. A diversidade dessas mutações e os vários genes afetados explicam a heterogeneidade clínica e genética encontrados na DGC (5, 6). Mutações próximas aos sítios de *splicing* que levam à DGC, por interferir com o processamento do RNA mensageiro, foram documentadas em 39 de 251 casos estudados (5, 7-9) A maioria das mutações que ocorrem em sítios de *splicing* acarretam no fenótipo X91<sup>0</sup> devido a deleção de um ou mais exons, isto é uma característica da maioria das mutações do tipo *splicing* que levam a DGC ligada ao sexo anteriormente documentadas (10). Entretanto, em uma minoria de casos, tais mutações levam ao fenótipo X91<sup>-</sup>, devido à manutenção parcial do *splicing* normal (2, 5).

Mutações no gene *CYBB* são encontradas em cerca de 70% de todos os pacientes com DGC. Publicações mais recentes analisaram 1267 famílias não relacionadas com 1415 pacientes com DGC ligado ao X e identificaram um total de 681 mutações diferentes. Destas 681 mutações, 498 mutações (73,1%) são exclusivas de uma família. Documentaram a deleções (35,6%), inserções (7,9%), deleções/inserções (2,8%), mutações em sítios de *splicing* (17,6%), mutações *missense* (21,3%), mutações *nonsense* (14,1%) e mutações em sítios promotores (0,7%). Além disso, polimorfismos aparentemente benignos no *CYBB* também se encontram descritos (6).

O manejo de pacientes com DGC inclui o uso de antibióticos profiláticos, antifúngicos e IFN- $\gamma$ , juntamente com o tratamento prolongado e agressivo de infecções (1, 7, 11). O uso de IFN- $\gamma$  na dose de 50mcg/m<sup>2</sup> dado 3 vezes na semana é bem tolerado e reduz em 70% a ocorrência de infecções graves de acordo com o The International CGD Cooperative Study Group (12), sendo esta observação corroborada por outros estudos (13-15). O transplante de medula óssea e terapia gênica oferece cura em potencial para DGC, embora com risco e toxicidade considerável (16).

## **1.2 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e Doença Granulomatosa Crônica (DGC)**

As citocinas regulam a proliferação e diferenciação de linfócitos na fase de ativação da resposta imune adaptativa e medeia a ativação de células efetoras especializadas na fase final da imunidade adaptativa. No entanto, elas são também importantes em vários processos mediados pela resposta imune inata. Dentre as várias citocinas, o IFN- $\gamma$  produzido por células T CD4<sup>+</sup> e células NK, ativa macrófagos, promove a diferenciação de células Th1 e inibe a proliferação de células Th2. O IFN- $\gamma$  estimula a atividade microbicida dos fagócitos, a síntese de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, e a produção de opsoninas e anticorpos IgG fixadores de complemento (17). O IFN- $\gamma$  exerce seus efeitos a nível celular ao interagir com receptores específicos para o IFN- $\gamma$  (composto por duas subunidades, IFNGR1 e IFNGR2). A ligação do IFN- $\gamma$  ao seu receptor induz sua oligomerização e ativação, via transfosforilação, do receptor-associado à Janus Kinases 1 e 2 (JAK1 e JAK2). A ativação das JAKs fosforilam o domínio intracelular do receptor (como exemplo, tirosina 440 do IFNGR1 humano) que serve como sítio de ligação para o *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1). O STAT1 é fosforilado na tirosina 701, sofre dimerização, transloca para o núcleo e regula a expressão gênica por meio da ligação aos elementos *Gamma-*

*activated sequence* (GAS) nos promotores dos genes regulados pelo IFN- $\gamma$  (18). Algumas quinases podem fosforilar o STAT1 na Serina 727 (Ser727). Essa fosforilação não é requerida para a translocação do STAT1 para o núcleo ou para sua ligação aos promotores. No entanto, é essencial para a ativação transcricional completa. Estas quinases incluem *Protein kinase C delta* (PKC-delta) e *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMK II) (19, 20). O IFN- $\gamma$  ativa a via de sinalização do *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)/*v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT), possivelmente por meio do adaptador Cas-Br-M, sequência transformadora ecotrópica retroviral (c-Cbl) que se liga a subunidade reguladora do PI3K (PI3K reg class 1A). PKC-delta é uma molécula efetora da via do PI3K (21). Embora o mecanismo de ativação do PKC-delta dependente do PI3K ainda não tenha sido esclarecido, a fosforilação do PKC-delta dependente do PI3K pelo *3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDPK1) já foi descrito (22).

O IFN- $\gamma$  também induz ativação do *v-CRK avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like* (CrkL) mediado pelo c-Cbl, o que propicia uma ligação entre o receptor de IFN- $\gamma$  e *Rap guanine nucleotide exchange factor 1* (C3G) e resulta na ativação do RAPIA (membro da família do oncogene RAS, Rap1A), uma proteína conhecida por suprimir tumor e mediar respostas inibitórias de crescimento de forma dependente do IFN- $\gamma$  (23).

IFN- $\gamma$  também induz a fosforilação de *Phospholipase C gamma 2* (PLC-gamma 2) por JAK1/2. Diacilglicerol (DAG) é o produto da atividade enzimática de *PLC-gamma 2* que pode ativar algumas das isoformas da protein kinase C, incluindo PKC-alpha. O PKC-alpha pode estimular a atividade da *tyrosine-protein kinase SRC-1* (c-Src). Apesar de PKC-alpha fosforilar o c-Src de forma direta, *Actin filament associated protein* (AFAP) é essencial para esta ativação do c-Src (24). c-Src por sua vez ativa STAT1 pela fosforilação na tirosina 701. Esta indução da via PLC-gamma 2/PKC-alpha/c-Src/STAT1 pelo IFN- $\gamma$  causa a expressão do gene do *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) (25).

Há vários alvos conhecidos do STAT1 na sinalização mediada pelo IFN- $\gamma$  como o *SMAD family member 7* (SMAD7), *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) e proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, como por exemplo, *v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc) e *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (p21) (26, 27). IRF1 participa na ativação do *Suppressor of cytokine signaling-1* (SOCS-1). A proteína SOCS-1 é crítico para a inibição de respostas do IFN- $\gamma$  (28). O IFN- $\gamma$  induz a expressão de SOCS1 indiretamente, pela indução da expressão do fator de transcrição IRF-1 via STAT1. IRF-1 por sua vez estimula a transcrição do gene SOCS-1 (29).

Várias proteínas interagem com STAT1 e modulam sua atividade transcricional: *CREB-binding proteins* (CBP e p300), *Minichromosome maintenance protein 5* (MCM5) e *Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1). CBP e p300 possuem atividade histona acetil transferase e funcionam como co-activators. MCM5 e BRCA1 se associam com STAT1 fosforilado e aumentam sua atividade transcricional (18).

Adicionalmente, IFN- $\gamma$  pode ativar a via independente de JAK-STAT. A tirosina quinase dependente de calcio, *PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta* (Pyk2(FAK2)) é substrato para JAK2. Pyk2(FAK2) fosforila *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4* (MEKK4). MEKK4 fosforilada por sua vez fosforila *Mitogen-activated protein kinase kinase 6* (MEK6). Subsequentemente, MEK6 fosforila p38 MAPK que fosforila e ativa *Activating transcription factor 2* (ATF-2). A *Protein-tyrosine phosphatase 2C* (SHP-2) regula esta via de sinalização através da defosforilação do MEKK4 e de sua quinase ativadora, Pyk2(FAK2) (30).

Outra via estimulado pelo IFN- $\gamma$  envolve o *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1* (MEKK1), *Mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MEK1) e *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 e 3* (ERK1/2). A cascata MEKK1/MEK1/ERK1/2 regula a atividade de *CCAAT/enhancer binding protein beta* (C/EBP-beta) e expressão induzida pelo gene *Interferon regulatory factor 9* (IRF9) pelo C/EBP-beta. IRF9 é a subunidade do complexo transcricional ISGF3 que participa na sinalização do interferon (31). Uma figura esquemática das vias de ativação celular mediado pelo IFN- $\gamma$  é apresentada abaixo (**Figura 2**).

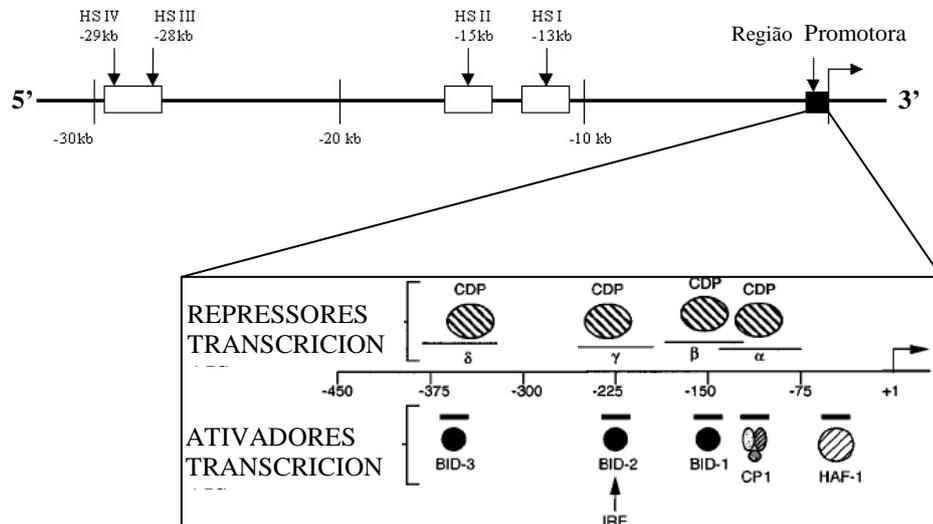


quimiluminescência dependente de luminol e a liberação de peróxido de hidrogênio pelas células EoL-1 (40, 41), o IFN- $\gamma$  induz a expressão gênica do *CYBB*, coincidindo com a diferenciação monócítica de progenitores (42) e incrementa sua transcrição em monócitos maduros *ex vivo* (43).

Dois mecanismos de regulação positivos têm sido propostos para explicar a transcrição do *CYBB* induzida por IFN- $\gamma$ . Um mecanismo é a união de BID/YY1 a quatro sítios de uma região de -90 a -355 pb do promotor após dissociação de CDP do gene (44, 45). O outro é a união de um complexo multiprotéico (PU.1/HAF-1) localizado a -53 do promotor (46, 47), embora seja proposta a formação de um grande complexo composto por STAT-1 $\alpha$ , IRF-1, PU.1, ICSBP e CBP no promotor proximal do *CYBB* após a estimulação com IFN- $\gamma$  (48). A **Figura 3** mostra um esboço de alguns elementos transcripcionais ativadores e repressores que competem pela ligação à região promotora do gene *CYBB*. Anrather et al., (2006) demonstraram que o NF- $\kappa$ B está envolvido na transcrição do gene codificador do componente gp91-*phox* da NADPH-oxidase em modelo experimental murino (49). Estudos realizados em células de pacientes com displasia ectodérmica anidrótica (EDA-ID), uma imunodeficiência humana relacionada a defeitos na ativação do NF- $\kappa$ B, revelaram que a expressão do *CYBB* e atividade do *burst* oxidativo encontram-se diminuídas quando comparados com células de indivíduos saudáveis e apresentam valores similares aos encontrados em pacientes com DGC ligado ao X (X91<sup>0</sup> DGC). Valores similares de expressão do gene *NCF1* foram encontrados entre células S32I EDA-ID e DGC com forma autossômica recessiva (A47<sup>0</sup>). Estes resultados demonstram que o NF- $\kappa$ B é necessário para a expressão gênica do *CYBB* e *NCF1* e ativação da NADPH oxidase de fagócitos (50).

Uma vez que o IFN- $\gamma$  é capaz de induzir a expressão gênica do *CYBB*, isso propiciou em parte, a base para o uso clínico do IFN- $\gamma$  para a prevenção de infecções em pacientes com DGC – The International CGD Cooperative Study Group (12). O IFN- $\gamma$  humano recombinante está indicado na dose de 50  $\mu$ g/m<sup>2</sup> de superfície corporal, por via subcutânea, três vezes por semana. Ele reduz em 70% o risco da ocorrência de infecções graves. Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, atribui-se muito de seus efeitos benéficos à estimulação do sistema NADPH-oxidase, agindo particularmente bem nas formas variantes e autossômicas recessivas de DGC (12, 15, 35, 51). Dados provenientes do nosso grupo demonstram que o IFN- $\gamma$  corrige parcialmente o fenótipo de uma forma variante de DGC ligada ao sexo, ao melhorar a fidelidade do *splicing* no primeiro intron do gene *CYBB* e

aumentar a exportação nuclear de transcritos estáveis deste gene para o citoplasma (13), fato corroborado por outros estudos de outros grupos de pesquisa (52, 53).



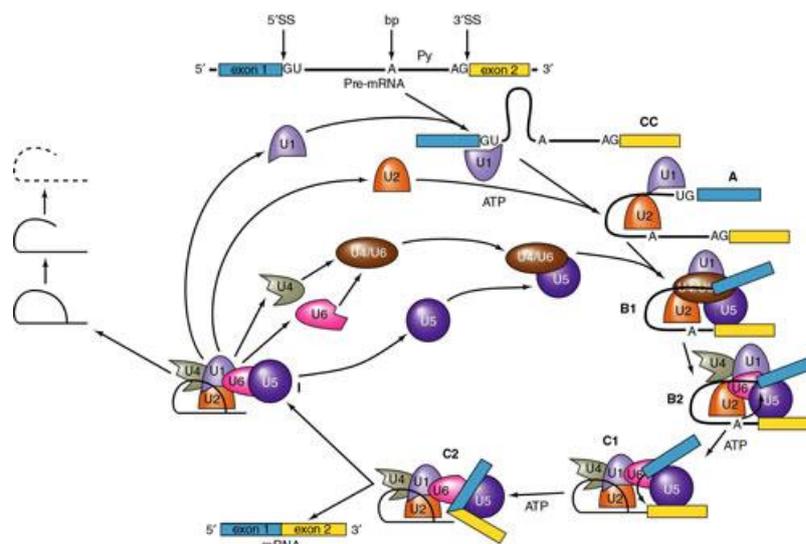
**Figura 3.** Região promotora do gene *CYBB*. Os repressores transcricionais (CDP) competem com fatores ativadores de transcrição por quatro sítios de ligação dentro da região promotora do gene codificador do componente gp91 *phox* da NADPH-oxidase. +1 indica o sítio transcrição inicial. Linhas acima de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , indicam posições de cada um dos quatro oligonucleotídeos utilizados como sítios de ligação para CDP. Barras acima dos fatores de ativação transcricional denotam correspondência à DNase I

**FONTE:** Adaptado de: (44).

Em nosso laboratório, investigamos o efeito do IFN- $\gamma$  num grupo de pacientes com defeitos de *splicing* no gene *CYBB*, sendo esses casos aparentemente os que mais se beneficiam desta citocina. Demonstramos que o IFN- $\gamma$  promove aumento da expressão de transcritos totais do gene *CYBB* e aumento na marcação de fatores anti-núcleo (Fapesp 06/51005-9), demonstrando que o IFN- $\gamma$  pode estar envolvido na ativação do complexo spliceossoma e dessa forma auxiliando na correção do fenótipo visto em estudos anteriores (13, 52, 53).

Após o processo de transcrição, os precursores de mRNA de células eucarióticas contêm exons codificadores de proteínas e introns não-codificantes. No *splicing*, processo que ocorre posterior à transcrição, os introns são excisados e os exons unidos por um complexo macromolecular chamado spliceossoma. O spliceossoma é um macro-complexo que compreende centenas de proteínas com várias interações funcionais. Uma figura esquemática do processo de *splicing* encontra-se representada na **Figura 4**. O spliceossoma padrão é

constituído por cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs): U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs, e várias proteínas spliceossomais associadas (spliceosome-associated proteins, SAP). Spliceossomas não são um complexo estável simples, mas uma família dinâmica de partículas que se reúnem no mRNA precursor para dobrá-lo numa conformação que permita a transesterificação. Várias formas de spliceossoma (por exemplo, Complexos A-, B-e C-) têm sido identificadas. O processo de formação do spliceossoma pertence a um processo chave que possibilita o *splicing* de mRNA e a modulação de *splicing* alternativos. Uma lista detalhada de fatores envolvidos em reações spliceossomais foi construída ao longo dos anos, porém suas interações funcionais são ainda pouco exploradas e conhecidas. É uma tarefa desafiadora a montagem de um modelo biológico e computacional para a realização de um estudo da dinâmica do *splicing* que integre conhecimento multidisciplinar. O nosso modelo de estudo visa analisar a dinâmica do *splicing* nos leucócitos de um grupo de pacientes com DCG secundária a defeitos de *splicing* que reconhecidamente se beneficiam da terapia de IFN- $\gamma$  para o restabelecimento pelo menos parcial, da atividade do sistema NADPH-oxidase. Buscamos no presente estudo elucidar alguns questionamentos sobre o mecanismo de *splicing* que corrige transcritos truncados do *CYBB* e definir perfis de expressão gênica que se encontram modificados quando se estimula os leucócitos com IFN- $\gamma$ .



**Figura 4.** A formação do Spliceossoma e a representação do *Splicing*. A remoção dos introns exige um complexo formado por um complexo ribonucleoprotéico, chamado spliceossomo. Esse complexo reconhece o início e fim dos íntrons, depois os unem, formando uma alça que então é cortada.

**FONTE:** <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/mike/spring2003/spliceosome.jpg>

## 2 JUSTIFICATIVA

A DGC é um modelo natural e hereditário de disfunção de mecanismos de defesa do hospedeiro devido a defeitos na atividade da NADPH-oxidase. Este sistema gera metabólitos tóxicos do oxigênio, envolvidos na atividade microbicida. O sistema NADPH-oxidase das células fagocíticas desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra patógenos; mas por outro lado, contribui para o dano tecidual durante os processos inflamatórios crônicos e enfermidades autoimunes. Portanto, a análise dos mecanismos moleculares que regulam a expressão e função deste sistema é de grande importância para a compreensão da fisiologia das células fagocíticas e de sua atividade microbicida.

Mutações próximas aos sítios de *splicing* que interferem no processamento do RNA mensageiro, causando a deleção de um ou mais exons, são relativamente frequentes em casos de DGC.

O uso de IFN- $\gamma$  é conhecido na terapia de pacientes com DGC por estimular a NADPH-oxidase. Estudos anteriores documentam um efeito benéfico do IFN- $\gamma$  por parcialmente corrigir, a produção defeituosa de ânion superóxido em alguns casos e por alterar o processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos do *CYBB* (13, 33, 52, 53). Sendo assim, visamos através do presente estudo esclarecer alguns aspectos sobre o mecanismo pelo qual o IFN- $\gamma$  atua sobre a transcrição e processamento da mensagem do gene *CYBB*.

Em nossa Dissertação de mestrado “*Efeito do Interferon-gama Sobre Defeitos de “Splicing” que Levam à Doença Granulomatosa Crônica Ligada ao Cromossomo X*” (Fapesp 06/51005-9), verificamos que o IFN- $\gamma$  aumenta a liberação de superóxido por células polimorfonucleares e a expressão de *CYBB* em células de indivíduos saudáveis e pacientes, ocasionada por defeitos de *splicing*. Desta forma, os resultados observados até o presente momento reforçam a importância do uso do IFN- $\gamma$  em pacientes com DGC que apresentam defeitos específicos de *splicing*. Contudo, apesar da intensa investigação clínica, bioquímica e molecular, os mecanismos pelos quais o IFN- $\gamma$  contribui para o benefício clínico de pacientes com DGC ligada ao X, processamento da mensagem e estabilidade dos transcritos do *CYBB*, não se encontram totalmente esclarecidos,, objetivo do presente estudo.

### 3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  estimulam, via transdução de sinais, a ativação da transcrição de genes responsáveis pela indução do *burst* oxidativo, causando um aumento na expressão de proteínas vinculadas ao sistema NADPH oxidase em pacientes que apresentam DGC ocasionada por defeitos de “*splicing*”, devido a mecanismos reguladores que são ativados por estas citocinas.

Acreditamos que o mecanismo pelo qual o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  aumentam a expressão de proteínas do sistema NADPH oxidase nesse grupo específico de pacientes com DGC, envolve a participação das proteínas que compõem o complexo do *spliceossoma*, e este envolvimento durante o *splicing* ocorre de forma diferenciada, havendo a indução de apenas algumas proteínas deste complexo.

#### **4 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral desta tese é investigar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos transcricionais relativos ao processo de *splicing* e à regulação do gene *CYBB*. Para isso utilizamos três modelos experimentais: 1) Linfócitos B transformadas com o vírus Epstein-Barr (células B-EBV) de pacientes com DGC e controles saudáveis; 2) Células de linhagem THP1, U937 e GM12878; 3) Leucócitos murinos. Trataremos dos três modelos experimentais separadamente em forma de capítulos dentro desta tese de doutorado.

## 5 CAPÍTULO 1 – Efeito do IFN- $\gamma$ em células B-EBV de pacientes com DGC ligada ao X secundária a defeitos de *splicing* e indivíduos saudáveis

### 5.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desta primeira etapa deste estudo é investigar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos pós-transcricionais relativos à expressão e regulação do gene *CYBB* em linfócitos B transformados com o vírus Epstein-barr (B-EBV) de pacientes X-DGC secundária a defeitos de *splicing* e indivíduos saudáveis.

### 5.2 Objetivos Específicos

Na presente etapa deste estudo avaliamos se o IFN- $\gamma$ :

1. Interfere no processamento da mensagem do RNAm de transcritos dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*);
2. Induz a ativação celular causando um aumento da expressão e de genes e proteínas envolvidas no processo do *splicing*, ativando dessa maneira o spliceossoma;
3. Causa modificações na expressão de genes relacionados a transcrição, ao processo de *splicing*, a fatores de transcrição, e genes relacionados à via do TNF- $\alpha$ ;

## 5.3 Casuística e Métodos

### 5.3.1 Pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram diagnosticados de acordo com normas estabelecidas pela IUIS (54), com histórico de infecções de repetição, sugestivas de defeito fagocítico. Todos os pacientes incluídos no presente estudo já apresentam diagnóstico molecular confirmado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa.

Nesta etapa, avaliamos em nossos ensaios linhagens celulares de linfócitos B imortalizados com o vírus Epstein-Barr (B-EBV) de pacientes com DGC ligada ao X ocasionados por defeitos de *splicing* e de indivíduos sadios como controles mantidos em nosso laboratório. Na tabela seguinte (Tabela 1) apresentamos os pacientes e suas respectivas mutações (5, 13, 55-59). Incluímos também pacientes com outros tipos de mutações para análise comparativa.

Os pacientes menores de idade estiveram sempre acompanhados de pais ou responsáveis no momento da coleta e em todos os procedimentos clínicos e laboratoriais. A retirada de sangue ocorreu após o preenchimento do consentimento informativo por escrito, sempre em pacientes sem infecções. Na admissão os pacientes com DGC responderam a um questionário padrão onde constam os antecedentes pessoais, enfocando principalmente processos infecciosos, doenças atópicas, doenças autoimunes, neoplasias e antecedentes familiares.

Todos os procedimentos aqui descritos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo de acordo com a regulamentação da convenção de Helsinki para pesquisa em seres humanos e do Conselho Nacional de Saúde.

**Tabela 1:** Pacientes com mutações no gene *CYBB* que foram avaliados neste estudo.

Paciente	Tipo de Mutação	Posição	Mudança de Nucleotídeo	Produto	Referência
PR	<i>Nonsense</i>	Exon 1	c. 95 G>A	Sítio de Término – W28X	(13)
MFB	<i>Nonsense</i>	Exon 3	c. 229 C>T	Sítio de Término – R73X	(13)
RJ	<i>Splicing</i>	Intron 1	c 56+6 T>C	Instabilidade RNAm	(5, 13)
RS	<i>Splicing</i>	Exon 3	c.264 G>A	Deleção do Exon 3	(57)
GG	<i>Splicing</i>	Exon 3	c.264 G>A	Deleção do Exon 3	(56)
VG	<i>Splicing</i>	Intron 9	c.1164 – 2 A>G	Deleção do Exon 10	(58)
IC	<i>Splicing</i>	Intron 10	c.1326 + 1 G>A	Deleção do Exon 10	(55)
RQ	<i>Nonsense</i>	Exon 11	G1341A	Trp 443 stop	(5)
IH	<i>Frameshift</i>	Exon 3	G251del	Stop-codon no exon 4	(5)

### 5.3.2 Cultura de linfócitos B imortalizados com EBV

Os linfócitos B-EBV foram cultivados em garrafas plásticas de 50 ml (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) contendo meio de cultura RPMI-1640 completo, numa densidade de  $0,5-1,0 \times 10^6$  células/ml a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi monitorizada 3 vezes por semana e a cultura mantida durante os estudos. Alíquotas das linhagens celulares foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, caso estudos adicionais precisem ser realizados. Quando necessário, células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram cultivadas de maneira similar.

### 5.3.3 Tratamento com IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ *in vitro*

Linfócitos B-EBV ou células PBMC separadas por gradiente de centrifugação foram cultivados com IFN- $\gamma$  (100 U/ml, R&D Systems), e/ou com TNF- $\alpha$  (1000 U/ml, R&D Systems) em placas estéreis de 06 poços ou garrafas estéreis de 25 cm<sup>3</sup> durante 48 horas, e as células PMN por apenas uma hora (1000 U/ml, R&D Systems), e/ou com TNF- $\alpha$  (1000 U/ml, R&D Systems). Após o término do tempo de incubação, as células foram recuperadas através da utilização de PBS gelado, sendo as células recuperadas após centrifugação a 250 g durante

5 minutos a 4°C. A seguir as células foram ressuspensas em concentração e solução adequada de acordo com cada experimento.

O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  foram escolhidos por serem importantes indutores dos genes que codificam componentes do sistema NADPH oxidase (13, 42, 43, 51, 52, 56, 60, 61) além de o IFN- $\gamma$  ser utilizado na terapia de pacientes com DGC - Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group (12) e o TNF- $\alpha$  ser considerado uma citocina agonista do IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, linfócitos B e monócitos têm receptores e mecanismos de transdução bem caracterizados para esta citocina (62).

#### 5.3.4 Dosagem de Superóxido por Redução do Citocromo C

A dosagem de superóxido liberado pelos neutrófilos, células mononucleares e linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis, pacientes DGC com defeito de *splicing* e pacientes DGC ocasionados por mutações do tipo *nonsense*, foi utilizada de acordo com a metodologia diagnóstica usada em pacientes com suspeita de DGC, conforme procedimento previamente publicado e modificado por Condino-Neto e colaboradores (33, 63-65).

As suspensões de células foram ressuspensas a uma concentração final de  $2 \times 10^6$  células/ml, e incubadas com PMA (30 nM) na presença de Citocromo C (80  $\mu$ M), durante 60 minutos a 37 °C. A reação com liberação espontânea foi avaliada utilizando solução de Hank's na ausência de PMA. Metade dos tubos, estimulados e espontâneos, continham superóxido dismutase (SOD, 90 U/ml) no início do experimento, como controle da redução inespecífica do Citocromo C. Depois do tempo de incubação, a reação foi interrompida. Todos os tubos foram em seguida postos em banho de gelo e foi adicionado SOD aos tubos em que o SOD não havia sido adicionado previamente no ensaio. Os tubos então foram centrifugados a 2200 g durante 15 minutos a 4°C, e a absorbância dos sobrenadantes foi avaliada em comprimento de onda de 550 nm. A produção de ânion superóxido foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de  $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os resultados expressos em  $\mu\text{mols}/10^6/\text{hora}$ . Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 5.3.5 Obtenção de RNA

As células de cultura cultivadas em garrafas de poliestireno (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) foram submetidas à extração do RNA total pelo método recomendado pelo

fabricante do reagente TRIZOL (GIBCO BRL) para os ensaios de *Real-Time PCR*; ou submetidas um fracionamento em RNAm e microRNA conforme recomendado pelo fabricante do reagente RNazol® RT (Molecular Research Center, Inc.) para os ensaios de *WT GeneArray*. Ambos os processos encontram-se descritos de forma mais detalhada abaixo.

Em seguida as amostras foram quantificadas por espectroscopia em comprimento de onda de 260 e 280 nm, e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até seu uso para conversão em cDNA. Os valores da absorbância obtidos foram convertidos em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  através da fórmula: absorbância (260 nm) x diluição x 0,04 = concentração de RNA.

Extração do RNA Total: Cerca de  $1,0 \times 10^7$  células foram ressuspensas em 1 mL de Trizol e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção de RNA total. Posteriormente foram adicionados a cada tubo 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi transferida a um novo tubo e 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 45 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA ressuspenso em 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O etanol foi retirado cuidadosamente e o RNA diluído em 30  $\mu\text{L}$  de água livre de DNases e RNases. Depois de incubação durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  a leitura da concentração do RNA foi feita por espectrofotometria numa diluição de 1:50 a  $\lambda = 260\text{ nm}$ .

Extração de RNA/Fracionamento em RNAm e microRNA: O RNazol RT separa o RNA de outras moléculas baseada na interação do fenol e guanidina com componentes celulares. Uma quantidade de  $1,0 \times 10^7$  células foi homogenizada e lisada em 1 mL de RNazol RT e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção do lisado celular e em sequência suplementado com 0,4 ml de água. A mistura foi agitada de forma manual por 15 segundos e incubadas por 15 minutos. A adição de água induz a precipitação do DNA, proteínas e polisacarídeos enquanto o RNA se mantém solúvel no homogenizado. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação o DNA, proteínas e a maioria dos polisacarídeos formam um pellet semissólido no fundo do tubo e o RNA se mantém solúvel no sobrenadante. Um total de 1 ml do sobrenadante (75% do total do volume do sobrenadante) foi transferido para um novo tubo,

deixando uma camada de sobrenadante acima do pellet de DNA/proteína. O RNA foi precipitado misturando 1 ml do sobrenadante transferido com 0,4 ml de etanol 75% (v/v). As amostras foram incubadas por 10 minutos e centrifugadas a 12000 g por 8 minutos à 4 °C. O precipitado de RNA forma um pellet branco no fundo do tubo. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e estocado a 4 °C para o isolamento de pequenos-RNAs. Foram utilizados 0,4 ml de 75% etanol para precipitar as moléculas de RNA maiores que 200 bases. Os pellets de RNA foram lavados duas vezes com 0,4 ml de etanol 75% (v/v) seguido de centrifugação a 8000 g por 3 minutos a 4 °C. Entre as lavagens o etanol 75% foi removido com o uso de micropipeta e após a última lavagem o etanol residual foi removido e o pellet de RNA foi dissolvido em água DEPC livre de RNase, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, e seguido por sucessivas pipetagens para dissolver o pellet. O RNA isolado consiste de moléculas de RNA >200 bases. Esta fração de RNA constitui 80 à 85% do RNA celular e contém RNA ribossomal e mRNA.

A fração dos pequenos-RNAs foi isolada através da precipitação dos RNAs com um volume de 0,8 ml de isopropanol. As amostras foram incubadas por 30 minutos à 4 °C e posteriormente centrifugadas a 12000 g por 15 min à 4 °C. o precipitado foi lavado 2 vezes com isopropanol 70% (v/v) seguido de centrifugação a 12000 g por 3 minutos a 4 °C. Após a última lavagem, o álcool residual foi removido com micropipeta e o RNA dissolvido em água DEPC livre de RNase. Os pequenos RNAs residuais isolados contém pequenos RNAs ribossomais, RNAt, siRNA e miRNA variando em tamanho de 200 a 10 bases. O fracionamento dos RNAs foi checado por gel de 4-6% em gel de agarose em corrida eletroforética e a quantificação da concentração dos RNAs foi feita por espectrofotometria conforme previamente descrito.

### 5.3.6 *Whole Transcriptome Microarray (WT GeneArray)*

Os ensaios de *Whole Transcriptome (WT) microarrays* foram desenvolvidos durante o período de estágio na University of Massachusetts Medical School sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Edwin Newburger, que integra o projeto como pesquisador colaborador (Anexo A).

Para a análise do padrão de expressão dos mRNAs (com tamanho maior que 200 bases) expressos nas células B-EBV de indivíduos normais e paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing*, tratados e não tratados com IFN- $\gamma$ , que passaram previamente pelo protocolo de fracionamento em RNAm e microRNA, foram utilizados 2 kits complementares seguindo as recomendações dos fabricantes, o WT Expression Kit (Ambion) que prepara as

amostras de RNA para o GeneChip WT Expression Arrays Kit (Affymetrix) para que a análise do transcriptoma expresso nas células fosse realizado. O kit da Ambion gera *sensestrand* cDNA de amostras de RNA total para que o processo de fragmentação e marcação usando o kit da Affymetrix possa ser feito. O kit GeneChip WT Expression (Affymetrix) utiliza um método de transcrição reversa que especificamente utiliza o RNA não ribossomal das amostras, incluindo assim tanto o mRNA poly(A) como o mRNA não poly(A). Após este processo foram realizados a hibridização das amostras nos chips, a leitura dos chips através do GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) e a geração dos arquivos .CEL contendo os valores de intensidade de cada probe contido nos chips através do GeneChip Operating Software v. 1.3.

### 5.3.7 Análise do WT GeneArray

As análises dos dados adquiridos nos ensaios de *Whole Transcriptome* (WT) *microarrays* foram desenvolvidas durante o período de estágio na Universität Zürich sob a supervisão do Dr. Michal Okoniewski, que integra o projeto como pesquisador colaborador (Anexo B).

A análise dos dados obtidos foi realizado utilizando o Expression Console Software (Affymetrix), dChip e Bioconductor. Estimativas de sinal foram obtidas a partir dos arquivos .CEL de todas as amostras por intermédio de normalização quantitativa usando o algoritmo PLIER (*Probe Logarithmic Intensity Error*) para probeset e intensidades Iter-PLIER para o nível de intensidade do gene. Presença/ausência de genes foi determinado por DABG (*Detection Above Background*). Os valores de p ANOVA e *fold changes* para a expressão do gene foi calculado utilizando Bioconductor e o mapeamento da rede bioquímicas/regulatória de genes importantes realizado usando o String Data-base. A análise para a geração de rede de interações, a análise funcional dos dados gerados e a análise da rede de vias ativadas foram gerados através do uso dos aplicativos IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e do MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>), as três análises encontram-se descritos abaixo.

Rede de interações: O conjunto de dados contendo os identificadores do gene e valores de expressão correspondente foram carregados nos programas IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e no MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>). Cada identificador foi mapeado ao seu objeto correspondente no

banco de dados dos programas acima mencionados. Um valor de corte de  $p < 0,05$  foi criado para identificar moléculas cuja expressão foi significativamente expressa diferencialmente. Estas moléculas, chamadas moléculas elegíveis da rede, foram sobrepostas numa rede molecular mundial desenvolvida a partir de informações contidas no banco de dados presente em cada um dos programas. As redes de interações das moléculas elegíveis foram então geradas por algoritmos com base em sua conectividade.

Análise funcional do conjunto de dados: Uma análise funcional foi gerada a partir de funções biológicas que se demonstraram ser mais significativas para o conjunto de dados gerados através do *WT GeneArray*. A rede de moléculas associadas às funções biológicas e/ou doenças no banco de dados do aplicativo foram consideradas na análise. O teste *Right-tailed Fisher* foi usado para calcular o valor de  $p$  (*p-value*) para determinar a probabilidade de que cada função biológica e/ou doença atribuídos a esse conjunto de dados é devido ao acaso.

Análise da rede de vias canônicas ativadas: A análise vias canônicas identificadas foi gerada a partir dos bancos de dados contidos nos programas IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>) que se demonstraram mais significativas dentre o conjunto de dados gerados através do *WT GeneArray*. Moléculas do conjunto de dados que apresentaram valor de expressão acima do valor de corte e que foram associadas com vias canônicas da base de dados de cada um dos programas acima mencionados foram consideradas na análise. O nível de significância da associação entre o conjunto de dados e da via canônica foi medido de duas maneiras: 1) A razão do número de moléculas a partir do conjunto de dados que são mapeados pelo número total de moléculas que pertencem à via canônica. 2) O teste *Fisher* foi usado para calcular um valor de  $p$  para determinar a probabilidade de que a associação entre os genes no conjunto de dados e da via canônica pode ocorrer ao acaso.

### 5.3.8 Validação dos resultados de *WT GeneArray* por Real Time PCR

Durante o ensaio as amostras de RNA total de células B imortalizadas com EBV de controles sadios ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram preparadas através do reagente TRIZOL. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit SuperScript III RT (Invitrogen). Para a reação usou-se 2 µg de RNA total, hexâmeros randômicos e (MMLV-RT). O cDNA foi diluído (1:30) e ampliado por meio de PCR em tempo real, através do sistema SYBR Green Real Time (Applied

Biosystems). O SYBR® Green se une especificamente a DNA de dupla fita e em estado de excitação emite luz. Deste modo, quanto mais um produto é acumulado, maior é a fluorescência. Isto permitiu correlacionar a intensidade de sinal coletado com a quantidade de produto amplificado (66). O gene escolhido para controle interno da reação foi o gene da  $\beta$ -actina (NM 001101). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em triplicata para cada amostra segundo as condições descritas e os primers utilizados em cada gene encontram-se descritos abaixo (Tabela 2)

**Tabela 2.** Lista de *primers* usados na reação de qPCR em tempo real

Gene	Primer	Sequencia (5' - 3')	T.A. (°C)	Produto (pb)
<i>CYBB</i> (gp91 <i>phox</i> )	<i>Foward</i>	TTGTGGAAACCCTCCTATGA	55.73	80
	<i>Reverse</i>	AAAACCGCACCAACCTCTCA	60.11	
<i>CYBA</i> (p22 <i>phox</i> )	<i>Foward</i>	ATGTGGGCCAACGAACAG	57.92	141
	<i>Reverse</i>	GTACTCCAGCAGGCACACAA	60.25	
<i>NCF1</i> (p47 <i>phox</i> )	<i>Foward</i>	CCTCTTCCAGTGCATTTAAGG	57.29	91
	<i>Reverse</i>	GATGTGACGGATGAAGGTGTC	58.73	
<i>NCF2</i> (p67 <i>phox</i> )	<i>Forward</i>	CGGACAAGAAGGACTGGAAG	57.91	117
	<i>Reverse</i>	GGAAGTAAGCCACTGCCAAG	58.83	
<i>NCF4</i> (gp40 <i>phox</i> )	<i>Foward</i>	GGCCGAGAGTGACTTTGAAC	58.85	113
	<i>Reverse</i>	TCACCTCGATGACGAAAACA	57.20	
<i>CXCL10</i>	<i>Foward</i>	GAATCGAAGGCCATCAAGAA	60.16	119
	<i>Reverse</i>	CCTCTGTGTGGTCCATCCTT	59.96	
<i>IRF1</i>	<i>Foward</i>	GGAGGAGCCAGAAATTGACA	60.20	224
	<i>Reverse</i>	TCTCTGCACCATATCCACCA	60.07	
<i>IFI44L</i>	<i>Foward</i>	AACTGGACCCCATGAAGGAT	60.58	126
	<i>Reverse</i>	CAGGGCTGTAACGCTCTCTC	60.16	
<i>ACTB</i>	<i>Foward</i>	TCACCGAGCGCGGCT	61.21	60
	<i>Reverse</i>	TAATGTCACGCACGATTTCCC	59.00	

T.A. Temperatura de anelamento; *pb*, par de base.

### 5.3.9 Visualização das proteínas do spliceossomo por Imunoflorescência Indireta

Para a realização dos ensaios de visualização das proteínas envolvidas no processo do *splicing* utilizamos as técnicas de Fatores Anti-nucleares (FAN) por Imunoflorescência Indireta (IFI) e *Western Blot* (WB), que foram desenvolvidos sob a supervisão do Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade (Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), colaborador dessa nossa linha de pesquisa desde o projeto de mestrado. Para estes ensaios se fez necessário selecionar soros de pacientes com autoimunidade que apresentavam reatividade específica para as proteínas nucleares (RNP, Sm-RNP, SSA-Ro, SSA-Ro/La). Foram selecionados 22 soros da soroteca do Laboratório de Rotina da Disciplina de Reumatologia do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo que apresentavam positividade aos padrões RNP (4 soros), Sm-RNP (6 soros), SSA-Ro (8 soros), SSA-Ro/La (4 soros) e reatividade negativa (4 soros) em lâminas HEp-2. Os soros foram analisados quanto a presença de complemento (Total e componente C2) por Imunohemólise Radial, Fator Reumatóide por aglutinação de partículas de látex, Anticorpos Anti-Cardiolipina (IgG e IgM) por ELISA, Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos por Imunoflorescência Indireta em neutrófilos humanos, Anticorpos Anti-DNA por Imunoflorescência Indireta em *Crithidia luciliae* ou por Imunodifusão Dupla em extrato de timo de coelho APF por Imunoflorescência Indireta em células da mucosa oral, ENA por Imunodifusão Dupla contra extrato de baço de vitelo, FAN (*Imprint*) por Imunoflorescência Indireta em *imprint* de fígado de camundongo, e FAN (HEp-2) por Imunoflorescência Indireta em monocamada de células HEp-2 (dados não mostrados).

Para o ensaio de Imunoflorescência Indireta utilizou-se os soros que apresentavam os padrões de florescência mais característico e marcação mais intensa visualizados em lâminas HEp-2.

Os padrões de FAN Sm-RNP e RNP se apresentam sob a forma pontilhado grosso (também conhecida como filamentosos) e os padrões FAN SSA/Ro (ou simplesmente Ro) e SSB/La (ou simplesmente La) se apresentam de forma pontilhado fino (também chamado de atípico) em monocamadas de células HEp-2. Normalmente o padrão SSB/La é encontrado associado ao padrão SSA/Ro, sendo chamado de SSARo/La.

Os fatores nucleares RNPs reconhecem RNAs e as partículas U de pequenas proteínas ribonucleares (snRNPs) envolvidas no processo de *splicing* do RNA imaturo (U1, U2, U4/U6, U5, U7 e U11 snRNP). Os autoanticorpos anti- Sm-RNPs podem reagir com RNA polimerase

I, (67), proteínas ribossomais (68) e são capazes de reconhecer regiões ricas em prolina PP/aGMR/IPP presente na região C-terminal das proteínas U1 A, U1 C e Sm B'B (69). Soros anti-SSA/Ro reconhecem proteínas ribonucleares que possuem pequenos aminoácidos ricos em uridina conhecidos como hY<sup>1</sup>, hY<sup>3</sup>, hY<sup>4</sup> e hY<sup>5</sup> (60-52kD) (do inglês, *human cytoplasmatic*) (70) a maior proteína possui 60kD (71-73), e a partícula SSA/Ro contem 1 mol de proteína e 1 mol de RNA hY (73). Normalmente os padrões de soro anti-SSA/Ro podem ser encontrados sozinhos ou em associação com anti- RNP U1 ou anti- SSB/La. A molécula La é uma fosfoproteína ubquinamente expressa (47kD) que se associa com uma variedade de pequenos RNAs incluindo os RNAs percussores 5S e tRNAs de células, RNAs 7S; e os RNAs citoplasmáticos Ro hY e RNAs virais (74). A proteína La se liga a sequências curtas de resíduos de uridinas na porção 3' terminal desses RNAs via um domínio de 80 aminoácidos compartilhado por várias proteínas ligantes de RNAs denominadas de *RNA Recognition Motif* (RRM) dentre elas as proteínas ribonucleares (RNP) 1 e RNP 2 (75). La que provavelmente é um fator de terminalização de transcrição para RNA polimerase III (76, 77) possui atividade ATPase capaz de quebrar ligações DNA/RNA *in vitro* (78). Aparentemente a proteína La desempenha algum papel na maturação e/ou transporte de alguns desses RNAs celulares (79) e algumas moléculas La existem como parte de partículas de RNPs contendo a proteína Ro (60kD) e pequenos hY RNAs.

Para a visualização das proteínas spliceossomais em células B-EBV foi utilizado a técnica de imunofluorescência indireta para a marcação das proteínas através do uso de soro de pacientes com doenças autoimunes que apresentavam altos títulos de anticorpo antinuclear (também chamado de FAN) como anticorpo primário. As amostras de soro desses pacientes com autoimunidade foram caracterizadas previamente aos ensaios de marcação das proteínas spliceossomais (dados não mostrados). Utilizamos como substrato antigênico células polimorfonucleares ou mononucleares de indivíduos saudáveis tratadas ou não com IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  aderidos em lâmina de vidro por citocentrifugação. Os anticorpos primários não reagentes foram retirados por lavagem. O substrato foi incubado com anticorpo secundário específico a IgG humano marcado com fluoresceína e o reagente excedente foi retirado por lavagem. Quando as lamina são observadas através de um microscópio de fluorescência, as amostras positivas com autoanticorpo exibem fluorescência verde correspondendo às áreas da célula ou do núcleo onde os autoanticorpos se ligaram.

A preparação das lâminas procedeu da seguinte forma: as células de cultura B-EBV, células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico tratado e não tratado com IFN- $\gamma$  e/ou com TNF- $\alpha$  foram postas a aderirem em lâminas por citocentrifugação (900 g, 10

min), e posteriormente fixadas e permeabilizadas com Metanol e Acetona. As lâminas foram rotuladas, colocadas em câmara úmida adequada e adicionadas 1 gota (40-50  $\mu$ l) de: soro controle Negativo, soro RNP+, soro Sm-RNP+, soro SSA-Ro+ e soro SSA-Ro/La+ diluído em PBS. Em seguida as lâminas foram incubadas por 30 minutos em uma câmara úmida. Posteriormente as lamínulas foram lavadas com PBS. As lâminas foram postas de volta na câmara úmida e foram imediatamente cobertas, cada uma delas, com uma gota de conjugado fluorescente (anti-IgG humano marcado com FITC), e as lâminas foram incubados por mais 30 minutos. Repetiu-se a lavagem das lâminas. Após este procedimento, o meio de montagem de lâmina foi aplicado em uma linha contínua de uma extremidade a outra da lâmina. Desprezou-se o excesso de tampão PBS e encostou a borda inferior da lamínula na borda da lâmina. Suavemente baixou-se a lamínula em direção à lâmina de modo que o meio de montagem fluísse pela lâmina sem formação de bolhas de ar. O padrão de FAN foi então analisado nas lâminas dos grupos tratados e não tratados com as citocinas. Para que os resultados dos testes fossem considerados válidos, os critérios a seguir foram observados: o padrão FAN deve ser  $\geq 3$  “+” (“cruz”, valor referente a intensidade da marcação); e o controle negativo de IFI deve ser negativo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

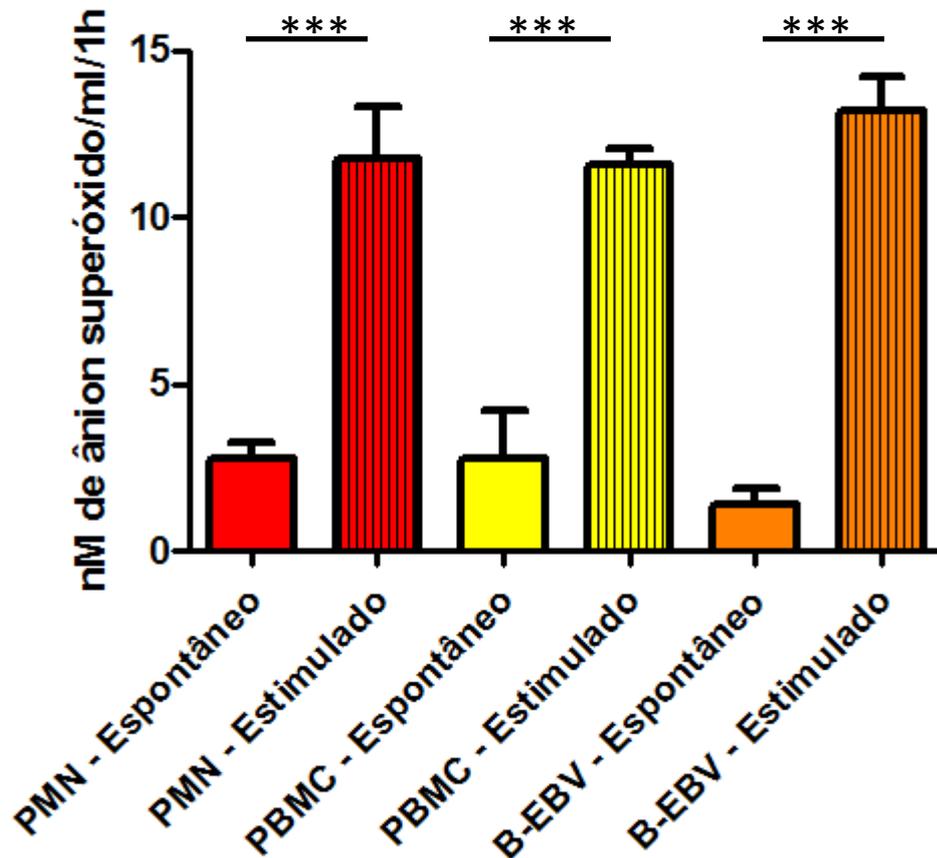
As lâminas de IFI foram analisadas em microscópio de fluorescência quanto a presença de padrões de fluorescência.

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Dosagem de Superóxido por Redução do Citocromo C

Avaliamos a função do sistema NADPH oxidase através da quantificação da liberação de ânion superóxido após estímulo com PMA e comparamos os valores obtidos em células polimorfonucleares, mononucleares e linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis (Figura 5).

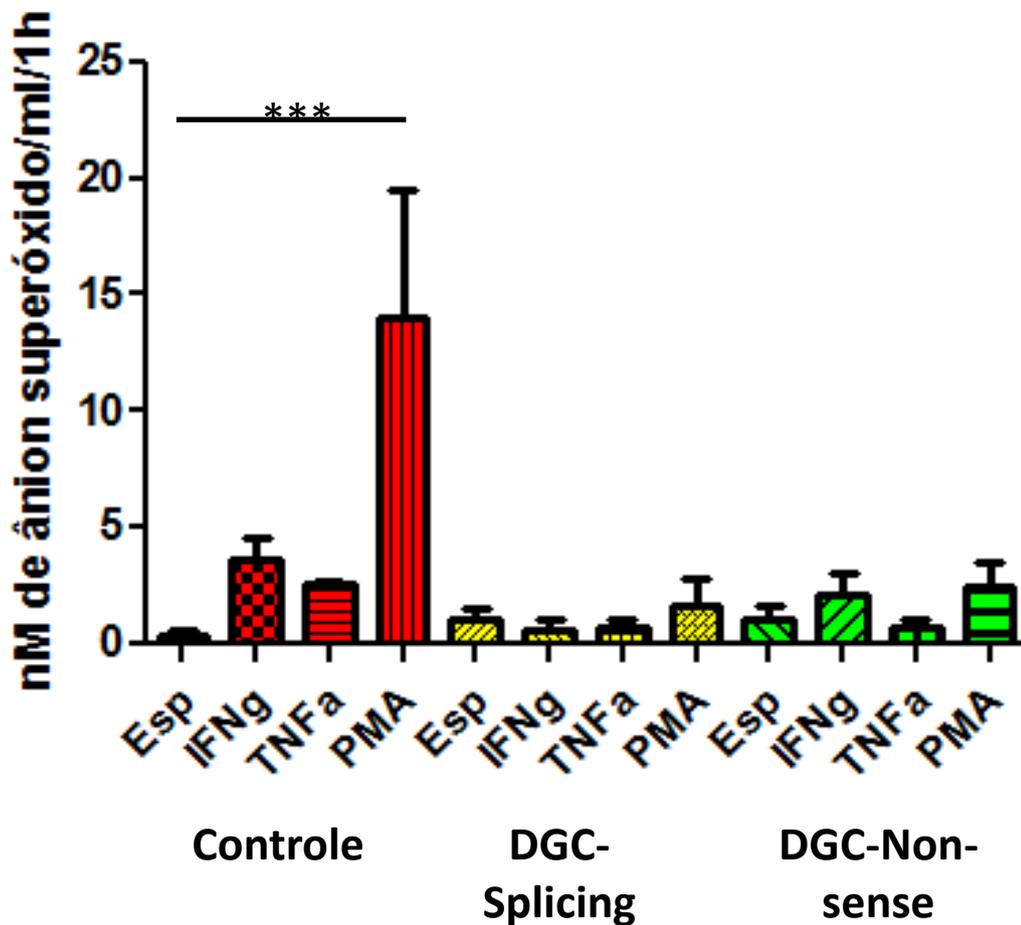
A comparação dos dados adquiridos da liberação de ânion superóxido pelas células polimorfonucleares, mononucleares e linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis ( $2 \times 10^6$  células/ml) estimuladas e não estimuladas com PMA nos revela que os três tipos celulares apresentam o mesmo padrão de resposta ao PMA, além disso, podemos verificar se houve aumento da atividade NADPH oxidase nos grupos estimulados quando comparados com os não estimulados com PMA nos 3 tipos celulares analisados (PMN Espontâneo:  $2,8 \pm 0,8$ ; PMN Estimulado:  $11,77 \pm 2,71$ ; PBMC Espontâneo:  $2,8 \pm 2,46$ ; PBMC Estimulado:  $11,57 \pm 0,81$ ; B-EBV Espontâneo:  $1,39 \pm 0,81$ ; B-EBV Estimulado:  $13,21 \pm 1,75$   $\eta$ M de ânion superóxido/ml/1h, média e desvio padrão respectivamente) (Figura 5). Estes resultados indicam que quaisquer um dos tipos celulares podem ser utilizados na nossa análise sobre a influência das citocinas em estudo sobre a transcrição dos genes do sistema NADPH oxidase. As diferenças encontradas entre os grupos não estimulados e estimulados com PMA de todos os tipos celulares testados foram considerados significativos com valores de  $p < 0,005$ .



**Figura 5.** Liberação de superóxido por células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (PBMC) e linfócitos B imortalizados com vírus EBV (B-EBV) de um indivíduo sadio. Liberação de  $O_2^-$  nas condições espontânea e estimulada com PMA, Os dados são expressos em  $\eta$ Mol de ânion superóxido produzido por microlitros por 1 hora.

Seguimos nosso estudo avaliando a liberação de ânion superóxido pelas células B-EBV ( $2 \times 10^6$  células/ml) de indivíduos saudáveis (Controle), 2 pacientes DGC ocasionado por defeitos de *splicing* e 2 pacientes DGC ocasionados por mutações do tipo *nonsense* não ativadas e ativadas com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou PMA, observamos que nos indivíduos saudáveis há um aumento na liberação de ânion superóxido com significância estatística ( $p < 0,05$ ) quando estas células são estimuladas com PMA e em menor grau, e sem diferença estatística, quando estimuladas com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Espontâneo:  $0,35 \pm 0,31$ ; IFN- $\gamma$ :  $3,6 \pm 1,54$ ; TNF- $\alpha$ :  $2,5 \pm 0,3$ ; PMA:  $14,05 \pm 9,47$ ;  $\eta$ M de ânion superóxido/ml/1h, média e desvio padrão respectivamente). Nos pacientes com DGC ocasionado por defeitos de *splicing* (Espontâneo:  $1,01 \pm 0,77$ ; IFN- $\gamma$ :  $0,62 \pm 0,68$ ; TNF- $\alpha$ :  $0,73 \pm 0,5$ ; PMA:  $1,61 \pm 2,07$ ;  $\eta$ M de ânion superóxido/ml/1h) e por mutações *nonsense* (Espontâneo:  $1,05 \pm 1,05$ ; IFN- $\gamma$ :  $2,03 \pm 1,77$ ;

TNF- $\alpha$ :  $0,73 \pm 0,5$ ; PMA:  $2,43 \pm 1,87$ ;  $\eta$ M de ânion superóxido/ml/1h, média e desvio padrão respectivamente) não foi possível detectar alterações de produção de superóxido estatisticamente significativa de forma que indique aumento da atividade NADPH oxidase em ambos os grupos apesar de ser detectada uma tendência a aumento apenas em células estimuladas com PMA no grupo de pacientes com defeitos de *splicing* e em células estimuladas com IFN- $\gamma$  e com PMA no grupo de pacientes com mutações *nonsense*. (Figura 6). Os dados obtidos indicam apenas que os pacientes DGC apresentam deficiência na produção de ânion superóxido mesmo quando as células são estimuladas com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou PMA.



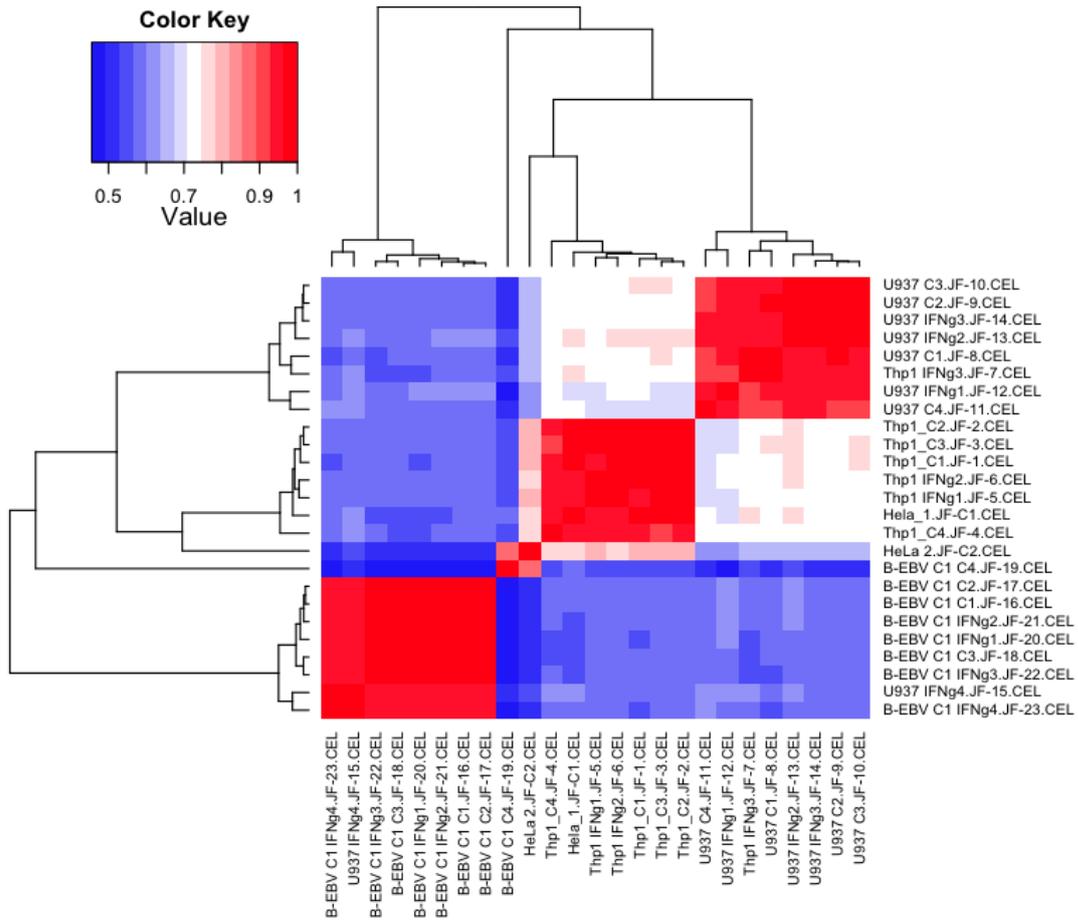
**Figura 6.** Liberação de superóxido por linfócitos B imortalizados com vírus EBV (B-EBV) de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com X-DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e por mutações *non-sense*. Liberação de  $O_2^{\cdot -}$  nas condições espontânea (Esp) e estimulada com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou PMA. Os dados são expressos em  $\eta$ Mol de anion superóxido produzido por microlitros por 1 hora (n=3)

#### 5.4.2 Análise do WT microarray

Previamente a análise dos dados dos genes alvo do nosso estudo, foi realizada a verificação dos valores da intensidade de sinal das probes dos chips utilizados nos ensaios de *microarrays*. Os dados apontam que os valores encontrados para cada amostra apresentam igualmente distribuídos, preenchendo os requisitos de controle do experimento e possibilitando a análise subsequente dos sets de probes gene específico (dados não mostrados).

Na sequência, foi realizada a normalização dos valores de intensidade encontrados nos chips de GeneArray para cada amostra testada. Os valores médios encontrados de intensidade apresentam uma distribuição dos seus valores ao redor do índice 6 de sinal e 25 de intensidade para todos os resultados adquiridos. Para prosseguir com as análises se fez necessário a realização da normalização dos valores encontrados em cada amostra testada. Após as correções de normalidade nos dados adquiridos, os dados passaram a serem expressos com uma distribuição normal mantendo-se os valores médios de intensidade com valores médios de intensidade ao redor do índice 6 de sinal e 25 de intensidade para todos os resultados adquiridos (dados não mostrados).

Posteriormente às normalizações dos dados adquiridos, foi realizada em todos os valores adquiridos uma análise de similaridade para os genes que foram detectados com expressão alterada em células B-EBVs tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  nos *arrays*. A análise demonstra que os tipos celulares diferentes encontram-se agrupados próximos uma das outras e resultados similares dentro do grupo de células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$ , demonstrando assim uma similaridade de expressão gênica global por tipo celular. (Figura 7).

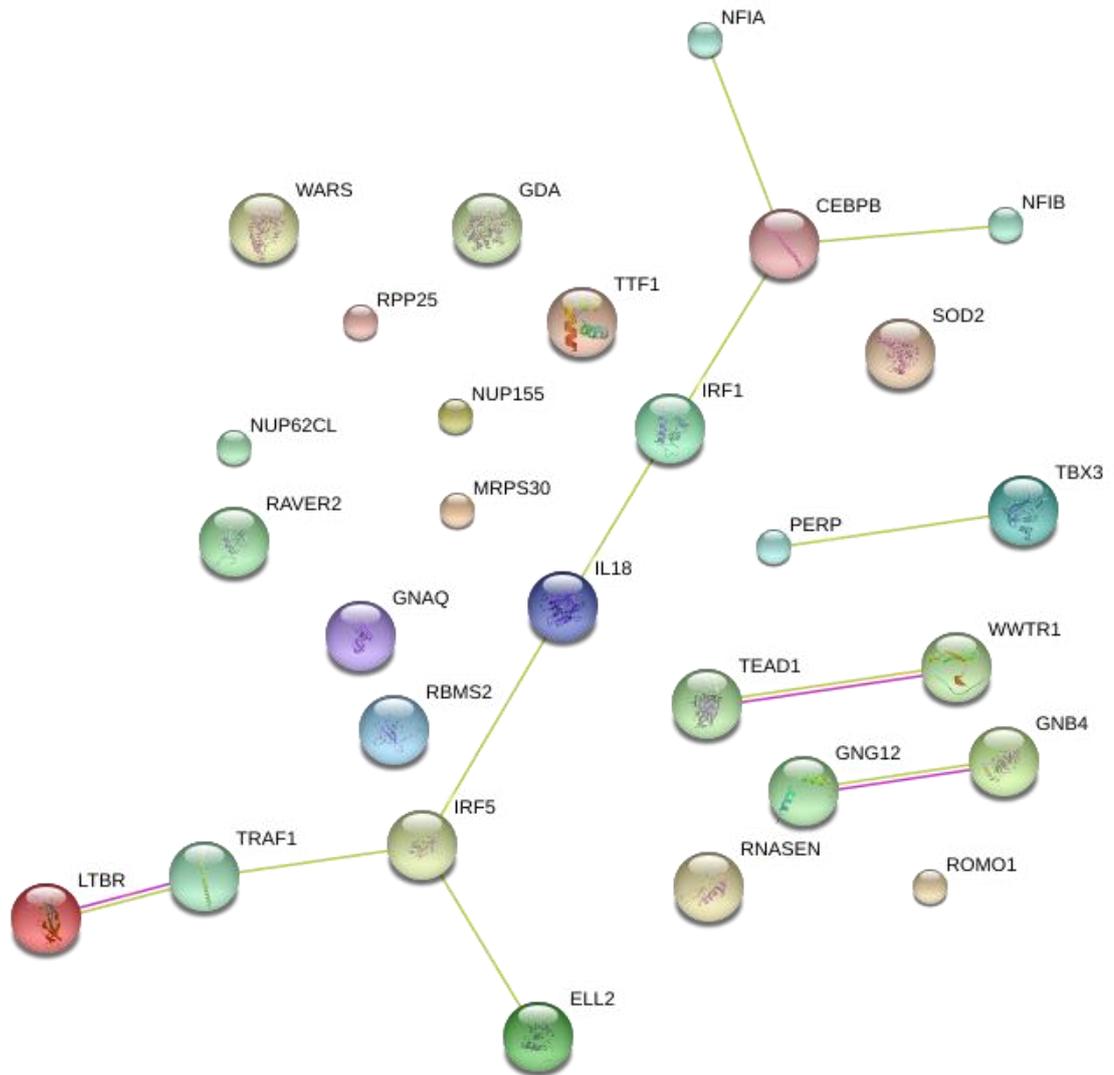


**Figura 7.** Análise de similaridade de genes detectados nos ensaios GeneArray: Através dos resultados encontrados as células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  puderam ser agrupadas, demonstrando dessa forma uma grande similaridade no nível global de expressão gênica entre as amostras (n=3).

Foi dada continuidade às nossas análises passando então a expressão gênica de genes individuais a ser avaliada comparando células não tratadas com células tratadas com IFN- $\gamma$ . Em células B-EBV, a análise da expressão de genes individuais comparando células não tratadas com células tratadas com IFN- $\gamma$  revelou a detecção de 578 transcritos com alteração em níveis de expressão, dentre elas 216 (37,37%) representam genes com isoformas, pseudogenes ou formas variantes e 20 (3,46%) representam regiões não codantes de (ncRNA). Destacamos na tabela abaixo alguns genes que se mostraram interessante ao nosso estudo (Tabela 3) em células B-EBV. Os genes selecionados na Tabela 3 foram utilizados para formar um mapa de interações entre estes genes utilizando-se do STRING-Database para as células B-EBV (Figura 8).

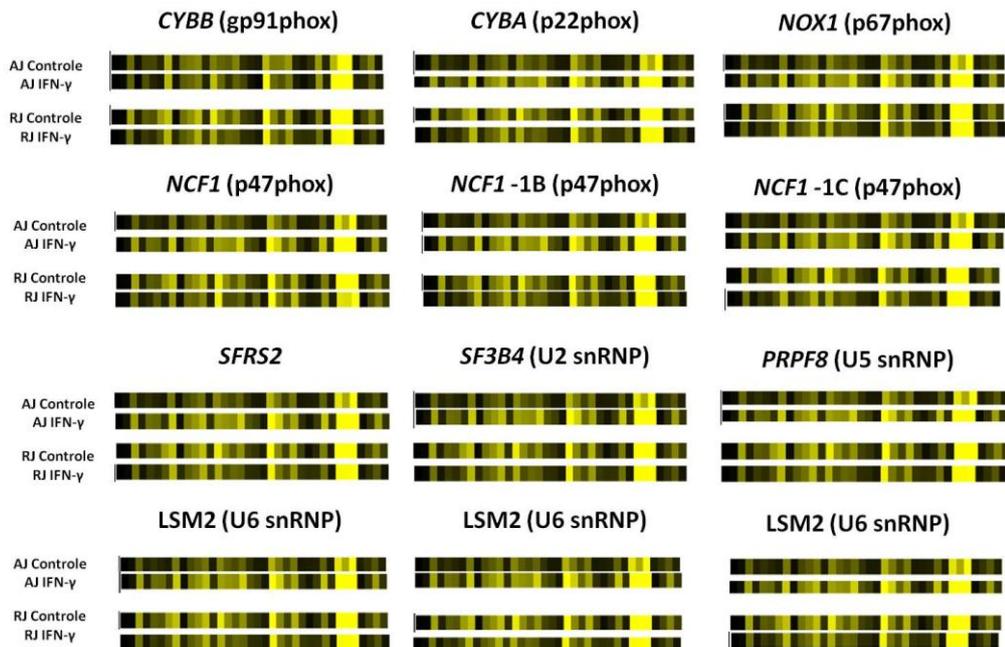
**Tabela 3:** Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$  em células B-EBV.

Gene	Símbolo do Gene	Fold Change
<b>Genes Relacionados a Transcrição</b>		
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	GNG12	6.07
TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	TEAD1	2.88
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1.62
WW domain containing transcription regulator 1	WWTR1	3.78
Guanine deaminase	GDA	4.35
Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	3.98
Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	GNB4	1.93
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.88
Nuclear factor I/A	NFIA	5.88
Transcription termination factor, RNA polymerase I	TTF1	1.81
Tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	1.52
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.88
Transcription termination factor, RNA polymerase I	TTF1	1.81
Nucleoporin 62kDa C-terminal like	NUP62CL	1.91
Interferon regulatory factor 5	IRF5	1.58
Nucleoporin 155kDa	NUP155	1.59
<b>Genes Relacionados ao Splicing</b>		
RNA, U5E small nuclear	RNU5E	2.72
Elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	1.59
Small nucleolar RNA, H/ACA box 23	SNORA23	1.53
RNA binding motif, single stranded interacting protein 2	RBMS2	1.84
Ribonuclease P RNA component H1	RPPH1	1.87
Ribonuclease P/MRP 25kDa subunit	RPP25	2.68
Small nucleolar RNA, C/D box 12C	SNORD12C	1.86
Mitochondrial ribosomal protein S30	MRPS30	1.72
Nuclear factor I/B	NFIB	5.81
Ribonucleoprotein, PTB-binding 2	RAVER2	3.76
Ribonuclease type III, nuclear	RNASEN	1.75
<b>Genes de Fatores de Transcrição</b>		
PERP, TP53 apoptosis effector	PERP	3.75
T-box 3	TBX3	2.03
<b>Genes Relacionados ao TNF-<math>\alpha</math></b>		
Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	LTBR	-2.19
TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	1.63
<b>Genes com Splicing Alternativo</b>		
Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	IL18	2.50
Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	IL18	2.50
Reactive oxygen species modulator 1	ROMO1	1.89
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	2.39



**Figura 8.** Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 3 em células B-EBV.

Passamos então a focar nossas atenções para os diferentes sets de probes de *microarray* para os genes da NADPH oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (splicing factor arginine/serine-rich 2 - *SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*) para analisar as alterações provocadas pelo IFN- $\gamma$  em linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis e paciente DGC ocasionado por defeitos de *splicing*. Os dados resultantes da nossa análise de clusters feito através do programa dChip demonstra que o IFN- $\gamma$  causa alterações na expressão de diferentes probes dentro dos genes escolhidos para esta análise ao comparar amostras de células B-EBV de um indivíduo sadio (AJ) e um paciente DGC com defeitos de *splicing* (RJ) (Figura 9)

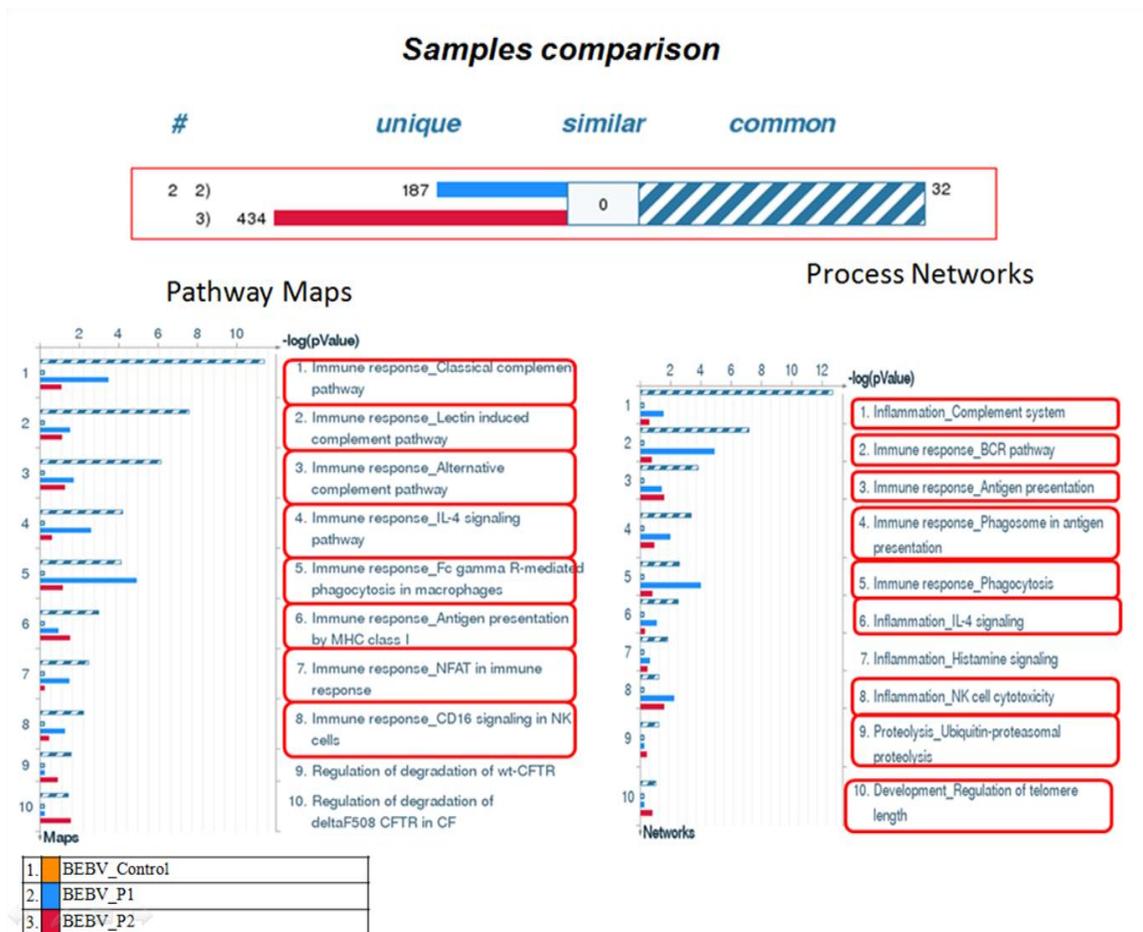


**Figura 9.** Análise de clusters e comparação de amostras em linfócitos B-EBV de indivíduo saudável (AJ) e paciente X-DGC com defeito de *splicing* (RJ) através do dChip dos dados obtidos com o *WT Gene Array*. Identificamos uma alterações na expressão dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (*SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*).

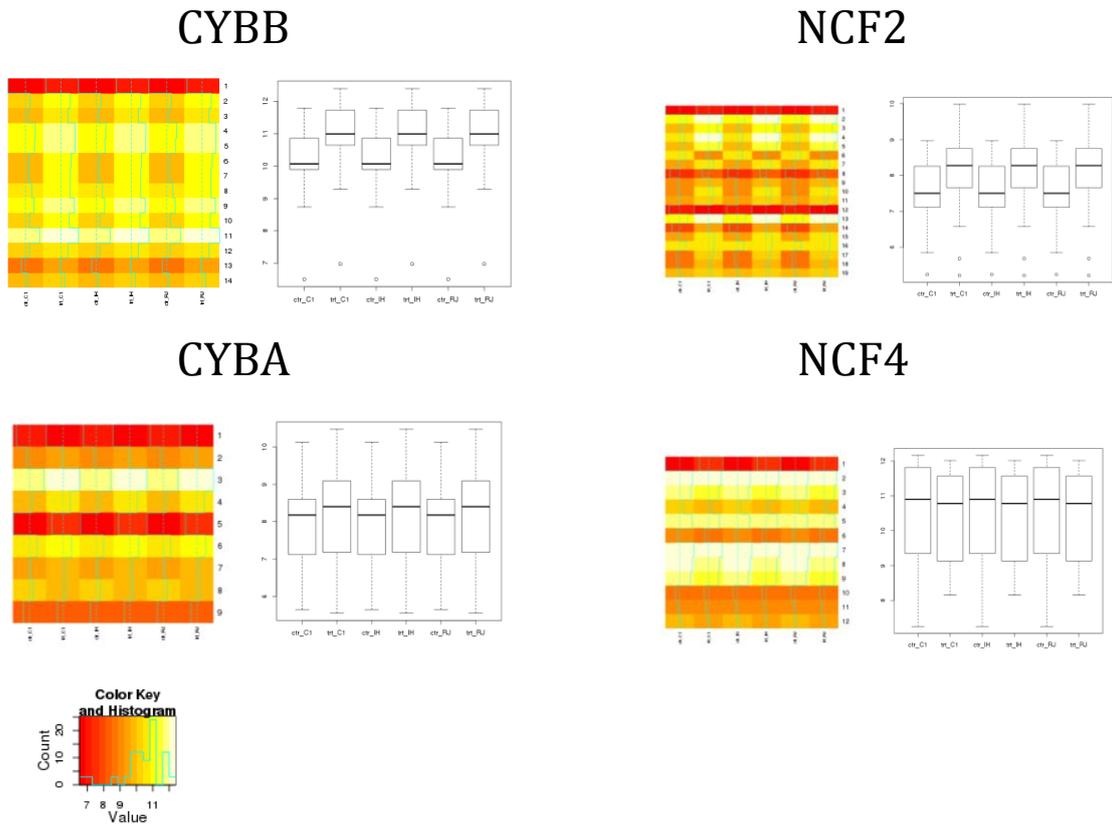
Os dados provenientes de análise comparativa com relação aos genes que responderam ao estímulo do IFN $\gamma$  em células de linhagem B-EBV do indivíduo saudável AJ, paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing* (RJ) e paciente DGC ocasionados por mutação *nonesense* (Figura 10) demonstraram que há 32 genes comuns e nenhum gene similar aos 3 tipos celulares analisados. Fomos capaz de identificar 187 e 434 genes que são únicos às linhagens BEBV P1 (RJ) e BEBV P2 (RQ) respectivamente. Nenhum gene único à célula de indivíduos saudáveis foi encontrado. Quando analisamos as principais vias ativadas podemos identificar a ativação de vias relacionadas a respostas imunes, tais como: as 3 vias de ativação do complemento (via clássica, alternativa e induzido por Lectina); sinalização induzido pelo IL-4, Fagocitose induzido por Fc $\gamma$ R em Macrófagos; apresentação de antígeno MHC I; NFAT em resposta imune; e sinalização mediado por CD18 em células NK. Em processos celulares fomos capaz de identificar a ativação dos seguintes processos relacionados a inflamação: ativação do sistema complemento, via do BCR, apresentação de antígeno, fagocitose, sinalização via IL-4 e citotoxicidade mediado por células NK. Outras vias também se demonstraram ativadas como proteólise mediado por ubiquitinação proteossômica e regulação do comprimento da telomerase.

As análises dos dados referente ao sistema NADPH oxidase em células de linhagem B-EBV de indivíduos saudáveis (Controle) pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e por mutação *nonesense* (Figura 11) demonstraram que houve forte indução dos genes *CYBB* e *NCF2*, uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA* e pouca alteração de expressão do gene *NCF4* quando estas células eram estimuladas pelo IFN $\gamma$ . Não fomos capaz de analisar os dados referente a expressão do gene *NCF1* por causa de probesets não confiáveis para este gene. Os valores encontrados para cada tipo celular são equiparáveis entre si.

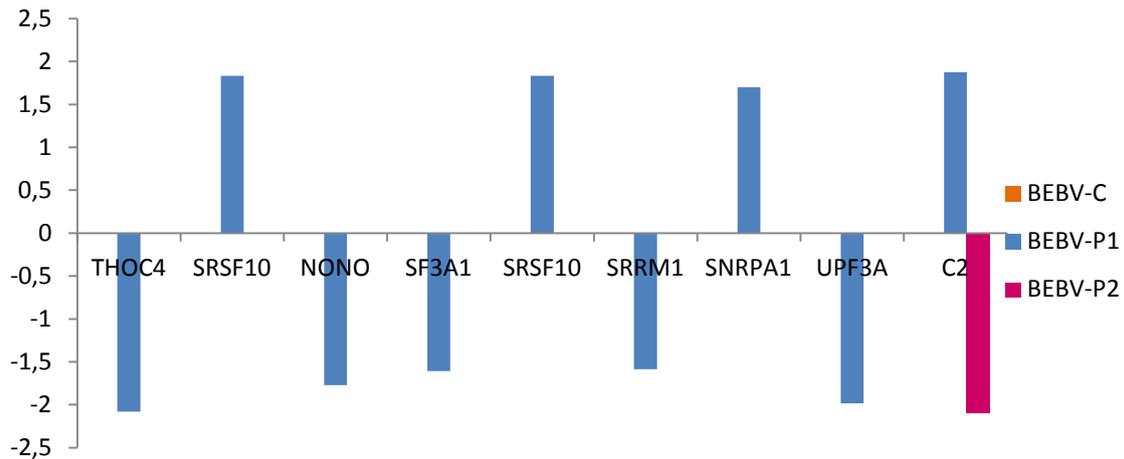
Quando analisamos os genes relacionado ao processo de *splicing* podemos identificar uma diminuição de expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A* e aumento de expressão de *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células do paciente DGC ocasionado por defeitos de *splicing*. No paciente DGC com mutação *nonesense* analisado podemos observar uma diminuição de expressão do gene *C2*. Em células de indivíduos saudáveis nenhum gene com modificação de expressão foi encontrado para este conjunto de genes. (Figura 12). As análises dos dados revelam a presença de diferentes perfis de ativação de genes relacionados ao processo de *splicing* dependente do paciente analisado (Figura 13).



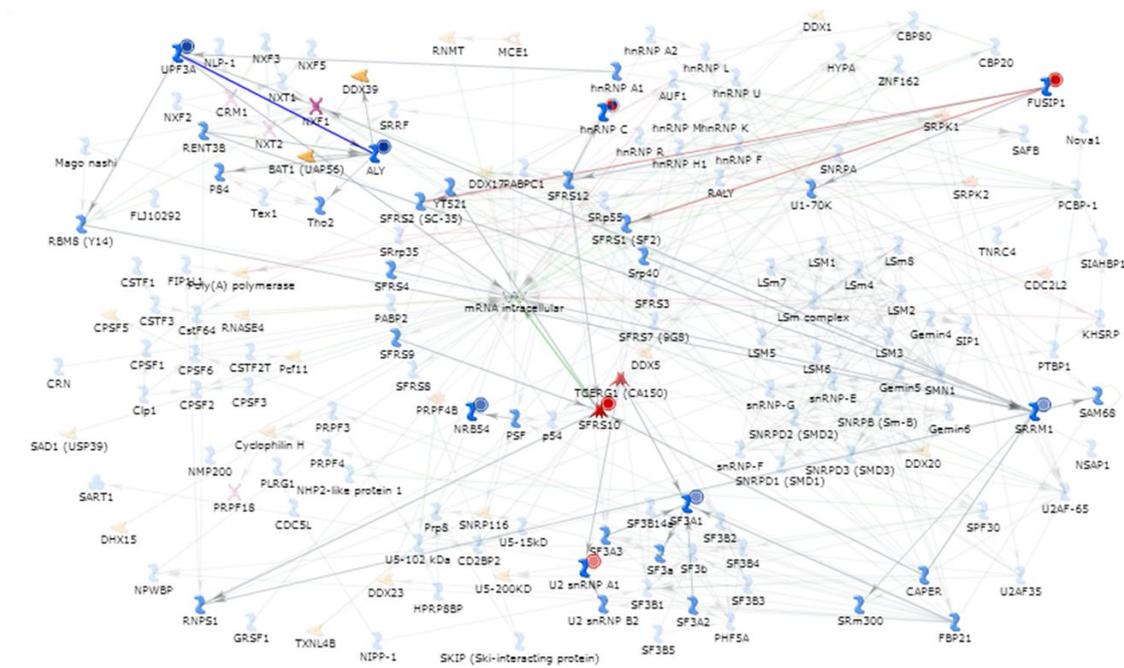
**Figura 10.** Comparação dos dados adquiridos por meio do WT GeneArray em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e paciente DGC ocasionado por mutação *nonsense*: Estão representados os resultados de comparação de todos os resultados e os que estão presentes em vias funcionais e em redes de processos celulares. A interseção dos dados adquiridos é definido como comum e representado como barra em linhas branca e azul. Os genes únicos de cada tipo celular estão representados em barras coloridas. Os dados considerados similares estão presentes em todos exceto um dos dados.



**Figura 11.** Análise dos dados referente à expressão dos genes do sistema NADPH oxidase em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e paciente DGC ocasionado por mutação *nonsense*: As análises dos dados revelaram um aumento de expressão dos genes *CYBB* e *NCF2* e uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA*. Resultados encontrados entre células de pacientes e indivíduos saudáveis são similares.



**Figura 12.** Análise dos genes relacionados ao processo de *splicing* induzidos pelo IFN $\gamma$  em células BEBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e paciente DGC ocasionado por mutação *nonesense*: As análises dos dados revelaram uma diminuição de expressão dos genes THOC4, NONO, SF3A1, SRRM1, UPF3A e aumento de expressão de SRSF10, SRSF10, SNRPA1 e C2 em células de paciente com DGC ocasionado por defeitos de *splicing*. No paciente DGC que apresentava mutação do tipo *nonesense* podemos observar uma diminuição apenas da expressão do gene C2. Em células do indivíduo saudável nenhum gene com modificação de expressão foi encontrado para este conjunto de genes.

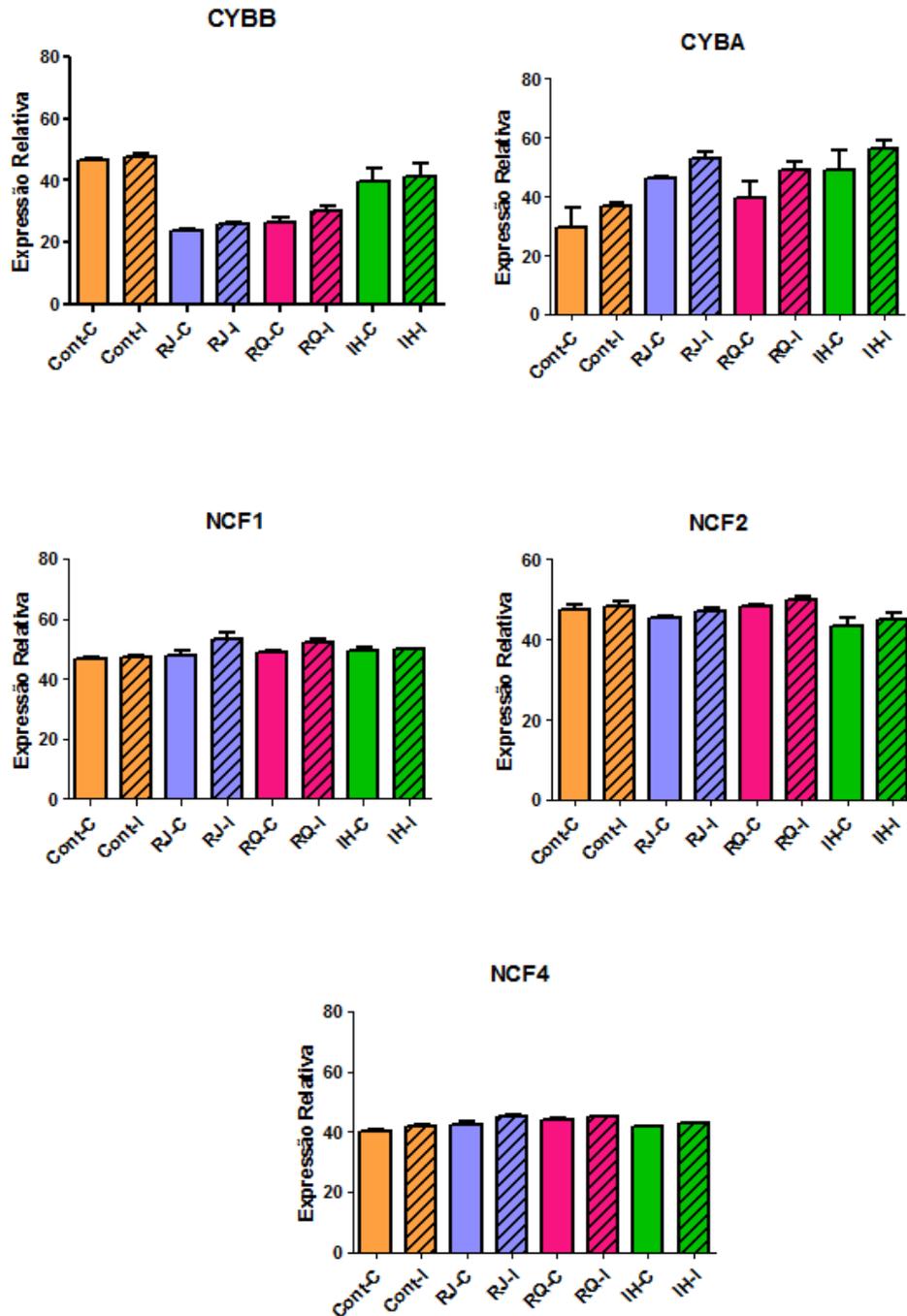


**Figura 13.** Análise funcional da rede de interações dos genes que se demonstraram induzidos pelo IFN $\gamma$  e que são relacionados ao processo de *splicing* em células B-EBV de indivíduo saudável, paciente DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e paciente DGC ocasionado por mutação *nonesense*: As análises dos dados revelaram a presença de diferentes perfis de ativação de genes relacionados ao processo de *splicing* nos pacientes analisados.

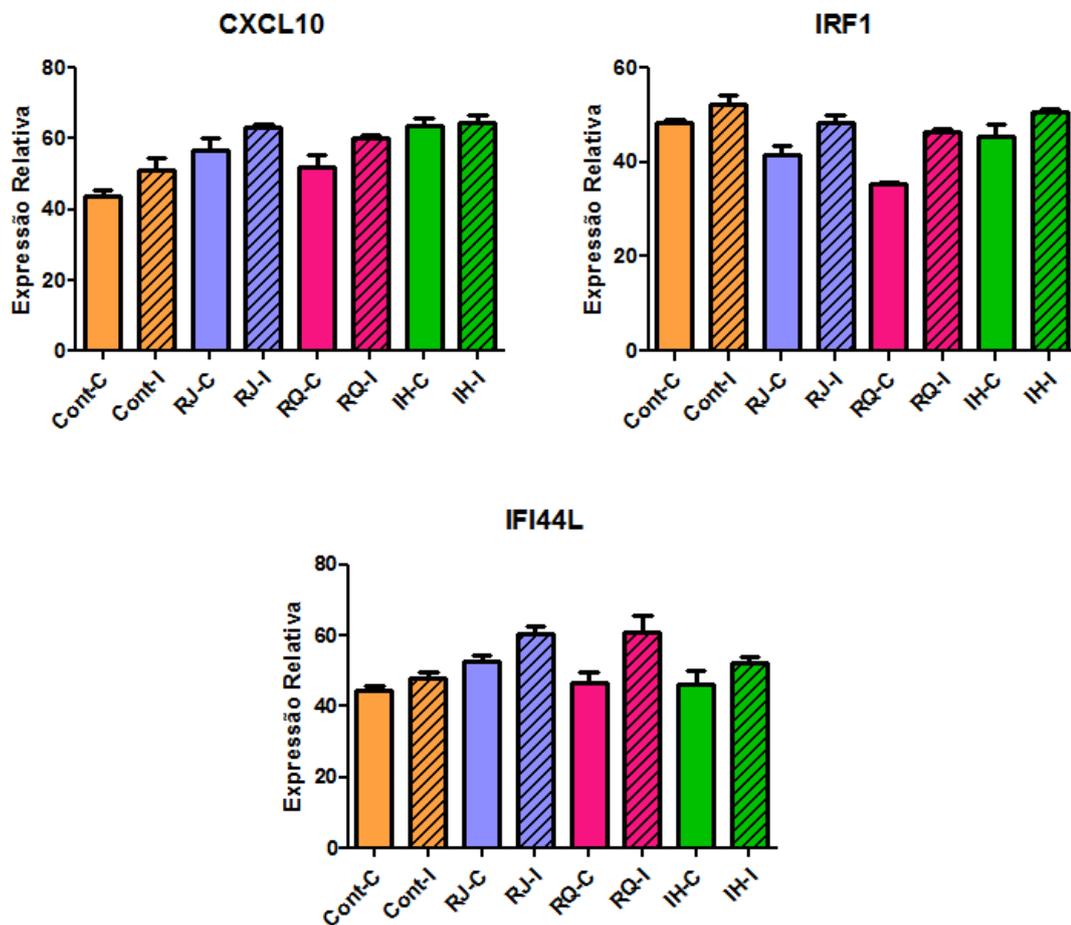
#### 5.4.3 Validação dos resultados de Microarrays

Seguimos nossa análise com os ensaios de avaliação da expressão gênica com os ensaios de *Real-Time* para genes dos sistema NADPH oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF2*, *NCF1* e *NCF4*) em células B-EBV de indivíduo saudável (AJ), de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* (RJ), por mutação *nonsense* (RQ) e por mutação *frameshift*, (IH). Os resultados encontrados demonstram uma tendência a aumento de expressão gênica de todos os componentes do sistema NADPH oxidase, no entanto o aumento da expressão gênica encontrado não pode ser considerado estatisticamente significativo (Figura 14).

Visando testar a indução do IFN- $\gamma$  testamos a expressão gênica de genes conhecidamente induzidos por esta citocina (*CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L*) em células B-EBV de indivíduo saudável (AJ), de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* (RJ), por mutação *nonsense* (RQ) e por mutação *frameshift*, (IH). Os resultados encontrados confirmam a indução do IFN- $\gamma$  mediante ao aumento de expressão gênica encontrada para estes genes em todas as células analisadas (Figura 15).



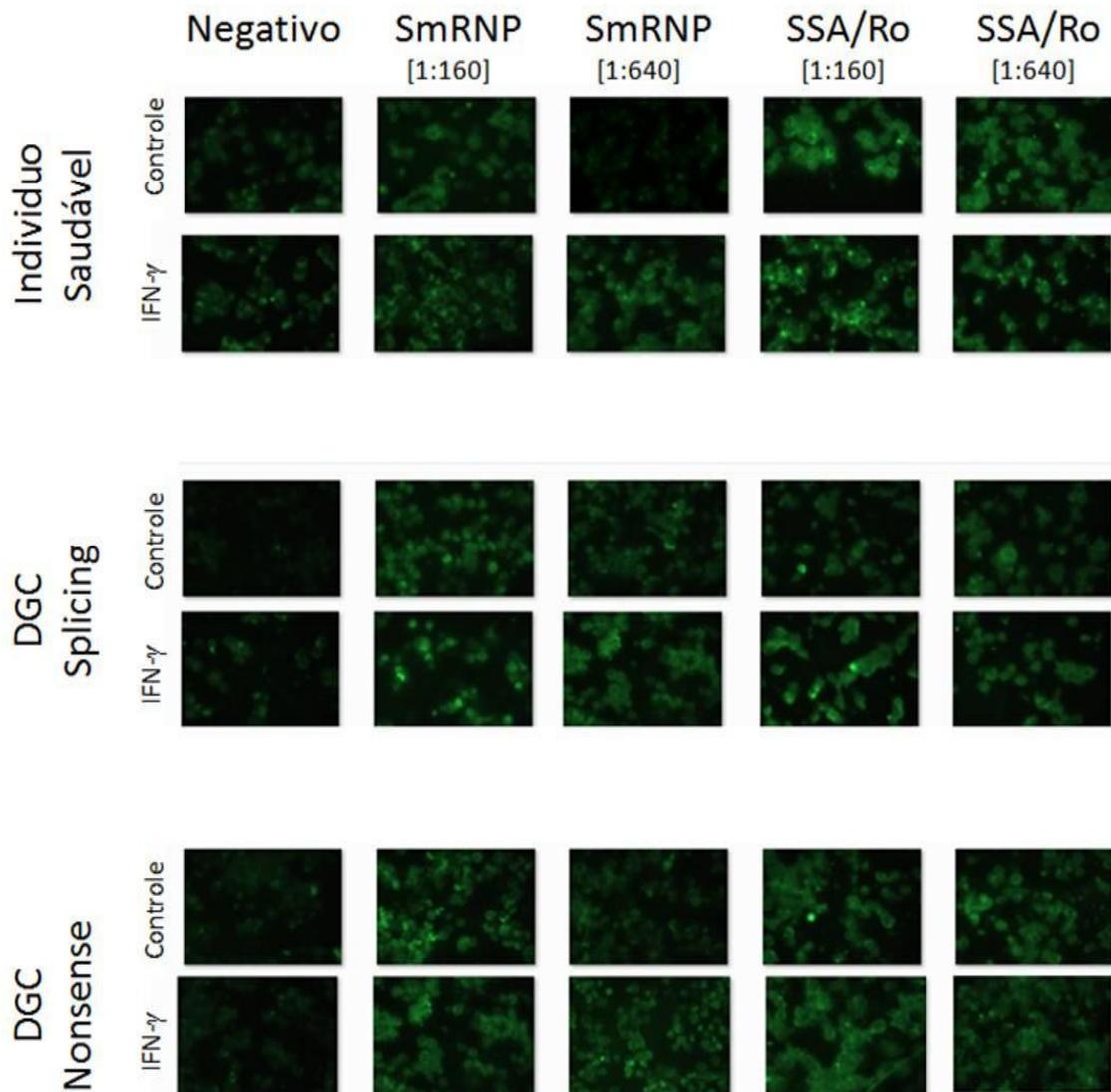
**Figura 14.** Análise da expressão gênica do sistema NADPH-oxidase por Real-Time PCR: Através dos resultados encontrados podemos observar um aumento da expressão gênica mediante a tratamento in vitro de IFN- $\gamma$  em todas as células analisadas (n=3).



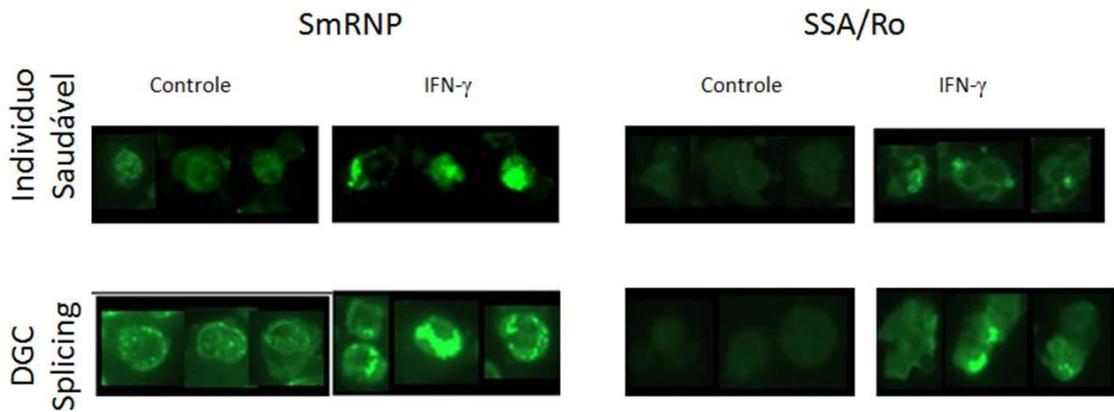
**Figura 15.** Análise da expressão gênica dos genes *CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L* por Real-Time PCR: Os resultados encontrados confirmam a indução do IFN- $\gamma$  mediante ao aumento de expressão gênica encontrada para estes genes em todas as células analisadas (n=3).

#### 5.4.4 Visualização das proteínas do spliceossomo por Imunofluorescência Indireta

Os ensaios realizados em linfócitos B imortalizados de indivíduos saudáveis e pacientes DGC com defeitos de *splicing* e *nonsense* confirmaram nossas expectativas tendo em vista que identificamos alterações na marcação das proteínas do spliceossomo, sendo que as alterações mais evidentes ocorrem com as proteínas SmRNPs e SSA/Ro. Estas alterações observadas incluem alterações no padrão de marcação e também aumento da fluorescência (Figuras 16 e 17).

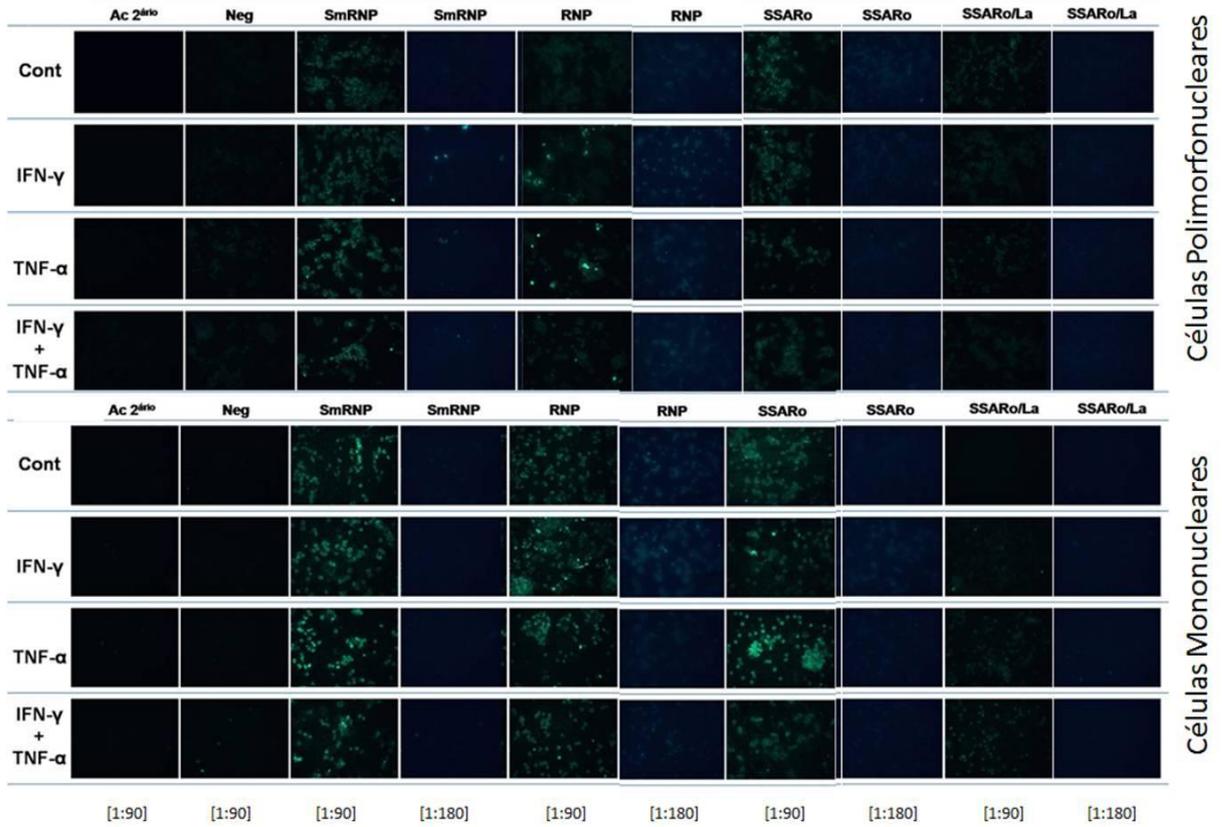


**Figura 16.** Marcação das proteínas do spliceossomo em linfócitos B imortalizados com EBV: Evidencia um aumento da marcação Sm-RNP e SSA/Ro indicando um aumento da expressão das proteínas relacionadas ao processo de *splicing* e edição do RNAm com o tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em células B-EBV de controle e paciente DGC ocasionado por defeitos de *splicing*.

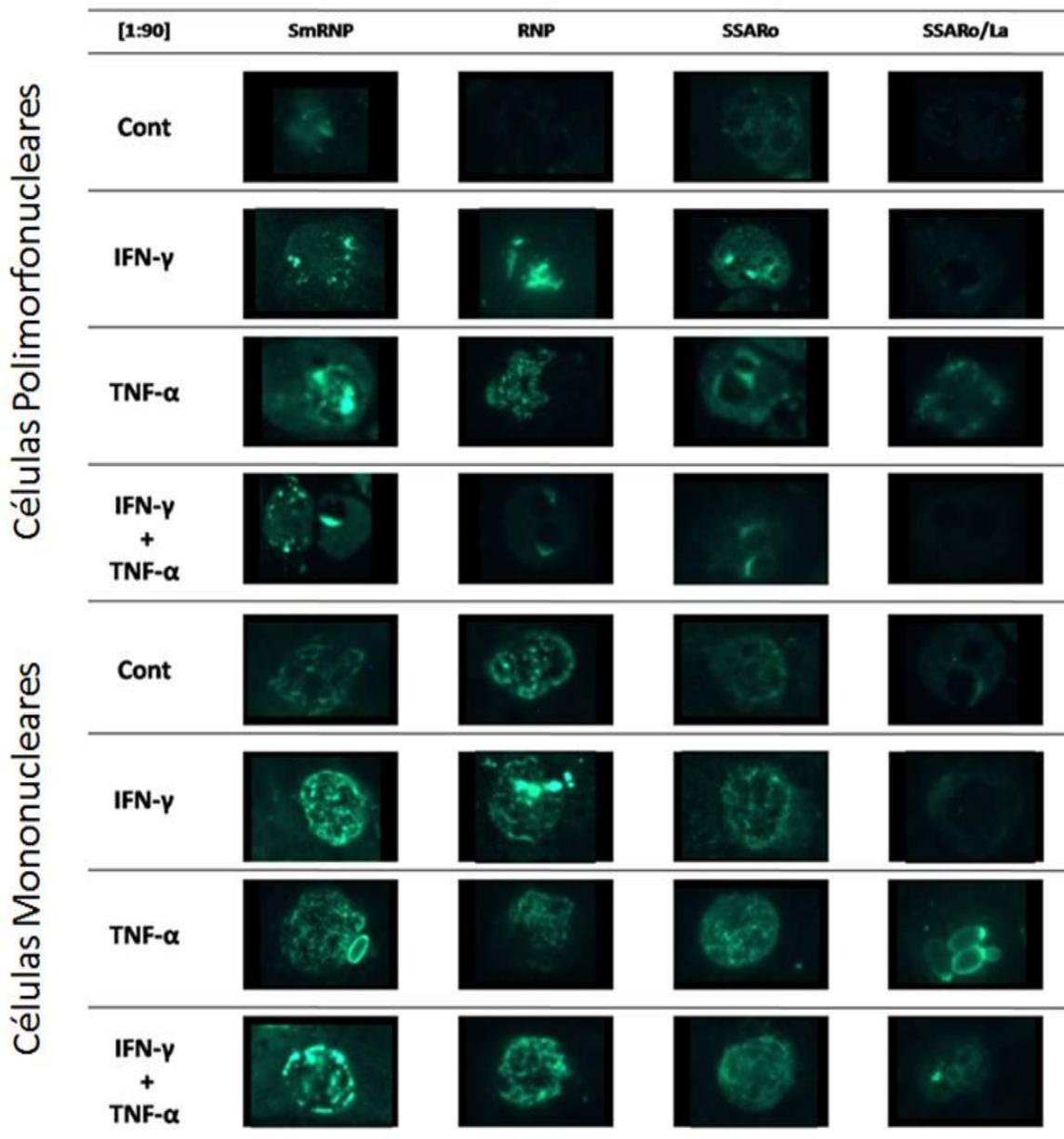


**Figura 17.** Modificações na distribuição da marcação das proteínas do spliceossomo em linfócitos B imortalizados com EBV: Além de observar um aumento da marcação Sm-RNP e SSA/Ro é evidente modificações na distribuição dessas proteínas após tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  em células B-EBV de indivíduos saudáveis e paciente DGC ocasionado por defeitos de *splicing*

Na sequência realizamos ensaios utilizando células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico e ampliamos tanto os padrões de marcação (RNPs, Sm-RNPs, SSA/Ro e SSA/Ro/La) utilizados em duas titulações diferentes (1:90 e 1:180) quanto os tratamentos de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e com isso fomos capaz de identificar alterações na marcação das proteínas do spliceossomo de uma forma mais evidente nos padrões RNPs e SmRNPs tanto no tratamento com IFN- $\gamma$  quanto TNF- $\alpha$  (Figuras 18-19). Em ambos os casos fomos capaz de identificar alterações em termos de distribuição intracelular da marcação indicando que essas proteínas com os tratamentos modificam o padrão de expressão e distribuição das proteínas envolvidas com o processo de *splicing*.



**Figura 18.** Marcação das proteínas do spliceossomo em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico: Evidência de um aumento da marcação Sm-RNP e RNP (em titulação 1:90 e 1:180) indicando um aumento da expressão das proteínas relacionadas ao processo de *splicing* e edição do RNAm com os tratamentos *in vitro* com IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  em células polimorfonucleares de controle sadio. (n=3).



**Figura 19.** Modificações na distribuição da marcação das proteínas do spliceossomo em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico: Evidência de um aumento e alteração da distribuição da marcação Sm-RNP, RNP e SSA/Ro em células polimorfonucleares (na titulação 1:90); e evidência de um aumento e alteração da distribuição da marcação Sm-RNP, RNP, SSA/Ro e SSA/Ro/La em células mononucleares (na titulação 1:90) indicando um aumento da expressão das proteínas relacionadas ao processo de *splicing* e edição do RNAm com os tratamentos *in vitro* com IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  em células polimorfonucleares de controle sadio. (n=3)

## 5.5 Resumo dos resultados desta etapa

Os dados adquiridos com os *microarrays* demonstram que em células B-EBV detectamos alteração dos níveis de expressão em 578 transcritos mediante ao tratamento pelo IFN $\gamma$ , dentre elas 216 (37,37%) representam genes com isoformas, pseudogenes ou formas variantes e 20 (3,46%) representam regiões não codantes de RNA (ncRNA). A análise dos genes expressos em células B-EBV de indivíduo saudável (Controle), de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* (RJ) e pacientes DGC ocasionados por mutação *nonsense* (RQ) revelaram a presença de 32 genes comuns e 187 e 434 genes que são únicos às linhagens B-EBV P1 (RJ) e B-EBV P2 (RQ) respectivamente. que são estimulados pelo IFN $\gamma$ . Dentre as principais vias ativadas pelo IFN $\gamma$  destacamos as 3 vias de ativação do complemento (via clássica, alternativa e induzido por Lectina); sinalização induzido pelo IL-4, Fagocitose induzido por Fc $\gamma$ R em macrófagos; apresentação de antígeno MHC I; NFAT em resposta imune; e sinalização mediado por CD18 em células NK. As análises dos processos celulares ativados revelaram a ativação dos seguintes sistemas: ativação do sistema complemento, via do BCR, apresentação de antígeno, fagocitose, sinalização via IL-4 e citotoxicidade mediado por células NK. Outras vias também se demonstraram ativadas como proteólise mediado por ubiquitinação proteossômica e regulação do comprimento da telomerase.

As análises dos dados focados no sistema NADPH oxidase em células de linhagem B-EBV de indivíduos saudáveis (Controle) e pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* nos possibilitaram demonstrar forte indução dos genes *CYBB* e *NCF2*, uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA* e pouca alteração de expressão do gene *NCF4* quando estas células eram estimuladas pelo IFN $\gamma$ .

As análises dos dados focados no processo de *splicing* nos possibilitaram identificar uma diminuição de expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A* e aumento de expressão de *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células do paciente que apresentava defeitos de *splicing* enquanto que no paciente com mutação *nonsense* analisado apenas podemos observar uma diminuição da expressão do gene *C2*. Em células do terceiro paciente analisado e de indivíduos saudáveis nenhum gene com modificação de expressão foi encontrado para este conjunto de genes revelando que há presença de diferentes perfis de ativação de genes relacionado ao processo de *splicing* nos pacientes analisados.

Os dados adquiridos por meio de *Real-Time PCR* visando a validação dos dados obtidos para os genes do sistema NADPH oxidase nos possibilitaram detectar que os pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing*, mutação *nonsense* e *frameshift*

apresentaram níveis de expressão gênica menor aos encontrados em células B-EBV de indivíduo saudável para todos os componentes do Sistema NADPH oxidase. Foi possível observar também que o tratamento com IFN- $\gamma$  promove aumento de expressão gênica em todos os componentes do sistema NADPH-oxidase em todas as células analisadas. As análises de expressão gênica de genes conhecidamente induzidos pelo IFN- $\gamma$  (*CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L*) em células B-EBV de indivíduo saudável (AJ) e de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* (RJ), mutação *nonsense* (RQ) e mutação *frameshift*, (IH) confirmam a indução do IFN- $\gamma$  mediante ao aumento de expressão gênica encontrado para estes genes em todas as células analisadas.

Os dados adquiridos por meio de Imunofluorescência Indireta para a detecção das proteínas pliceossomais visando a validação dos dados obtidos para os genes dos relacionados ao processo de *splicing* em linfócitos B imortalizados de indivíduos sadios e paciente DGC com defeitos de *splicing* confirmaram nossas expectativas tendo em vista que identificamos alterações na marcação das proteínas do spliceossomo, sendo que as alterações mais evidentes ocorrem com as proteínas SmRNPs e SSA/Ro. Estas alterações observadas incluem alterações no padrão de marcação e também aumento da fluorescência detectada. Os dados encontrados em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico nos possibilitou identificar alterações na marcação das proteínas do spliceossomo de uma forma mais evidente nos padrões RNPs e SmRNPs em células tratadas com IFN- $\gamma$  ou com TNF- $\alpha$ . Em ambos os casos fomos capaz de identificar alterações em termos de distribuição intracelular da marcação indicando que essas proteínas sofrem modificação de expressão e de distribuição das proteínas envolvidas com o processo de *splicing*.

## 6 CAPÍTULO 2 – Análise em células THP1, U937 e GM12878

### 6.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desta segunda etapa deste estudo é investigar o efeito do IFN- $\gamma$  sobre eventos pós-transcricionais relativos à expressão e regulação do gene *CYBB* em células de linhagem mielomonocíticas e em linhagem de linfócitos B de indivíduo sadio transformadas com o vírus Epstein-Barr (GM12878).

### 6.2 Objetivos Específicos

Na presente etapa deste estudo avaliamos se o IFN- $\gamma$ :

1. Interfere no processamento da mensagem do RNAm de transcritos dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*);
2. Causa modificações na expressão de transcritos relacionados a transcrição, ao processo de *splicing*, à genes de fatores de transcrição, genes relacionados à via do TNF- $\alpha$ ;

## 6.3 Materiais e Métodos

### 6.3.1 Cultura de células

Células de linhagem THP1, U937 e GM12878 foram gentilmente cedidas pelo Professor Peter Newburger, University of Massachusetts Medical School. As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 50 ml (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) contendo meio de cultura RPMI-1640 completo, numa densidade de  $0,5-1,0 \times 10^6$  células/ml a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi monitorizada 3 vezes por semana e a cultura mantida durante os estudos. Alíquotas das linhagens celulares foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, caso estudos adicionais precisem ser realizados.

### 6.3.2 Tratamento com IFN- $\gamma$ *in vitro*

As linhagens celulares foram cultivadas com IFN- $\gamma$  (100 U/ml, R&D Systems) em placas estéreis de 6 poços ou garrafas estéreis de 25 cm<sup>3</sup> durante 48 horas. Após o término do tempo de incubação, as células foram recuperadas através da utilização de PBS 1x gelado, sendo as células recuperadas após centrifugação a 250 g durante 5 minutos a 4°C. A seguir as células foram ressuspensas em concentração e solução adequada de acordo com cada experimento.

### 6.3.3 Obtenção de RNA

As células de cultura cultivadas em garrafas de poliestireno (BD-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) foram submetidas à extração do RNA total pelo método recomendado pelo fabricante do reagente TRIZOL (GIBCO BRL) para os ensaios de *Real-Time PCR*; ou submetidas um fracionamento em RNAm e microRNA conforme recomendado pelo fabricante do reagente RNazol® RT (Molecular Research Center, Inc.) para os ensaios de *WT GeneArray*. Ambos os processos encontram-se descritos de forma mais detalhada abaixo.

Em seguida as amostras foram quantificadas por espectroscopia em comprimento de onda de 260 e 280 nm, e armazenados à -80°C até seu uso para conversão em cDNA. Os valores da absorbância obtidos foram convertidos em  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  através da fórmula: absorbância (260 nm) x diluição x 0,04 = concentração de RNA.

Extração do RNA Total: Cerca de  $1,0 \times 10^7$  células foram ressuspensas em 1 mL de Trizol e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção de RNA total. Posteriormente foram adicionados a cada tubo 200  $\mu$ L de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a 4° C. Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi transferida a um novo tubo e 500  $\mu$ L de isopropanol foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas 45 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA ressuspenso em 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 g durante 5 minutos a 4° C. O etanol foi retirado cuidadosamente e o RNA diluído em 30  $\mu$ L de água livre de DNAses e RNAses. Depois de incubação durante 12 horas a 4° C a leitura da concentração do RNA foi feita por espectrofotometria numa diluição de 1:50 a  $\lambda = 260$  nm.

Extração de RNA/Fracionamento em RNAm e microRNA: O RNazol RT separa o RNA de outras moléculas baseada na interação do fenol e guanidina com componentes celulares. Uma quantidade de  $1,0 \times 10^7$  células foi homogenizada e lisada em 1 mL de RNazol RT e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtenção do lisado celular e em sequência suplementado com 0.4 ml de água. A mistura foi agitada de forma manual por 15 segundos e incubadas por 15 minutos. A adição de água induz a precipitação do DNA, proteínas e polisacarídeos enquanto o RNA se mantém solúvel no homogenizado. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4° C. Após a centrifugação o DNA, proteínas e a maioria dos polisacarídeos formam um pellet semissólido no fundo do tubo e o RNA se mantém solúvel no sobrenadante. Um total de 1 ml do sobrenadante (75% do total do volume do sobrenadante) foi transferido para um novo tubo, deixando uma camada de sobrenadante acima do pellet de DNA/proteína. O RNA foi precipitado misturando o 1 ml do sobrenadante transferido com 0.4 ml de etanol 75% (v/v). As amostras foram incubadas por 10 minutos e centrifugadas a 12000 g por 8 minutos a 4° C. O precipitado de RNA forma um pellet branco no fundo do tubo. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e estocado a 4 °C para o isolamento de pequenos-RNAs. Foram utilizados 0.4 ml de 75% etanol para precipitar as moléculas de RNA maiores que 200 bases. Os pellets de RNA foram lavados duas vezes com 0.4 ml de etanol 75% (v/v) seguido de centrifugação a 8000 g por 3 minutos a 4 °C. Entre as lavagens o etanol 75% foi

removido com o uso de micropipeta e após a última lavagem o etanol residual foi removido e o pellet de RNA foi dissolvido em água DEPC livre de RNase, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, e seguido por sucessivas pipetagens para dissolver o pellet. O RNA isolado consiste de moléculas de RNA >200 bases. Esta fração de RNA constitui 80 à 85% do RNA celular e contém RNA ribossomal e mRNA.

A fração dos pequenos-RNAs foi isolada através da precipitação dos RNAs com um volume de 0.8 ml de isopropanol. As amostras foram incubadas por 30 minutos à 4 °C e posteriormente centrifugadas a 12000 g por 15 min à 4 °C. o precipitado foi lavado 2 vezes com isopropanol 70% (v/v) seguido de centrifugação a 12000 g por 3 minutos a 4 °C. Após a última lavagem, o álcool residual foi removido com micropipeta e o RNA dissolvido em água DEPC livre de RNase. Os pequenos RNAs residuais isolados contém pequenos RNAs ribossomais, RNAt, siRNA e miRNA variando em tamanho de 200 a 10 bases. O fracionamento dos RNAs foi checado por gel de 4-6% em gel de agarose em corrida eletroforética e a quantificação da concentração dos RNAs foi feita por espectrofotometria conforme previamente descrito.

#### 6.3.4 *Whole Transcriptome Microarray (WT GeneArray)*

Os ensaios de *Whole Transcriptome (WT) microarrays* foram desenvolvidos durante o período de estágio na University of Massachusetts Medical School sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Edwin Newburger, que integra o projeto como pesquisador colaborador (Anexo A).

Para a análise do padrão de expressão dos mRNAs (com tamanho maior que 200 bases) expressos nas células U937, THP1 e GM12878, tratados e não tratados com IFN- $\gamma$ , que passaram previamente pelo protocolo de fracionamento em RNAm e microRNA, foram utilizados 2 kits complementares seguindo as recomendações dos fabricantes, o WT Expression Kit (Ambion) que prepara as amostras de RNA para o GeneChip WT Expression Arrays Kit (Affymetrix) para que a análise do transcriptoma expresso nas células fosse realizado. O kit da Ambion gera *sensestrand* cDNA de amostras de RNA total para que o processo de fragmentação e marcação usando o kit da Affymetrix possa ser feito. O kit GeneChip WT Expression (Affymetrix) utiliza um método de transcrição reversa que especificamente utiliza o RNA não ribossomal das amostras, incluindo assim tanto o mRNA poly(A) como o mRNA não poly(A). Após este processo foram realizados a hibridização das amostras nos chips, a leitura dos chips através do GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)

e a geração dos arquivos .CEL contendo os valores de intensidade de cada probe contido nos chips através do Gene-Chip Operating Software v. 1.3.

### 6.3.5 Análise do WT GeneArray

As análises dos dados adquiridos nos ensaios de *Whole Transcriptome* (WT) *microarrays* foram desenvolvidas durante o período de estágio na Universität Zürich sob a supervisão do Dr. Michal Okoniewski, que integra o projeto como pesquisador colaborador (Anexo B).

A análise dos dados obtidos foi realizado utilizando o Expression Console Software (Affymetrix), dChip e Bioconductor. Estimativas de sinal foram obtidas a partir dos arquivos .CEL de todas as amostras por intermédio de normalização quantitativa usando o algoritmo PLIER para probeset e intensidades Iter-PLIER (*Probe Logarithmic Intensity Error*) para o gene de nível de intensidade. Presença/ausência de genes foi determinado por DABG (*Detection Above Background*). Os valores de p ANOVA e *fold changes* para a expressão do gene foi calculado utilizando Bioconductor e o mapeamento da rede bioquímicas/regulatória de genes importantes realizado usando o String Data-base. A análise para a geração de rede de interações, análise funcional dos dados gerados e da rede de vias ativadas foram gerados através do uso dos aplicativos IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e do MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>), as três análises encontram-se descritos abaixo.

Rede de interações: O conjunto de dados contendo os identificadores do gene e valores de expressão correspondente foram carregados nos programas IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e no MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>). Cada identificador foi mapeado ao seu objeto correspondente no banco de dados dos programas acima mencionados. Um valor de corte de 0,05 foi criado para identificar moléculas cuja expressão foi significativamente expressa diferencialmente. Estas moléculas, chamadas moléculas elegíveis da rede, foram sobrepostas numa rede molecular mundial desenvolvida a partir de informações contidas no banco de dados presente em cada um dos programas. As redes de interações das moléculas elegíveis foram então geradas por algoritmos com base em sua conectividade.

Análise funcional do conjunto de dados: Uma análise funcional foi gerada a partir de funções biológicas que se demonstraram ser mais significativas para o conjunto de dados gerados através do *WT GeneArray*. A rede de moléculas associadas às funções biológicas e/ou doenças no banco de dados do aplicativo foram consideradas na análise. O teste *Right-tailed Fisher* foi usado para calcular o valor de  $p$  ( $p$ -value) para determinar a probabilidade de que cada função biológica e/ou doença atribuídos a esse conjunto de dados é devido ao acaso.

Análise da rede de vias canônicas ativadas: A análise vias canônicas identificadas foi gerada a partir dos bancos de dados contidos nos programas IPA (® Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) e MetaCore™ Thomson Reuters (® GeneGo <https://portal.genego.com/>) que se demonstraram mais significativas dentre o conjunto de dados gerados através do *WT GeneArray*. Moléculas do conjunto de dados que apresentaram valor de expressão acima do valor de corte e que foram associadas com vias canônicas da base de dados de cada um dos programas acima mencionados foram consideradas na análise. O nível de significância da associação entre o conjunto de dados e da via canônica foi medido de duas maneiras: 1) A razão do número de moléculas a partir do conjunto de dados que são mapeados pelo número total de moléculas que pertencem à via canônica. 2) O teste *Fisher* foi usado para calcular um valor de  $p$  para determinar a probabilidade de que a associação entre os genes no conjunto de dados e da via canônica pode ocorrer ao acaso.

#### 6.3.6 Validação dos resultados de *WT GeneArray* por Real Time PCR

Durante o ensaio as amostras de RNA total das células de linhagem ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram preparadas através do reagente TRIZOL. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit SuperScript III RT (Invitrogen). Para a reação usou-se 2  $\mu$ g de RNA total, hexâmeros randômicos e (MMLV-RT). O cDNA foi diluído (1:30) e ampliado por meio de PCR em tempo real, através do sistema SYBR Green Real Time (Applied Biosystems). O SYBR® Green se une especificamente a DNA de dupla fita e em estado de excitação emite luz. Deste modo, quanto mais um produto é acumulado, maior é a fluorescência. Isto permitiu correlacionar a intensidade de sinal coletado com a quantidade de produto amplificado (66). O gene escolhido para controle interno da reação foi o gene da  $\beta$ -actina (NM 001101). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em triplicata para cada amostra segundo as condições descritas e os primers utilizados em cada gene encontram-se descritos abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Lista de primers usados na reação de qPCR em tempo real

Gene	Primer	Sequencia (5' - 3')	T.A. (°C)	Produto (pb)
<i>CYBB</i> (gp91phox)	<i>Foward</i>	TTGTGGAAACCCTCCTATGA	55.73	80
	<i>Reverse</i>	AAAACCGCACCAACCTCTCA	60.11	
<i>CYBA</i> (p22phox)	<i>Foward</i>	ATGTGGGCCAACGAACAG	57.92	141
	<i>Reverse</i>	GTACTCCAGCAGGCACACAA	60.25	
<i>NCF1</i> (p47phox)	<i>Foward</i>	CCTCTTTCCAGTGCATTTAAGG	57.29	91
	<i>Reverse</i>	GATGTGACGGATGAAGGTGTC	58.73	
<i>NCF2</i> (p67phox)	<i>Forward</i>	CGGACAAGAAGGACTGGAAG	57.91	117
	<i>Reverse</i>	GGAAGTAAGCCACTGCCAAG	58.83	
<i>NCF4</i> (gp40phox)	<i>Foward</i>	GGCCGAGAGTGACTTTGAAC	58.85	113
	<i>Reverse</i>	TCACCTCGATGACGAAAACA	57.20	
<i>CXCL10</i>	<i>Foward</i>	GAATCGAAGGCCATCAAGAA	60.16	119
	<i>Reverse</i>	CCTCTGTGTGGTCCATCCTT	59.96	
<i>IRF1</i>	<i>Foward</i>	GGAGGAGCCAGAAATTGACA	60.20	224
	<i>Reverse</i>	TCTCTGCACCATATCCACCA	60.07	
<i>IFI44L</i>	<i>Foward</i>	AACTGGACCCCATGAAGGAT	60.58	126
	<i>Reverse</i>	CAGGGCTGTAACGCTCTCTC	60.16	
<i>ACTB</i>	<i>Foward</i>	TCACCGAGCGCGGCT	61.21	60
	<i>Reverse</i>	TAATGTCACGCACGATTTCCC	59.00	

T.A. Temperatura de anelamento; pb, par de base.

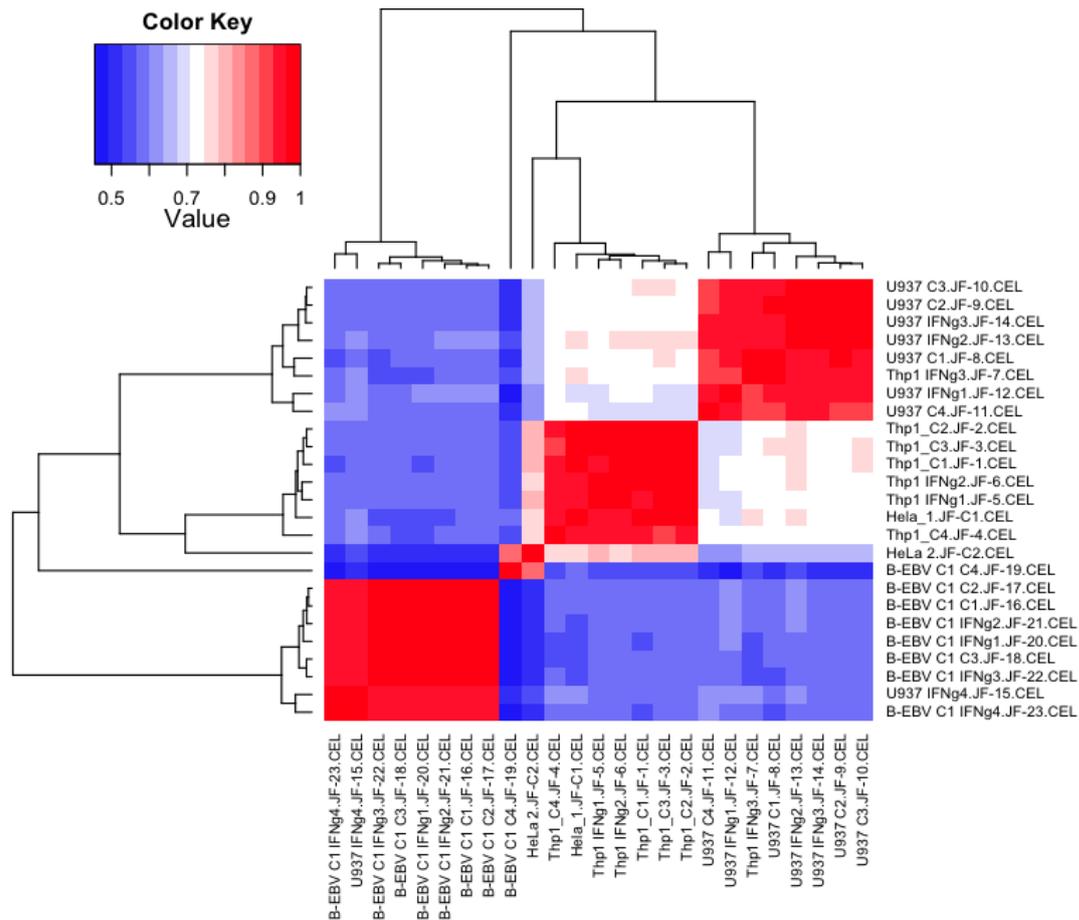
## 6.4 Resultados

### 6.4.1 Análise do WT microarray

Previamente a análise dos dados dos genes de interesse do nosso estudo procuramos foi realizada a verificação dos valores da intensidade de sinal das probes dos chips utilizados nos ensaios de *microarrays*. Os dados apontam que os valores encontrados para cada amostra apresentam igualmente distribuídos, preenchendo os requisitos de controle do experimento e possibilitando a análise subsequente dos sets de probes gene específico (dados não mostrados).

Na sequência, foi realizada a normalização dos valores de intensidade encontrados nos chips de GeneArray para cada amostra testada. Os valores médios encontrados de intensidade apresentam uma distribuição dos seus valores ao redor do índice 6 de sinal e 25 de intensidade para todos os resultados adquiridos. Para prosseguir com as análises se fez necessário a realização da normalização dos valores encontrados em cada amostra testada. Após as correções de normalidade nos dados adquiridos, os dados passaram a serem expressos com uma distribuição normal mantendo-se os valores médios de intensidade com valores médios de intensidade ao redor do índice 6 de sinal e 25 de intensidade para todos os resultados adquiridos (dados não mostrados).

Posteriormente às normalizações dos dados adquiridos, foi realizada em todos os valores adquiridos uma análise de similaridade para os genes que foram detectados com expressão alterada em células THP1, U937 e GM12878 tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  nos *arrays*. A análise demonstra que os tipos celulares diferentes encontram-se agrupados próximos uma das outras e resultados similares dentro do grupo de células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$ , demonstrando assim uma similaridade de expressão gênica global por tipo celular (Figura 20).



**Figura 20.** Análise de similaridade de genes detectados nos ensaios GeneArray: Através dos resultados encontrados as células tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$  puderam ser agrupadas, demonstrando dessa forma uma grande similaridade no nível global de expressão gênica entre as amostras (n=3).

Foi dada continuidade às nossas análises passando então a expressão gênica de genes individuais a ser avaliada comparando células não tratadas com células tratadas com IFN- $\gamma$ . Analisando células THP1, dentre os 576 transcritos detectados com modificação em níveis de expressão entre células não tratadas comparado com células tratadas com IFN- $\gamma$ , 216 (37,5%) representam genes com isoformas, pseudogenes ou formas variantes e 8 (1,38%) representam regiões não codantes de (ncRNA). Destacamos na tabela abaixo alguns genes que se mostraram interessantes para nosso estudo (Tabela 5) em células THP1.

**Tabela 5:** Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$  em células THP1.

Gene	Símbolo do Gene	Fold Change
<b>Genes Relacionados a Transcrição</b>		
Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	ID3	2.99
Signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	1.84
Interferon regulatory factor 4	IRF4	9.64
Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 15	PARP15	2.48
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2	GNG2	7.13
<b>Genes Relacionados ao Splicing</b>		
RNA, U4 small nuclear 1B / RNA, U4 small nuclear 1	RNU4-1B / RNU4-1	1.76
Small nucleolar RNA host gene 3 (non-protein coding) / Small nucleolar RNA, H/ACA box 73A	SNHG3 / SNORA73A	1.59
Small nucleolar RNA, C/D box 45C	SNORD45C	1.68
Small nucleolar RNA, C/D box 3D / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 / Small nucleolar RNA, C/D box 3A / Small nucleolar RNA, C/D box 3C	SNORD3D / SNORD3B-1 / SNORD3B-2 / SNORD3A / SNORD3C	1.53
Small nucleolar RNA, C/D box 3D / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 / Small nucleolar RNA, C/D box 3A / Small nucleolar RNA, C/D box 3C	SNORD3D / SNORD3B-1 / SNORD3B-2 / SNORD3A / SNORD3C	1.53
Small nucleolar RNA, C/D box 3D / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 / Small nucleolar RNA, C/D box 3A / Small nucleolar RNA, C/D box 3C	SNORD3D / SNORD3B-1 / SNORD3B-2 / SNORD3A / SNORD3C	1.53
Small nucleolar RNA, C/D box 3D / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 / Small nucleolar RNA, C/D box 3A / Small nucleolar RNA, C/D box 3C	SNORD3D / SNORD3B-1 / SNORD3B-2 / SNORD3A / SNORD3C	1.53
Small nucleolar RNA, C/D box 3D / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 / Small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 / Small nucleolar RNA, C/D box 3A / Small nucleolar RNA, C/D box 3C	SNORD3D / SNORD3B-1 / SNORD3B-2 / SNORD3A / SNORD3C	1.53
Adenosine deaminase	ADA	2.02
Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	SLC25A4	1.51
Elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	2.15
Zinc finger CCCH-type containing 12C	ZC3H12C	1.96
RNA binding protein with multiple splicing 2	RBPM2	2.46
Elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	2.08
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	ARHGEF10	2.52
RNA binding protein with multiple splicing 2	RBPM2	2.46
<b>Genes de Fatores de Transcrição</b>		
Tumor protein p53	TP53	2.11
Zinc finger, matrin type 3	ZMAT3	3.77
Activation-induced cytidine deaminase	AICDA	7.19
<b>Genes Relacionados ao TNF-<math>\alpha</math></b>		
TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	4.23
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9	1.90
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	TNFSF4	3.21
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	1.60
TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	3.40

Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	TNFRSF8	1.57
Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	FAZ	2.45
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFKB2	1.65
CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	1.76
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	1.54
Transmembrane 6 superfamily member 1	TM6SF1	1.53
Corticotropin releasing hormone receptor 1	CRHR1 / MGC57346	3.04
Ectodysplasin A2 receptor	EDA2R	2.04
Genes com <i>Splicing</i> Alternativo		
Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	1.61
Interferon, gamma-inducible protein 30	IFI30	1.82
Interferon-induced protein 44-like	IFI44L	1.69
Interleukin 2 receptor, gamma	IL2RG	4.29
Non-protein coding RNA 173	NCRNA00173	1.57
Corticotropin releasing hormone receptor 1	CRHR1 / MGC57346	3.04
Interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	1.55

Em células U937 a análise da expressão gênica de genes individuais comparando células não tratadas com células tratadas com IFN- $\gamma$  demonstrou a detecção de 460 transcritos com alteração em níveis de expressão, dentre elas 160 (34,78%) representam genes com isoformas, pseudogenes ou formas variantes e 25 (5,43%) representam regiões não codantes de RNA (ncRNA). Destacamos na tabela abaixo alguns genes que se mostraram interessantes para nosso estudo (Tabela 6) em células U937.

**Tabela 6:** Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$  em células U937.

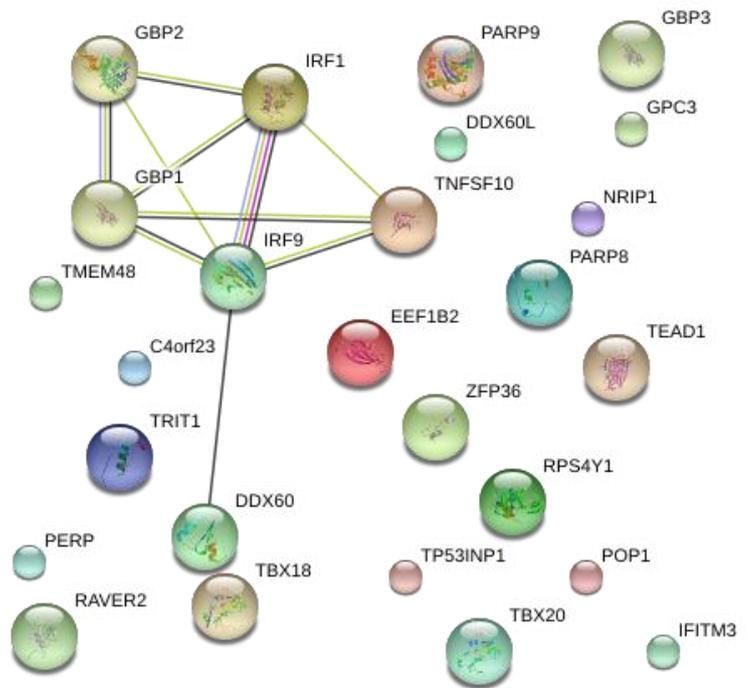
Gene	Símbolo do Gene	Fold Change
Genes Relacionados à Transcrição		
TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	TEAD1	3.10
Zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	ZFP36	1.78
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.71
Interferon regulatory factor 9	IRF9	1.60
Genes Relacionados ao <i>Splicing</i>		
RNA, U4 small nuclear 2	RNU4-2	1.92
Small nucleolar RNA, H/ACA box 41	SNORA41	2.01
Nuclear receptor interacting protein 1	NRIP1	3.54
Processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )	POP1	1.77
Ribosomal protein S4, Y-linked 1	RPS4Y1	6.18
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	DDX60	1.52
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	DDX60L	1.82
Genes de Fatores de Transcrição		
T-box 18	TBX18	9.40
PERP, TP53 apoptosis effector	PERP	1.74
Genes Relacionados ao TNF- $\alpha$		
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	1.73
Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF	1.92
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	1.73
Genes com <i>Splicing</i> Alternativo		
Glypican 3	GPC3	5.24
Ribonucleoprotein, PTB-binding 2	RAVER2	-1.54
tRNA isopentenyltransferase 1	TRIT1	1.70
Transmembrane protein 48	TMEM48	1.54
Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	PARP9	1.61
Chromosome 4 open reading frame 23	C4orf23	-1.53
Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	PARP8	2.47
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.71
T-box 20	TBX20	2.03
Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	TP53INP1	1.88
Glypican 3	GPC3	5.24
Ribosomal protein S4, Y-linked 1	RPS4Y1	6.18
Guanylate binding protein 3, 1, Interferon-inducible, 67kDa	GBP3/GBP1	1.50
Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	GBP2	1.98
Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	IFITM3	4.72

Em células GM12878, a análise da expressão gênica de genes individuais comparando células não tratadas com células tratadas com IFN- $\gamma$  demonstrou a detecção de 578 transcritos com alteração em níveis de expressão, dentre elas 216 (37,37%) representam genes com isoformas, pseudogenes ou formas variantes e 20 (3,46%) representam regiões não codantes de RNA (ncRNA). Destacamos na tabela abaixo alguns genes que se mostraram interessantes para nosso estudo (Tabela 7) em células B-EBV.

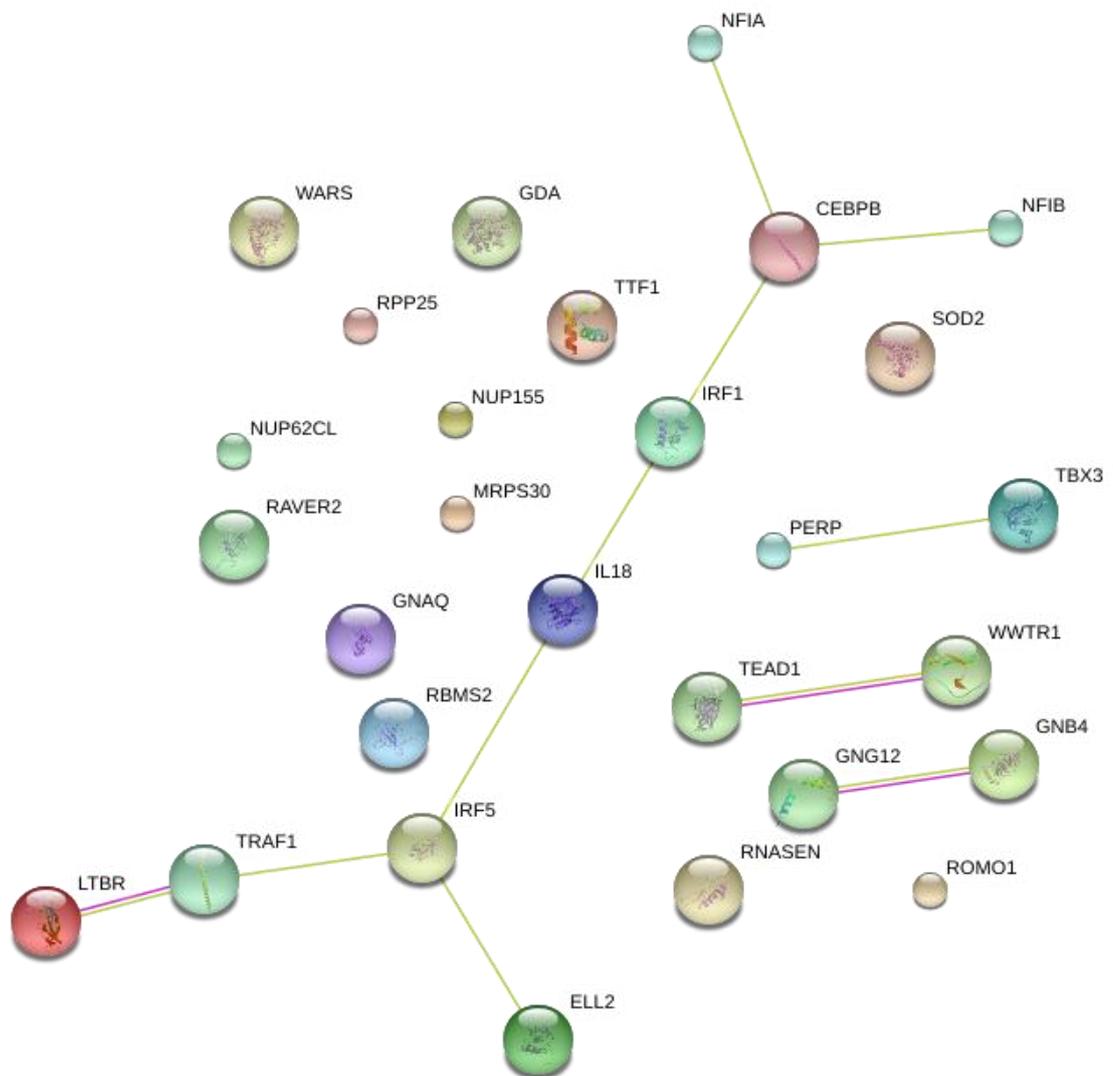
**Tabela 7:** Genes detectados por GeneArray com modificação detectadas em níveis de expressão de interesse ao projeto que se mostraram alteradas mediante a tratamento com IFN- $\gamma$  em células GM12878.

Gene	Símbolo do Gene	Fold Change
<b>Genes Relacionados a Transcrição</b>		
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	GNG12	6.07
TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	TEAD1	2.88
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	1.62
WW domain containing transcription regulator 1	WWTR1	3.78
Guanine deaminase	GDA	4.35
Guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	GNAQ	3.98
Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	GNB4	1.93
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.88
Nuclear factor I/A	NFIA	5.88
Transcription termination factor, RNA polymerase I	TTF1	1.81
Tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	1.52
Interferon regulatory factor 1	IRF1	1.88
Transcription termination factor, RNA polymerase I	TTF1	1.81
Nucleoporin 62kDa C-terminal like	NUP62CL	1.91
Interferon regulatory factor 5	IRF5	1.58
Nucleoporin 155kDa	NUP155	1.59
<b>Genes Relacionados ao Splicing</b>		
RNA, U5E small nuclear	RNU5E	2.72
Elongation factor, RNA polymerase II, 2	ELL2	1.59
Small nucleolar RNA, H/ACA box 23	SNORA23	1.53
RNA binding motif, single stranded interacting protein 2	RBMS2	1.84
Ribonuclease P RNA component H1	RPPH1	1.87
Ribonuclease P/MRP 25kDa subunit	RPP25	2.68
Small nucleolar RNA, C/D box 12C	SNORD12C	1.86
Mitochondrial ribosomal protein S30	MRPS30	1.72
Nuclear factor I/B	NFIB	5.81
Ribonucleoprotein, PTB-binding 2	RAVER2	3.76
Ribonuclease type III, nuclear	RNASEN	1.75
<b>Genes de Fatores de Transcrição</b>		
PERP, TP53 apoptosis effector	PERP	3.75
T-box 3	TBX3	2.03
<b>Genes Relacionados ao TNF-<math>\alpha</math></b>		



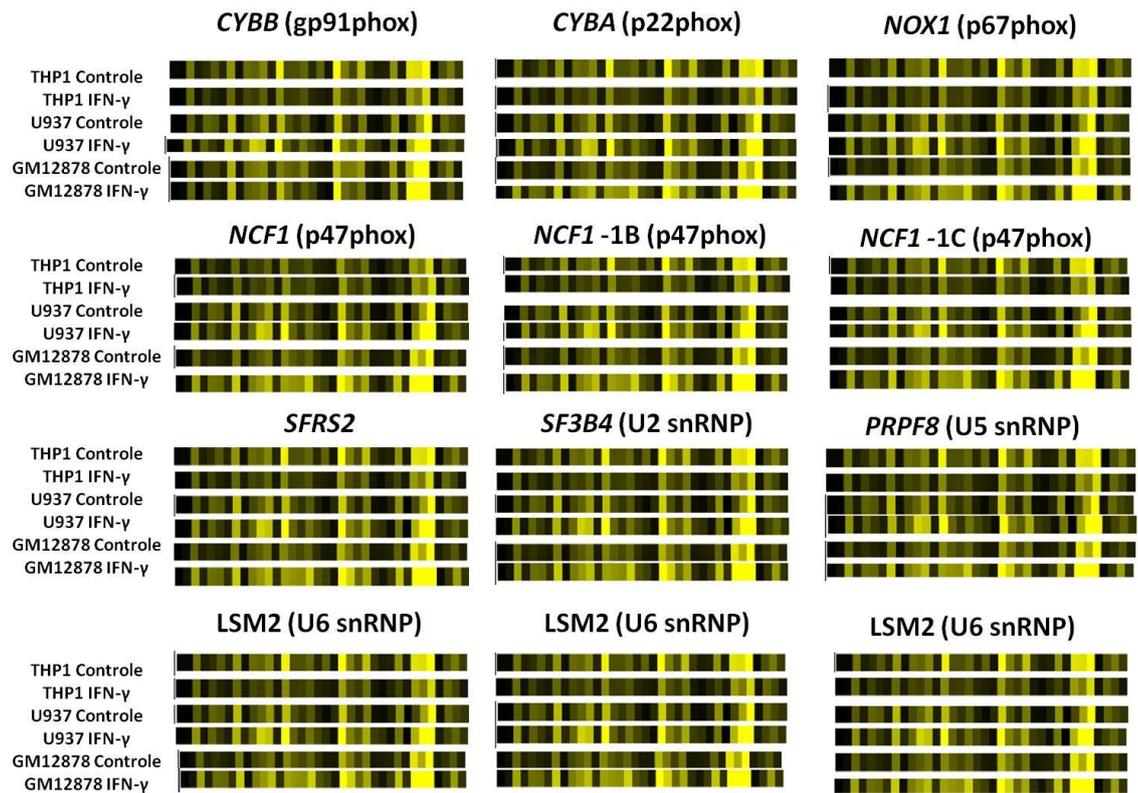


**Figura 22.** Mapa de interações prevista pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 6 em células U937.



**Figura 23.** Mapa de interações previsto pelo STRING-Database dos genes destacados na tabela 7 em células GM12878.

Passamos então a focar nossas atenções para os diferentes sets de probes de *microarray* para os genes da NADPH oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NCF4*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (splicing factor arginine/serine-rich 2 - *SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*) para analisar as alterações provocadas pelo IFN- $\gamma$  em células THP1, U937 e GM12878. Os dados resultantes da nossa análise de clusters feito através do programa dChip demonstra que o IFN- $\gamma$  causa alterações na expressão de diferentes probes dentro dos genes escolhidos para esta análise ao comparar as amostras de células THP1, U937 e GM12878 (Figura 24)

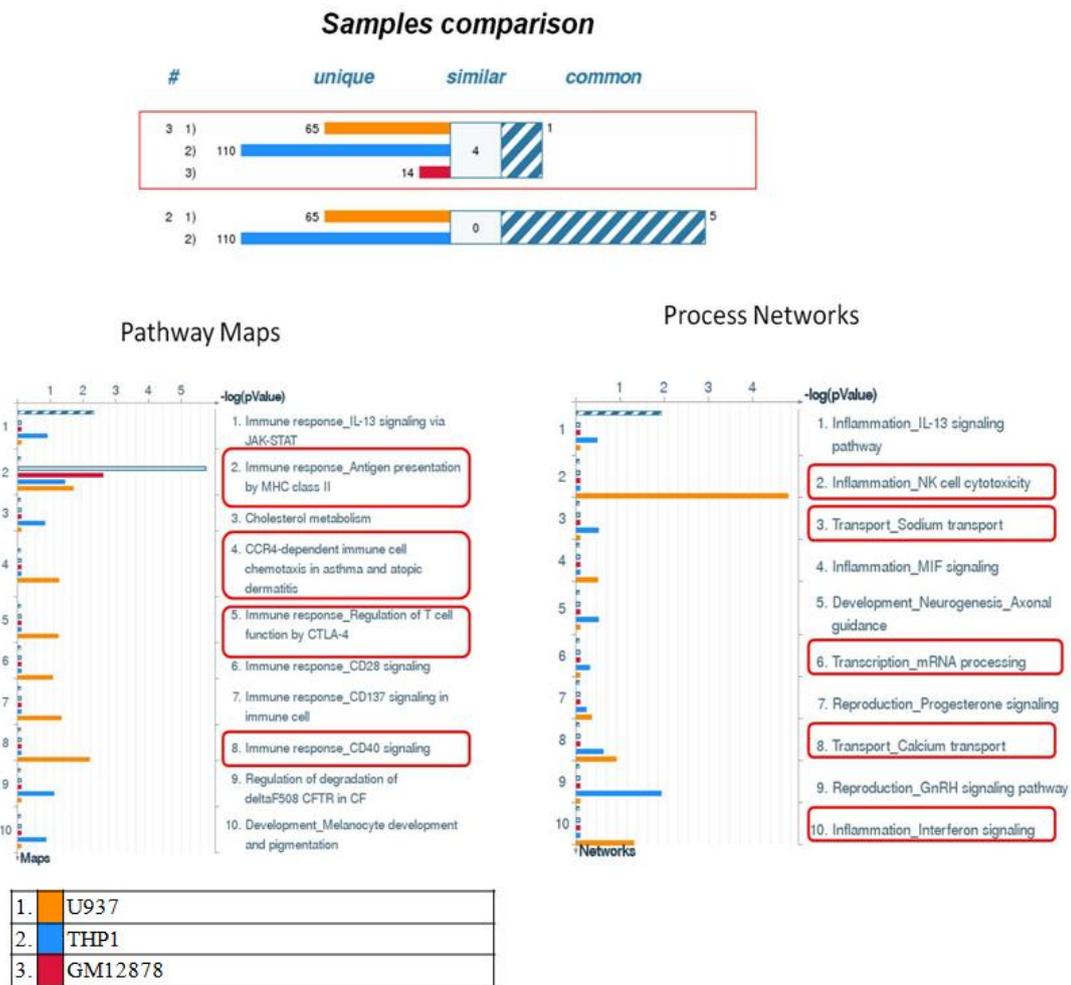


**Figura 24.** Análise de clusters e comparação de amostras em células THP1, U937 e GM12878 através do dChip dos dados obtidos com o *WT Gene Array*. Identificamos uma alterações na expressão dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NOX1*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (*SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*).

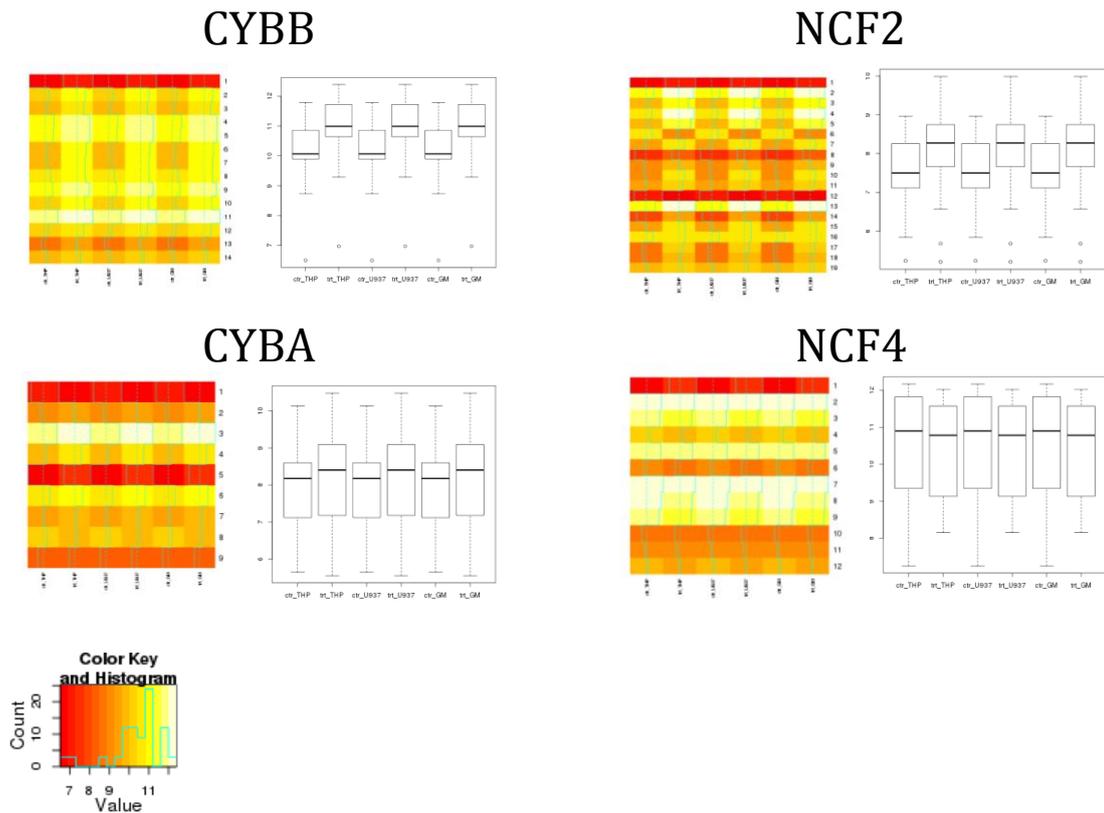
Os dados provenientes de análise comparativa dos genes que responderam ao estímulo do IFN $\gamma$  contidos nos resultados adquiridos entre as células de linhagem U937, THP1 e GM12878 por meio do *WT GeneArray* (Figura 25) indicam que há apenas um gene comum e 4 genes similares aos 3 tipos celulares. Podemos identificar 65, 110 e 14 genes que únicos às linhagens U937, THP1 e GM12878 respectivamente. Quando analisamos as principais vias ativadas podemos identificar a indução de genes importantes relacionados à apresentação de antígeno pelo MHC II, quimiotaxia dependente de CCR4 (processo relacionado a Asma e a dermatite atópica), regulação da função da resposta imunologica de células T por intermédio de CTLA4 e resposta imunologica relacionado a sinalização do CD40. Em processos celulares fomos capaz de identificar a ativação dos seguintes processos: inflamação (citogenicidade mediado por células NK e sinalização mediado pelo IFN), transporte (de sódio e calcio) e transcrição (processamento do mRNA).

As análises dos dados referentes ao sistema NADPH oxidase em células U937, THP1 e GM12878 (Figura 26) demonstraram que houve forte indução dos genes *CYBB* e *NCF2*, uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA* e pouca alteração de expressão do gene *NCF4* quando estas células eram estimuladas pelo IFN $\gamma$ . Não fomos capazes de analisar os dados referente a expressão do gene *NCF1* por causa de *probesets* não confiáveis para este gene. Os valores encontrados para cada tipo celular são equiparáveis entre si.

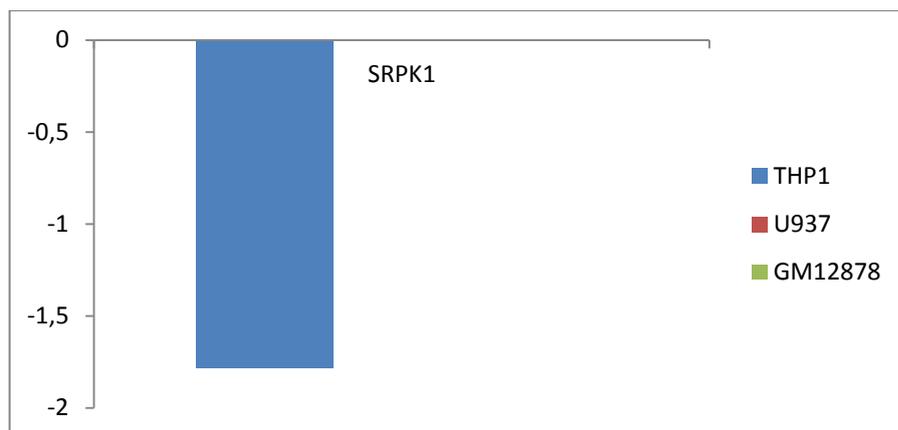
Quando analisamos os genes relacionados ao processo de *splicing*, podemos identificar uma diminuição da expressão do gene *SRPK1* apenas em células THP1 (Figura 27). A serina/treonina-proteína-quinase SRPK1 (Entrez Gene: *SRPK1* SFRS protein kinase 1, Gene ID: 6732) é uma enzima que, em seres humanos é codificada pelo gene *SRPK1* (80, 81) Este gene codifica uma serina/arginina proteína-quinase específica para o SR (domínio rico em serina/arginina) a família de fatores de *splicing*, cuja proteína apresenta localização no núcleo e no citoplasma. Acredita-se que desempenham um papel na regulação de *splicing* alternativo tanto constitutiva quanto reguladora da localização intracelular dos fatores de *splicing*. O *splicing* alternativo deste gene resulta em múltiplas variantes de transcritos. Outras variantes de *splicing* alternativo de transcritos foram descritas para este gene, porém seus comprimentos totais não foram determinados. Há relatos que demonstram interações do *SRPK1* com SNRP70 (82, 83) e ASF/SF2 (82, 84-86). Nossos dados baseados nos mapas de interação montados pelo GeneGo demonstraram que a diminuição da expressão do *SRPK1* interfere com a expressão dos genes *SFRS1* (SP2), *SFRS2* (SC35), *SFRS3*, *SFRS12*, *SRrp25*, *SRrp40*, *SRrp55*,  $\gamma$ T521 e *DOX17PABPC1* (Figura 28).



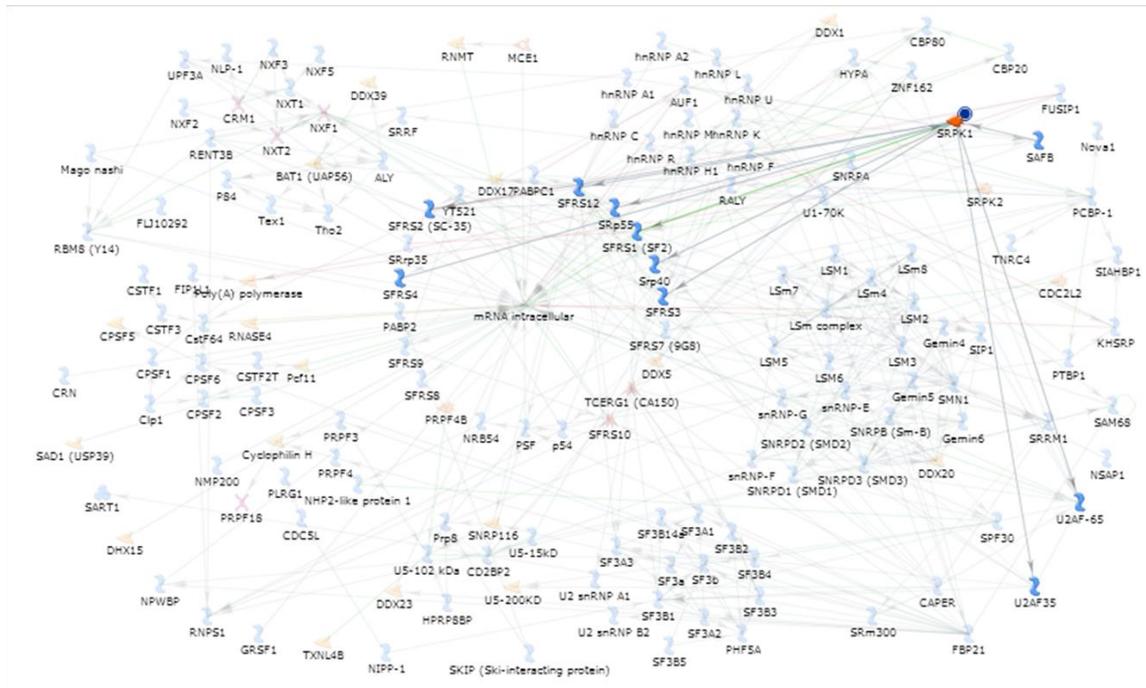
**Figura 25.** Comparação dos dados adquiridos por meio do WT GeneArray em células THP1, U937 e GM12878: Estão representados os resultados de comparação de todos os resultados e os que estão presentes em vias funcionais e em redes de processos celulares. A interseção dos dados adquiridos é definido como comum e representado como barra em linhas branca e azul. Os genes únicos de cada tipo celular estão representados em barras coloridas. Os dados considerados similares estão presentes em todos exeto um dos dados.



**Figura 26.** Análise dos dados referente à expressão dos genes do sistema NADPH oxidase em células U937, THP1 e GM12878: As análises dos dados revelaram um aumento de expressão dos genes *CYBB* e *NCF2* e uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA* em células U937, THP1 e GM12878.



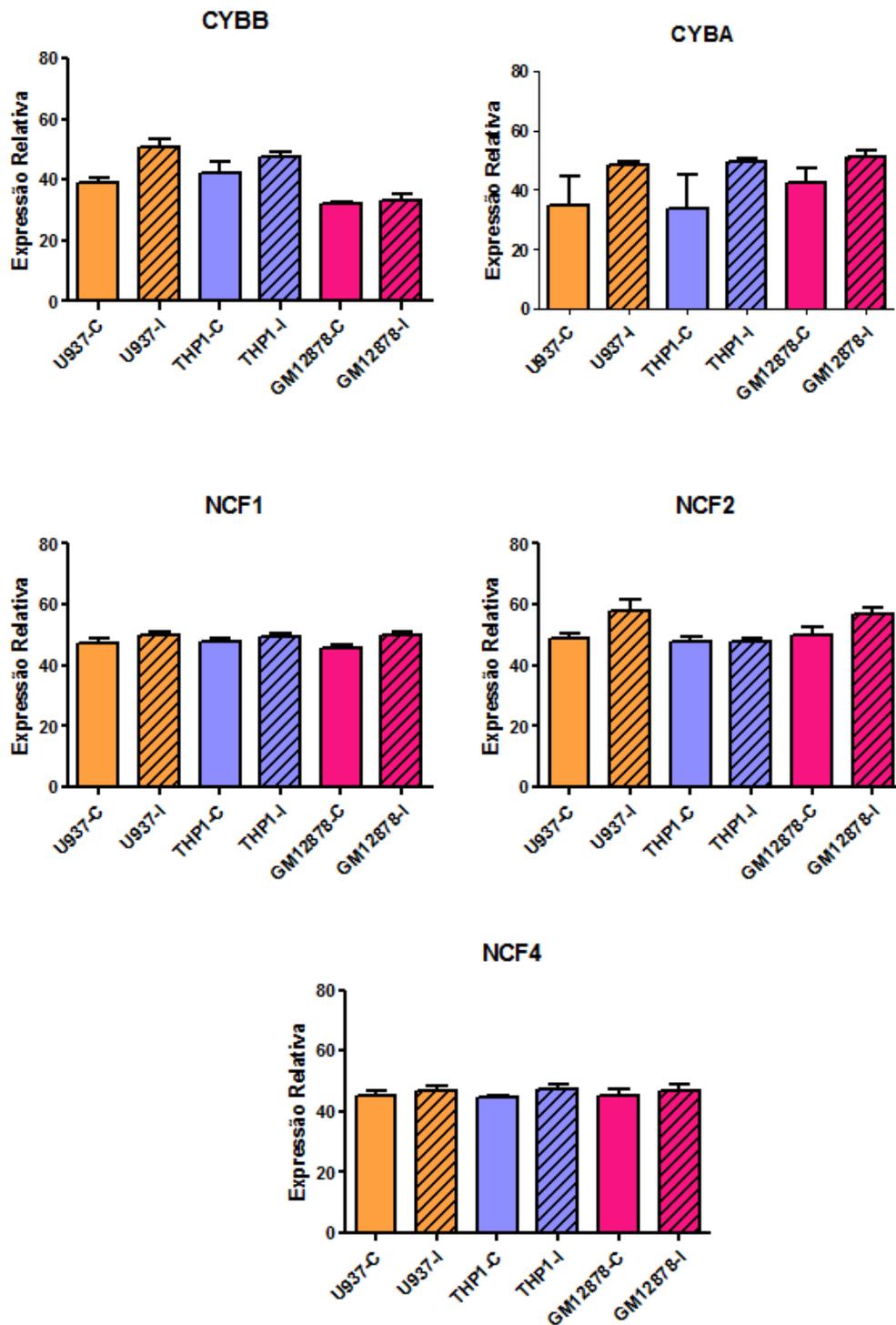
**Figura 27.** Análise dos genes relacionados ao processo de splicing induzidos pelo IFN $\gamma$  em células U937, THP1 e GM12878: As análises dos dados revelaram uma diminuição de expressão do genes SRPK1 apenas em células THP1.



**Figura 28.** Análise funcional da rede de interações dos genes que se demonstraram induzidos pelo IFN $\gamma$  em células U937, THP1 e GM12878 e que são relacionados ao processo de *splicing*: As análises dos dados revelaram que a diminuição da expressão do gene *SRPK1* interfere com a expressão dos genes *SFRS1* (SP2), *SFRS2* (SC35), *SFRS3*, *SFRS12*, *SRrp25*, *SRrp40*, *SRrp55*,  $\gamma$ *T521* e *DOX17PABPC1*.

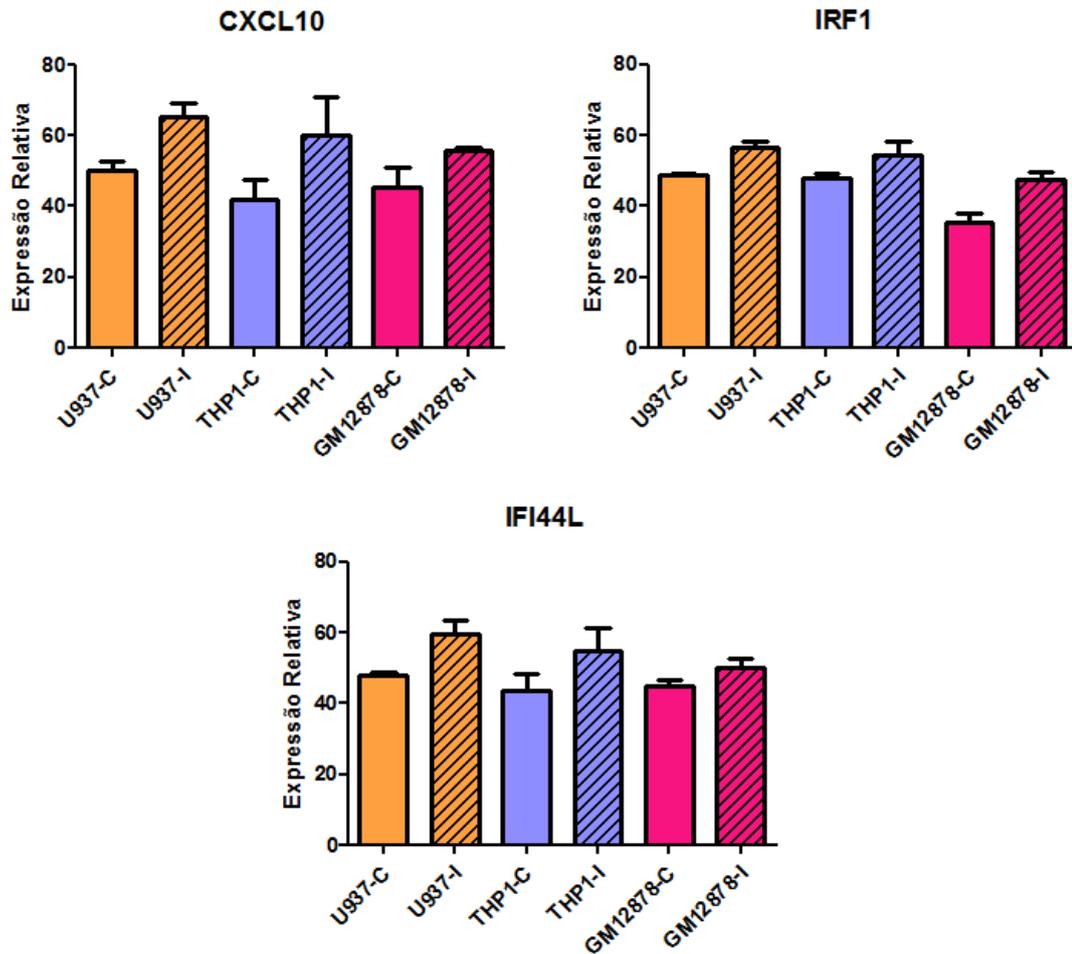
#### 6.4.2 Validação dos resultados de microarrays

Continuamos nossa análise com os ensaios de avaliação da expressão gênica através dos ensaios de *Real-Time* para genes do sistema NADPH oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF2*, *NCF1* e *NCF4*) em células U937, THP1 e GM12878. Foi possível observar que o tratamento com IFN- $\gamma$  causou uma tendência a aumento na expressão gênica de todos os componentes do sistema NADPH-oxidase em todas as células analisadas tendo em vista que os dados encontrados não pode ser considerado estatisticamente significante (Figura 29).



**Figura 29.** Análise da expressão gênica do sistema NADPH-oxidase por Real-Time PCR em células U937, THP1 e GM12878: Através dos resultados encontrados podemos observar um aumento da expressão gênica mediante a tratamento in vitro de IFN- $\gamma$  em todas as células analisadas (n=3).

Visando testar a indução do IFN- $\gamma$  testamos a expressão gênica de genes conhecidamente induzidos por esta citocina (*CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L*) em células U937, THP1 e GM12878. Os resultados encontrados confirmam a indução do IFN- $\gamma$  mediante ao aumento de expressão gênica encontrada para estes genes em todas as células analisadas (Figura 30) apesar dos dados sem significância estatística encontrada.



**Figura 30.** Análise da expressão gênica dos genes *CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L* por Real-Time PCR em células U937, THP1 e GM12878: Os resultados encontrados confirmam a indução do IFN- $\gamma$  mediante ao aumento de expressão gênica encontrada para estes genes em todas as células analisadas (n=3).

## 6.5 Sumário dos resultados

Os dados adquiridos com os *microarrays* demonstram que o tratamento *in vitro* com IFN- $\gamma$  afetou a expressão de genes que apresentam isoformas, pseudogenes ou formas variantes em 37,5% dos genes detectado em células THP1, em 34,78% em células U937 e 37,37% em células GM12878. Identificamos também a indução de sequências que representam regiões não codantes de RNA (ncRNA) em todas as células analisadas.

As análises dos dados focados no sistema NADPH oxidase em células U937, THP1 e GM12878 revelaram uma indução dos genes *CYBB* e *NCF2* e uma tendência a aumento de expressão do gene *CYBA* quando estas células são estimuladas pelo IFN $\gamma$ .

As análises dos dados focados no processo de *splicing* nos possibilitaram identificar alteração de expressão, provocados pelo tratamento *in vitro* de IFN- $\gamma$ , nos genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*) por comparação de clusters. Ao analisarmos os genes relacionados ao processo de *splicing* identificamos uma diminuição da expressão do gene *SRPK1* apenas em células THP1 e essa diminuição de expressão de acordo com os mapas de interação gerados pelo GeneGo, é capaz de interferir na expressão dos genes *SFRS1* (SP2), *SFRS2* (SC35), *SFRS3*, *SFRS12*, *SRrp25*, *SRrp40*, *SRrp55*,  *$\gamma$ T521* e *DOX17PABPC1*.

Os dados adquiridos por meio de *Real-Time PCR* visando a validação dos dados obtidos para os genes do sistema NADPH oxidase demonstraram uma indução pequena na expressão gênica de todos os componentes do sistema NADPH-oxidase em todas as células analisadas no entanto, observamos que o IFN- $\gamma$  causou aumento de expressão gênica de genes conhecidamente induzidos por esta citocina (*CXCL10*, *IRF1* e *IFI44L*) nas células analisadas.

## 7 CAPÍTULO 3 – Análise em células Murinas

### 7.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desta terceira etapa deste estudo é investigar o efeito do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  sobre eventos pós-transcricionais relativos à expressão e regulação do gene *CYBB* em neutrófilos extraídos da medula óssea de camundongos.

### 7.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ :

1. Produzido fisiologicamente e estimulado por diferentes preparos de Tioglicolatos afetam a produção e número de neutrófilos ativados no compartimento da medula óssea e no peritônio de camundongos;
2. É capaz de causar modificação na expressão dos genes do sistema NADPH oxidase através da modificação de padrões de expressão desses transcritos em neutrófilos purificados da medula óssea em camundongos quando estimulados de forma *in vitro*.

## 7.3 Materiais e Métodos

### 7.3.1 Ativação de Neutrófilos Murinos com $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ produzidos fisiologicamente

Neutrófilos murinos recuperados a partir do fêmur e tibia (Medula óssea - MO) e da cavidade peritoneal (P) de camundongos com idade entre 8- a 14-semanas de idade induzidos de forma intraperitoneal (*ip*) com tioglicolato envelhecido, com tioglicolato recém-preparado ou com PBS (grupo controle). O modelo de peritonite foi empregado conforme previamente descrito por Subramanian em 2007 (87) utilizando camundongos B57/BL6 *Wild-type* ( $n = 3$ ). Os mesmos foram separados em 3 grupos de acordo com o tipo de estímulo utilizado: o primeiro recebeu injeção intraperitoneal (*ip*) de PBS que serviu como nosso controle, os dois grupos experimentais receberam ou 1 mL de tioglicolato envelhecido (*Aged TGM*) ou recém-preparado (*Fresh TGM*) à 3% (Sigma) em água destilada. Após 4 horas de indução no (dia 0) ou por 5 dias (dia 5) com injeção de tioglicolato, Os camundongos foram eutanizados com  $CO_2$ , e as células do exudato peritoneal exudate foram recuperados.

As células recuperadas foram lavadas uma vez com PBS e centrifugadas em gradiente Histopaque (1077) por 30 minutos à 700 g conforme indicação do fabricante. O pellet foi lavado em uma solução de água gelada e PBS (v/v) e preparadas para separação magnética com seleção negativa de utilizando anticorpos anti-CD5, anti-CD4, anti-CD45R/B220, anti-Terr119, anti-F4/80, anti CD11c, anti-cKit e anti DX5 de acordo com as instruções do fabricante (19709 - EasySep Mouse Neutrophil Negative selection Kit, StemCell Technologies Inc.). A porcentagem de Neutrófilos adquiridos na população total foi determinada através da análise microscópica (identificação morfológica de neutrófilos) em lamina de células citocentrifugadas e marcadas com Wright-Giemsa (88) apresentando valores superiores a 95% e posteriormente avaliadas por FACS com os anticorpos monoclonais anti-CD11b marcado com FITC (BD Bioscience) e anti-7/4 marcado com Alexa-Fluor 568 (AbD SeroTec).

O Tioglicolato (*TGM*) empregado no ensaio é uma mistura de polisacarídeos que tem sido amplamente usado por décadas para induzir peritonitis, provendo informações importantes sobre os estágios iniciais da inflamação. Os resultados encontrados por vários grupos demonstram que os produtos finais da glicação avançada (AGEs –Advanced Glycation Endproducts) são agentes quimioatrativos (89), and mitogenicos para os macrófagos (90) e podem estimular os macrófagos e linfócitos a produzirem citocinas e fatores de crescimento dentre eles encontram-se o  $TNF-\alpha$  (91) e o  $IFN-\gamma$  (92), sendo estes marcadamente maiores em indução com tioglicolato envelhecido.

### 7.3.2 RNA-Seq

Os ensaios de *RNA-Seq* foram desenvolvidos durante o período de estágio na University of Massachusetts Medical School sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Newburger em colaboração com os grupos dos pesquisadores Prof Dr Sherman Weisman (Yale University) e Prof Dr Michael Snyder (Stanford University) conforme carta descrevendo a colaboração (Anexo A).

Neutrófilos murinos recuperados a partir do fêmur e tíbia (MO) de camundongos C57/BL6 com idade entre 8- a 14-semanas de idade, lavadas uma vez com PBS e centrifugadas em gradiente Histopaque (1077) por 30 minutos à 700 g conforme indicação do fabricante. O pellet foi lavado em uma solução de água gelada e PBS (v/v) e preparadas para separação magnética com seleção negativa de utilizando anticorpos anti-CD5, anti-CD4, anti-CD45R/B220, anti-Terr119, anti-F4/80, anti CD11c, anti-cKit e anti DX5 de acordo com as instruções do fabricante (19709 - EasySep Mouse Neutrophil Negative selection Kit, StemCell Technologies Inc.). A porcentagem de Neutrófilos adquiridos na população total foi determinada através da análise microscópica (identificação morfológica de neutrófilos) em lamina de células cito centrifugadas e marcadas com Wright-Giemsa (88). As células foram posteriormente induzidas de forma *in vitro* com IFN- $\gamma$  e LPS por 2 h. Células não tratadas serviram como nosso grupo controle e passaram por uma extração de RNA total ( $5 \times 10^6$  células/ml) através do reagente TRIZOL.

Após a separação de RNA, as amostras de RNA foram encaminhadas para o laboratório do Prof Dr Sherman Weisman (Yale University) para o preparo das bibliotecas de cDNA utilizando 1-10  $\mu$ g de RNA total e posteriormente encaminhadas para o laboratório do Prof Dr Michael Snyder (Stanford University) para serem sequenciados.

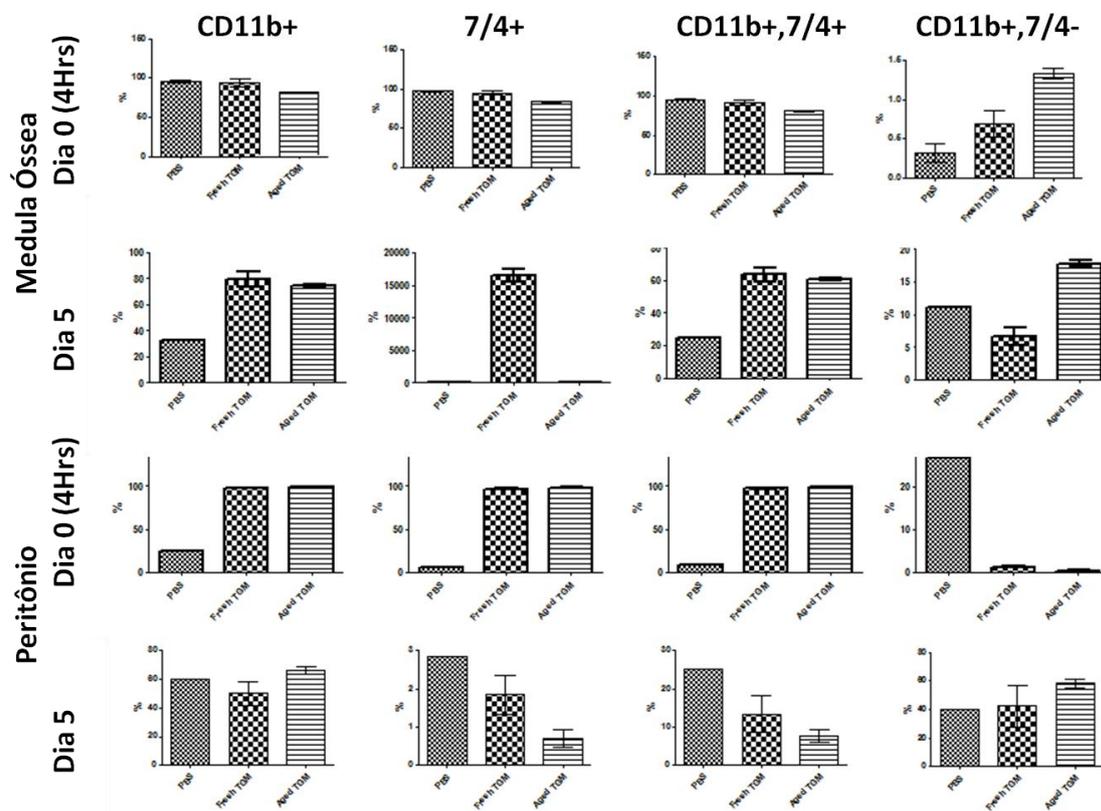
## 7.4 Resultados

### 7.4.1 Ativação Fisiológica de Neutrófilos Murinos com $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$

Os resultados encontrados através da análise da expressão das moléculas CD11b e 7/4 por citometria de fluxo em células da medula óssea no dia 0 (4hrs de estimulação) demonstraram que o número de células CD11b+ para os grupos PBS ( $95,5 \pm 1,9$ ) e *Fresh TGM* ( $93,6 \pm 13,9$ ) não demonstraram diferenças significativas porém ambas se mostraram maiores ( $p < 0,005$ ) que os valores encontrados para os animais induzidos com *Aged TGM* ( $81,6 \pm 12$ ), as mesmas diferenças foram encontradas para a expressão da molécula 7/4+ nos grupos PBS ( $97,7 \pm 2,43$ ), *Fresh TGM* ( $95,3 \pm 13,63$ ) e *Aged TGM* ( $84,1 \pm 11,2$ ). Para as células CD11b+,7/4+ houveram diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) entre os grupos PBS ( $95,53 \pm 3,6$ ) e *Fresh TGM* ( $91,93 \pm 14,7$ ) que demonstraram valores maiores quando comparados com *Aged TGM* ( $80,83 \pm 11,1$ ) e o inverso foi observado em células CD11b+,7/4- (PBS:  $0,33 \pm 0,37$ ; *Fresh TGM*:  $0,7 \pm 1,0$ ; *Aged TGM*:  $1,34 \pm 0,6$ ). No 5º dia de indução, houve diferenças significativas entre o PBS e os grupos induzidos com TGM. Tanto o grupo induzido com *Fresh TGM* ( $79,8 \pm 0,56$ ) quanto o *Aged TGM* ( $74,9 \pm 0,60$ ) apresentou valores maiores que o grupo induzido com PBS. ( $32,8 \pm 0,01$ ), no entanto os maiores valores encontrados para a expressão da molécula 7/4 foi no grupo que recebeu indução por *Fresh TGM* ( $16433,33 \pm 1011,6$ ) quando comparados aos outros 2 grupos (PBS:  $22,7 \pm 0,01$ ; *Aged TGM*:  $56,9 \pm 1,64$ ). O número de células CD11b+,7/4+ encontrado foi maior nos grupos que receberam TGM (*Fresh TGM*:  $63,63 \pm 0,01$ ; *Aged TGM*  $60,96 \pm 0,81$ ) que no grupo que recebeu apenas PBS ( $24,9 \pm 0,01$ ) e a presença de células CD11b+,7/4- foi maior no grupo q recebeu *Aged TGM* ( $11,1 \pm 0,02$ ) e sucessivamente menor nos grupos PBS ( $6,63 \pm 1,3$ ) e *Fresh TGM* ( $17,83 \pm 0,5$ ) (Figura 31).

Para os resultados encontrados através da análise das células da cavidade peritoneal no dia 0 (4hrs de estimulação) foi possível observar o mesmo padrão de expressão nas nos animais que receberam TGM sendo estes maiores que os encontrados no grupo que recebeu PBS para a expressão do CD11b (PBS:  $25,4 \pm 0,03$ ; *Fresh TGM*:  $97,7 \pm 0,36$ ; *Aged TGM*:  $98,66 \pm 0,15$ ), 7/4 (PBS:  $5,33 \pm 0,01$ ; *Fresh TGM*:  $96,9 \pm 0,4$ ; *Aged TGM*:  $98,56 \pm 0,15$ ) e para a quantidade de células CD11b+, 7/4+ (PBS:  $9,47 \pm 0,02$ ; *Fresh TGM*:  $97,13 \pm 0,45$ ; *Aged TGM*:  $98,63 \pm 0,15$ ). O inverso foi encontrado para o número de células CD11b+,7/4- (PBS:  $26,6 \pm 0,02$ ; *Fresh TGM*:  $1,24 \pm 0,12$ ; *Aged TGM*:  $0,45 \pm 0,14$ ), cuja quantidades maiores foram encontradas no grupo que recebeu apenas PBS sendo essas diferenças consideradas

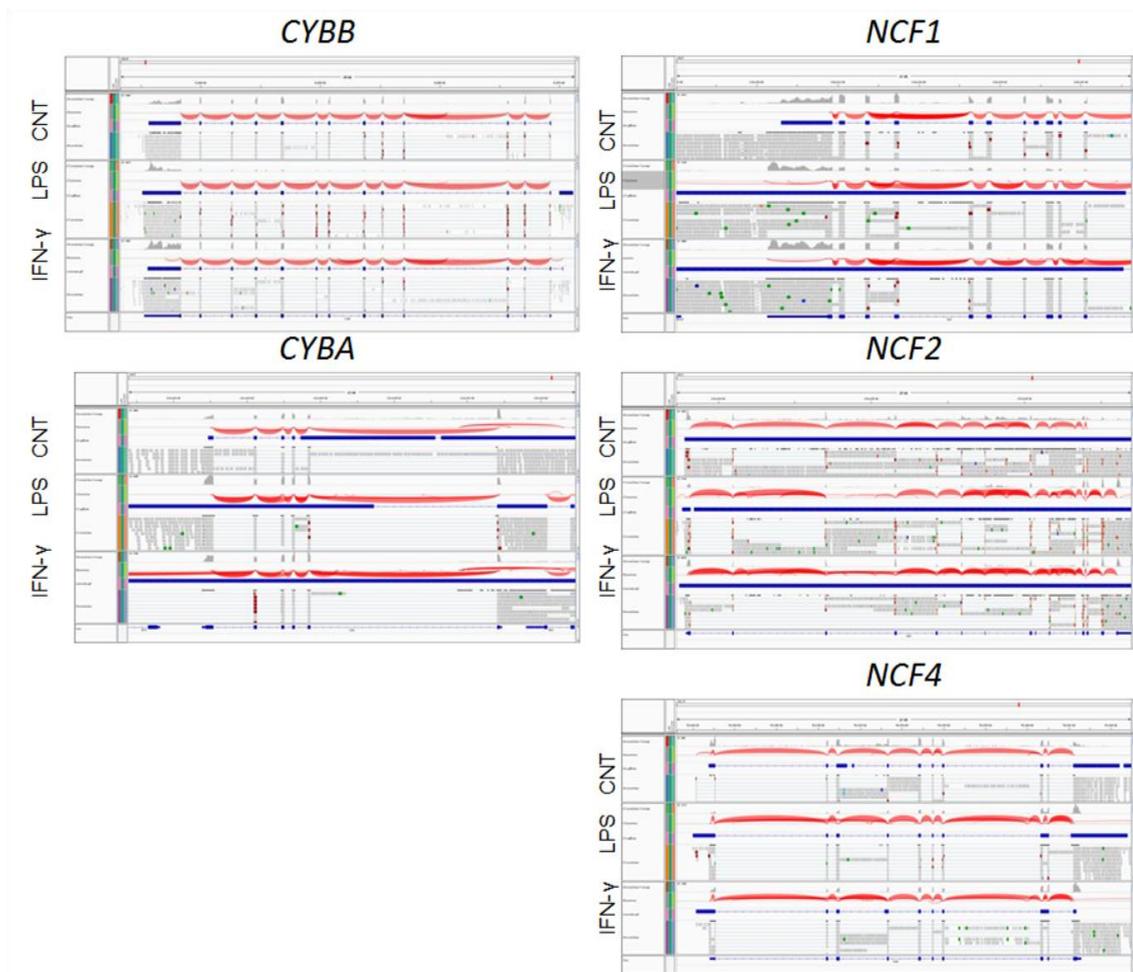
significativas. A análise do 5º dia de estimulação não demonstrou diferenças significativas para a expressão de CD11b (PBS:  $60,2 \pm 0,03$ ; *Fresh TGM*:  $50,03 \pm 8,23$ ; *Aged TGM*:  $66,43 \pm 0,2,63$ ), porém tanto a expressão de 7/4 (PBS:  $2,84 \pm 0,03$ ; *Fresh TGM*:  $1,84 \pm 0,51$ ; *Aged TGM*:  $0,7 \pm 0,24$ ) e a quantidade de células CD11b+,7/4+ (PBS:  $0,51 \pm 0,03$ ; *Fresh TGM*:  $1,22 \pm 0,1$ ; *Aged TGM*:  $0,40 \pm 0,13$ ) revelaram diferenças entre os 3 grupos sendo os valores maiores encontrados no grupo que recebeu apenas PBS e os menores foram encontrados no que recebeu indução com *Aged TGM*. Os valores encontrados para as células CD11b+,7/4- (PBS:  $40,4 \pm 0,03$ ; *Fresh TGM*:  $42,33 \pm 14,95$ ; *Aged TGM*:  $58,33 \pm 3,06$ ) são maiores no grupo que recebeu *Aged TGM* e similares entre o grupo PBS e *Fresh TGM* (Figura 31).



**Figura 31.** Expressão das moléculas CD11b e 7/4 em neutrófilos selecionados negativamente provenientes da medula óssea e da cavidade peritoneal. Os resultados mostrados demonstram diferenças na ativação dos neutrófilos perante 2 tipos diferentes de tioglicolato para as células extraídas do peritônio e da medula óssea de camundongos B57/BL6.

### 7.4.2 RNA-Seq

Os ensaios de RNA-seq realizados em Neutrófilos murinos recuperados a partir do fêmur e tibia de camundongos C57/BL6 revelaram que os genes do sistema NADPH oxidase demonstraram alteração dos padrões de splicing para todos os genes quando as células são induzidas por LPS e IFN- $\gamma$  (Figura 32).



**Figura 32.** Análise de RNA-seq para os transcritos dos genes do sistema NADPH oxidase em neutrófilos selecionados negativamente provenientes da medula óssea de camundongos C57/BL6 tratados *in vitro* com LPS e IFN- $\gamma$ : Os resultados encontrados demonstram um aumento de expressão dos genes do sistema NADPH oxidase em todos os genes induzidos por LPS e IFN- $\gamma$ . A sequência referência encontra-se representada em azul logo abaixo.

## 7.5 Súmula dos resultados

A presença do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  sob forma induzida fisiologicamente pelo tioglicolato induzem um aumento da presença de neutrófilos ativados no sítio da inflamação e influem na produção de neutrófilos e na ativação destes no compartimento da medula óssea de camundongos. Os ensaios de RNA-seq realizados em Neutrófilos murinos recuperados a partir do fêmur e tibia de camundongos C57/BL6 revelaram que os genes do sistema NADPH oxidase demonstraram alteração dos padrões de splicing para todos os genes do sistema NADPH oxidase quando as células são induzidas por LPS e IFN- $\gamma$ .

## 8 DISCUSSÃO

Com o crescente aumento de pesquisas sobre o efeito de citocinas passamos a ter uma melhor compreensão de vários mecanismos biológicos. Uma citocina que serve de exemplo é o IFN- $\gamma$ , que foi descrito há mais de 40 anos em sobrenadantes de linfócitos ativados com PHA apresentando uma atividade antiviral diferenciada (93). Apesar deste fenômeno ser apenas uma fração da complexa resposta imunológica que essa linfocina pleiotrópica proporciona, a maioria das revisões das respostas mediadas pelo IFN- $\gamma$  focam apenas nesta sua característica (94-96). Estudos sobre o gene e receptores do IFN- $\gamma$  também podem ser encontrados na literatura (97) e revelam-no como o maior colaborador na elucidação da via de transdução de sinais JAK-STAT e regulação transcricional mediada por citocinas (98-101). Além destes estudos, a importância do perfil de liberação de citocinas na definição dos subtipos de células T helper (Th1 e Th2) (102, 103) e na determinação da modalidade das respostas imunes mediadas por células T também são bem documentados (104-106) demonstrando assim, consequências profundas do efeito do IFN- $\gamma$  na resistência de animais a patógenos de todos os níveis taxonômicos (107-109).

A interação dos linfócitos T estimulados e macrófagos ativam estes macrófagos e promovem a síntese de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- $\alpha$  e produção de ROS mediante a ativação do sistema NADPH oxidase. Outros estudos reportam que o TNF- $\alpha$ , via estimulação de monócitos e/ou macrófagos aumenta a expressão de várias proteínas do sistema NADPH-oxidase (110-112). Dusi *et al.* (2001) relatou que a indução da expressão da gp91-*phox* pelo TNF- $\alpha$  é requerida para a ligação do PU.1 ao promotor do *CYBB*, porém o efeito do TNF- $\alpha$  na produção do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> foi não relacionada à expressão do flavocitocromo b, sugerindo que o aumento da atividade do sistema NADPH-oxidase mediado pelo TNF- $\alpha$  é devido a efeitos em outras proteínas da oxidase. Green *et al.* (1994) demonstrou em camundongos que o TNF- $\alpha$  causa aumento da expressão da p47-*phox* e p67-*phox* em macrófagos derivados de medula óssea. Posteriormente foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  causa aumento da expressão do gene que codifica a p67-*phox* (*NCF2*) em células MonoMac1 humanas, requerindo uma nova região promotora responsiva ao TNF- $\alpha$  no *NCF2* (113). Com isso propôs-se que a regulação transcricional induzida pelo TNF- $\alpha$  dos genes dos componentes citosólico do sistema NADPH-oxidase desempenha papel importante na regulação da atividade da oxidase em monócitos/macrófagos. Como o fator de transcrição NF $\kappa$ B pode ser ativado pelo TNF- $\alpha$  (114) e pelo ROS (115), essas observações instigaram uma possível presença de *feedback* positivo, cujo TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos ativados

poderia servir como um regulador autócrino/parácrino da expressão gênica dos genes desse sistema, através do NFκB e resultando em uma produção aumentada de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> com ativação sequencial do NFκB. Tendo em vista que o TNF-α é capaz de induzir a liberação de superóxido em quantidades relevantes, induzir a expressão de transcritos da *gp91-phox* e regular positivamente o sistema NADPH-oxidase (33, 36, 37) em diferentes linhagens celulares, demonstra-se relevante se o TNF-α pode comportar-se de maneira similar ao IFN-γ em eventos transcricionais relativos à expressão do gene *CYBB* e em mecanismos moleculares que regulam a expressão e função do sistema NADPH-oxidase.

No entanto, apesar do sistema NADPH-oxidase ser essencial para uma resposta imunológica eficaz contra patógenos, o excesso de espécies reativas do oxigênio estão envolvidos no dano tecidual associado a uma série de doenças crônicas inflamatórias (116-118). Um melhor entendimento dos processos que regulam a formação de um complexo NADPH-oxidase ativo é essencial para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para controlar danos em síndromes com inflamação crônica. Além disso, a susceptibilidade a infecções bacterianas e a fungos ainda é uma das principais características clínicas de pacientes com DGC. No entanto, a qualidade de vida desses pacientes tem melhorado de forma significativa com a introdução da terapia do IFN-γ, diminuindo a frequência de tais infecções e número de hospitalizações (12). Alguns relatos internacionais ainda apontam a terapia com IFN-γ como um fator importante no aumento da resposta a antibióticos e fungicidas em pacientes com DGC. É descrito em pacientes com DGC que o IFN-γ além de promover diminuição do pH no interior dos fagolisossomos é capaz de induzir aumento de: expressão de inúmeras moléculas de superfície, produção de NO, estabilidade de transcritos de RNA mensageiro e taxa de exportação de transcritos estáveis; possibilitando a correção de defeitos de *splicing* nos transcritos do gene *CYBB* em pacientes com DGC (13).

Apesar da extraordinária complexidade das respostas mediadas pelo IFN-γ, ainda não há razão para atribuir-lhe qualquer outra função exceto a regulação do sistema imune e ao controle de doenças infecciosas. No entanto, nota-se através dos trabalhos publicados, que as observações do efeito do IFN-γ focam apenas em fenômenos da superfície celular, eventos citoplasmáticos e, para suas observações a nível nuclear envolvendo os fatores de transcrição e seus efeitos sobre grupamentos de genes, deixando em aberto uma área ainda não explorada: o efeito do IFN-γ sobre eventos transcricionais. Essa deficiência no entendimento faz com que o presente estudo seja uma das primeiras na literatura que descreve tais tipos de observações, contribuindo de forma significativa para avanços na compreensão

de novas funções e características do IFN- $\gamma$  nas células da linhagem mielocítica de pacientes com DGC que apresentam defeitos em sítios de *splicing*, possibilitando dessa forma uma explicação racional para o efeito benéfico dessa citocina em pacientes portadores dessa enfermidade.

O nosso presente estudo foca suas análises nos efeitos do IFN- $\gamma$  relacionados ao processo de *splicing*, postulando, dessa forma, sobre possíveis efeitos do IFN- $\gamma$  em estar envolvido na ativação de genes importantes neste processo, explicando dessa forma o mecanismo pelo qual pacientes DGC ligados ao X ocasionados por defeitos de *splicing* são os pacientes que melhor se beneficiam do uso dessa citocina. Estudos anteriores desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa demonstram uma maior taxa de exportação de RNAm com proporção aumentada de transcritos corrigidos quando células de pacientes portadores de mutações em sítios de *splicing* no gene *CYBB* foram estimuladas com IFN- $\gamma$  causando dessa forma uma correção parcial do fenótipo devido a uma melhora na fidelidade do *splicing* no primeiro intron deste gene (13). Estes dados nos motivaram a propor o presente estudos envolvendo a análise dos efeitos benéficos do IFN- $\gamma$  neste grupo de pacientes focando nossas análises sobre o efeito desta citocina especificamente sobre o mecanismo de *splicing*. Para isso, nos propusermos além de analisar a expressão dos genes do sistema NADPH-oxidase também focar os genes relacionados ao processo de *splicing* utilizando a metodologia do micorarrays pois esta metodologia possibilita mensurar os níveis de expressão de um grande grupo de transcritos que estão sendo expressos em uma célula simultaneamente com um nível grande de sensibilidade para a detecção destes transcritos.

Os nossos achados em células B-EBV de pacientes DGC revelam que o IFN- $\gamma$  participa na indução/repressão de uma grande quantidade de genes, além disso é possível que esta citocina pode estar envolvida em modificações de subproporções de transcritos que apresentam isoformas, pseudogenes ou formas variantes, sendo capaz dessa forma de direcionar respostas imunológicas mediante a uma mudança de perfis de expressão transcricional de genes efetores importantes para uma resposta imunológica eficiente. Além disso, detectamos também alterações de expressão de regiões ncRNA, o que sugere que os efeitos do IFN- $\gamma$  englobam efeitos sobre regiões de RNA que vão além dos RNAs codantes de proteínas. Possivelmente os efeitos detectados pelo presente estudo possam estar relacionados a genes de ncRNA que são abundantes e funcionalmente importantes em vários processos biológicos humanos que podem também estar implicados em uma defesa imunológica eficiente, como de ncRNAs podemos citar os RNAs transferidores (tRNAs), RNAs ribossomais (rRNAs), pequenos RNAs nucleares (Small nucleolar RNAs, snoRNAs),

microRNAs (miRNAs), RNAs de Interferência Curtos (Small interfering RNA, siRNA), Pequenos RNAs nucleares (Small nuclear RNAs, snRNAs), Extracellular RNA (exRNAs), Piwi-interacting RNA (piRNAs) e os ncRNAs longos. Dados parecidos aos encontrados em células B-EBV de indivíduos saudáveis e pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* e pacientes DGC ocasionados por mutação *nonsense* foram também encontrados em células THP1 e U937, demonstrando que existem vários processos importantes anteriores a síntese de proteínas importantes em processos de defesa do hospedeiro a estímulos externos podem ser modulados pelo efeito do IFN- $\gamma$ .

O presente estudo reforça a hipótese de que o IFN- $\gamma$  age em diferentes frentes na indução de uma resposta imunológica eficiente. Os achados em células B-EBV tanto de indivíduos saudáveis quanto em pacientes DGC revelaram que o IFN $\gamma$  age na indução de um grupo diverso e distinto de vias importantes para o sistema imunológico no combate a microorganismos. No entanto também detectamos a ativação de mecanismos biológicos intracelulares importantes como a proteólise mediado por ubiquitinação proteossômica e regulação do comprimento da telomerase. O que reforça os dados da literatura que demonstra que o IFN- $\gamma$  possui uma ação pleiotrópica provocando alteração de expressão em múltiplos genes simultaneamente. Os dados referentes aos processos celulares ativados em células linhagem U937, THP1 e GM12878 nos possibilitaram identificar um número muito menor de processos ativados, no entanto também detectamos a indução de vias imunológicas importantes como por exemplo, a indução de genes relacionados a apresentação de antígeno pelo MHC II, a quimiotaxia, a função da resposta imunológica de células T e resposta imunológica relacionado a sinalização do CD40, o que também demonstra a ação pleiotrópica do IFN- $\gamma$  em células de linhagem mielomonocítica em processos celulares relacionados a inflamação, além destes a ativação de mecanismos biológicos essenciais a manutenção da célula também se demonstraram ativados pelo tratamento *in vitro* do IFN- $\gamma$  como por exemplo a via de transporte de sódio e cálcio e de mecanismos de transcrição e processamento do mRNA.

Ao focarmos nossa atenção ao sistema de interesse do nosso estudo, o sistema NADPH oxidase, fomos capazes de detectar a indução dos genes *CYBB*, *NCF2* e uma tendência de aumento de expressão do gene *CYBA* em células B-EBV tanto de indivíduos saudáveis quanto pacientes DGC analisados. Os dados podem ser considerados equiparáveis entre os grupos analisados revelando que a indução detectada mediante a citocina IFN- $\gamma$  é capaz de estimular a transcrição dos genes do sistema NADPH oxidase em pacientes DGC de forma similar ao encontrado em indivíduos saudáveis, dados similares foram encontrados em nossas análises

em células U937, THP1 e GM12878. Estes dados, correlacionam com alguns trabalhos já reportados na literatura, onde é demonstrado que a estimulação de neutrófilos humanos com IFN- $\gamma$  causa um aumento da transcrição de mRNA da gp91-*phox* (60) e o mesmo efeito pode ser observado em monócitos e macrófagos, apesar de com uma cinética muito mais lenta que observado em neutrófilos. Em macrófagos, o tempo para a indução de mRNA da gp91-*phox* pode ser funcionalmente correlacionado com o aumento da produção de O<sup>2-</sup>. A ciclohexamida bloqueia o *burst respiratório* induzido pelo IFN- $\gamma$  em macrófagos e em neutrófilos, porém não interfere com acumulação de mRNA de gp91-*phox* (42). A indução do mRNA da gp91-*phox* pertence a categoria de resposta primária, e a ciclohexamida pode bloquear o *burst respiratório* bloqueando a síntese da proteína gp91-*phox*. Estudos da região *up stream* do genoma da gp91-*phox* identificaram um elemento cis-atuante com o promotor da gp91-*phox* que é necessário, porém não suficiente para uma resposta ao IFN- $\gamma$  (119). A análise de sequência, no entanto, não revelou qualquer elemento de resposta ao IFN- $\gamma$  conhecido, e estudos suplementares são necessários para explicar a indução do mRNA da gp91-*phox* num nível molecular.

Em relação ao componente p47-*phox*, a situação é um pouco diferente, pois apesar da estimulação sinérgica com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o mRNA da p47-*phox* é claramente diminuída em neutrófilos humanos “maduros” e monócitos (60), que desencadeia um nível de expressão constitutivo elevado, e é induzido em linhagens celulares HL-60 e ML3 leucêmicas prómielocíticas humanas a medida que eles maturam para células terminalmente diferenciadas com características de neutrófilos ou monócitos/macrófagos (120). Os detalhes moleculares dessa regulação transcripcional ainda não foram elucidados.

Apesar dos níveis de mRNA da gp22-*phox* se manterem inalterados após estimulação com IFN- $\gamma$  em todas os tipos celulares testados, mRNA da p67-*phox* é moderadamente induzido pelo IFN- $\gamma$  sozinho porém muito induzido em sinergismo com TNF- $\alpha$  em linhagens celulares prómielocíticas (120). Interessantemente uma fase entre a acumulação do transcrito de mRNA da gp91-*phox*, p67-*phox*, e p47-*phox* em células prómielocíticas e a capacidade de *burst respiratório* sugere um controle translacional e postranslacional pautativo adicional (GUPTA *et al.*, 1992). Estudos complementares são requeridos para demonstrar a importância do sinergismo do TNF- $\alpha$  e a indução dos componentes do *burst respiratório* mediado pelo IFN- $\gamma$

Os resultados encontrados em ensaios de PCR em nossa dissertação de mestrado (FRAZÃO, 2009) através da quantificação relativa de RNA total nos ensaios de PCR em tempo real, fomos capaz de confirmar os dados da literatura sugestivos que o IFN- $\gamma$  aumenta a

expressão do gene *CYBB* em pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* em células polimorfonucleares, em células mononucleares e em linfócitos B imortalizados com vírus Epstein-Barr. Nos ensaios de PCR que amplificaram os fragmentos de RNA total compreendidos entre os exons da região onde estavam presentes os defeitos de *splicing* dos pacientes em estudo podemos observar que o IFN- $\gamma$  aumenta a taxa de expressão do gene *CYBB*, corroborando, assim como os resultados encontrados no PCR em tempo real, com os dados encontrados na literatura, no entanto não foi possível identificar modificações na no padrão de banda sugestivo de uma correção do defeito, isto sugere que o IFN- $\gamma$  possivelmente age em alguma etapa do processamento do deste RNAm e que possivelmente somente através de uma técnica diferenciada, seria possível identificar tais modificações.

Visando um melhor entendimento do processo responsável pela remoção dos íntrons e unificação dos exons após a transcrição do RNA, avaliamos a expressão dos genes que se demonstraram ativados pela indução *in vitro* do IFN- $\gamma$ . A detecção de diminuição de expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A* e aumento de expressão de *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células do paciente que apresentava defeitos de *splicing* enquanto que no paciente com mutação *nonsense* analisado apenas detectamos diminuição da expressão do gene *C2* nos revela que células de diferentes indivíduos apresentam diferentes padrões de expressão de genes importantes para a edição de mRNAs o que pode acarretar em diferentes graus de susceptibilidade a infecções, não podemos discutir aqui se os dados observados são característicos e específicos a determinados tipos de mutações, sugerindo assim que diferentes mutações podem apresentar diferentes perfis de ativação de genes relacionados ao *splicing*. Um fato importante observado em nossos dados é que células de um terceiro paciente analisado que apresentava mutação do tipo *frameshift* e células do indivíduo saudáveis usado como controle do nosso experimento, não detectamos nenhum gene com modificação de expressão para o conjunto de genes relacionado ao processo de *splicing*. Em células de linhagem THP1 a observação de diminuição da expressão de apenas um gene relacionado ao processo de *splicing*, o *SRPK1*, porém causando consequências de expressão em vários outros genes *SFRS1* (SP2), *SFRS2* (SC35), *SFRS3*, *SFRS12*, *SRrp25*, *SRrp40*, *SRrp55*,  *$\gamma$ T521* e *DOX17PABPC1* revelam o quanto este sistema é dinâmico e complexo necessitando de estudos adicionais para um melhor entendimento deste sistema. A continuidade dessa nossa linha de pesquisa em estudos subsequentes a este projeto, já conta com aprovação pela FAPESP.

Os dados adquiridos por meio de IFI para a detecção das proteínas pliceossomais visando demonstrar que o processo de *splicing* em linfócitos B-EBV de indivíduos saudáveis e

paciente DGC com defeitos de *splicing* são bastante similares entre si. No entanto o uso de marcadores mais específicos para a detecção destas proteínas se fazem necessários para um melhor entendimento deste mecanismo. Infelizmente tentativas realizadas para a aquisição de resultados por meio de microscopia confocal para fatores de *splicing* específicos que apresentaram aumento de expressão observados nos microarrays não se demonstraram satisfatórias para serem discutidos dentro deste estudo e não nos permitiram avançar mais sobre os efeitos do IFN- $\gamma$  em processos de regulação da expressão gênica, como é o caso do *splicing*.

Os dados provenientes do presente estudo apontam as proteínas SmRNPs e SSA/Ro como sendo as proteínas principais induzidas pelo tratamento *in vitro* do IFN- $\gamma$ . As alterações no padrão observado incluem alterações no padrão de marcação e também aumento da fluorescência detectada, demonstrando que além do aumento de expressão uma mudança no padrão de distribuição destas proteínas na célula o que pode estar relacionado a funções que estão sendo diferencialmente induzidos pelo IFN- $\gamma$ . Os dados adquiridos em células polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico apontam as proteínas detectadas pelos padrões RNPs e SmRNPs como sendo as principais induzidas pelo IFN- $\gamma$ . No entanto resultados muito similares são encontrados quando as células são estimuladas por outra citocina, o TNF- $\alpha$ . Isto sugere que outras citocinas podem acarretar na indução na expressão e distribuição das proteínas spliceossomais e de fatores de *splicing*. Estes dados sugerem que o IFN- $\gamma$  pode ser um componente importante que participa na indução de maiores quantidades de proteínas disponíveis para realizar o *splicing* em pacientes DGC ocasionados por efeitos de *splicing*, que por sua vez se beneficiariam disso na tentativa de corrigir transcritos que inicialmente não seriam corrigidos sem que houvesse a indução de genes importantes neste processo pelo IFN- $\gamma$ . O TNF- $\alpha$  parece desempenhar papel similar ao IFN- $\gamma$  neste processo, no entanto os dados apresentados aqui para esta citocina nos permitem concluir muito pouco a respeito desta citocina em células humanas, no entanto, esta observação é um campo amplo a ser explorado futuramente com estudos que visam analisar o efeito de outras citocinas em genes específicos que apresentam a capacidade de desempenhar funções diferentes dependendo do transcrito preferencialmente expresso.

Os ensaios de microarrays realizados no presente estudo demonstram que o IFN- $\gamma$ , além de ser um grande indutor do sistema NADPH oxidase também possui a capacidade de atuar em vários outros genes que possuem pseudogenes, isoformas e formas variantes de *splicing* o que possivelmente sugere que o IFN- $\gamma$  pode estar desempenhando algum papel a nível transcricional que ainda não foi descrito na literatura. Os dados demonstrados pela rede

de interação dos genes a partir dos genes que se mostraram estarem com expressão alterada nos microarrays indicam que ainda pouco se sabe sobre a quantidade de genes o IFN- $\gamma$  pode estar regulando bem como suas funções nestes novos sistemas que lentamente estamos descobrindo. Uma característica importante visualizado com os resultados adquiridos com o microarray foi que a estimulação com IFN- $\gamma$  ativou vários genes importantes para a via do TNF- $\alpha$ , o que demonstra que esses dois sistemas encontram-se intimamente correlacionados em nível de regulação gênica. Demonstrando dessa forma a importância de ambos os sistemas atuarem conjuntamente em situações de ativação do sistema imune inato. Possivelmente o IFN- $\gamma$  pode estar desempenhando algum papel importante a nível transcricional que ainda é desconhecido.

Ensaio feito usando hibridação de cRNA com Hu95Av2 oligonucleotide arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) realizados em 2004 por Kobayashi e colaboradores (121) em pacientes portadores de DGC da forma ligada ao X contribuíram para obter insights sobre os processos moleculares que contribuem para a fisiopatologia da DGC-X. A comparação da expressão gênica global em PMNs de pacientes DGC-X e indivíduos de controle saudáveis possibilitaram a identificação de expressão gênica aumentada de forma constitutiva em células PMN não estimuladas de pacientes DGC-X de genes que codificam mediadores da inflamação e defesa do hospedeiro, incluindo a CD11c, CD14, CD54, Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R, CD120b, TLR5, IL-4R, CCR1, p47phox, p40phox, a IL-8, CXCL1, NRAMP1, e calgranulinas A e B. Foram também comparados os níveis de transcrição de PMNs de indivíduos normais e pacientes DGC-X após a fagocitose, que por sua vez possibilitou a identificação de 206 genes cuja expressão foi encontrada alterada, na presença e na ausência de ROS, respectivamente. Dentre eles, a síntese da *Bcl2-associated X protein* se apresentou notavelmente alterada acompanhando o processo de apoptose defeituoso em neutrófilos de pacientes DGC-X, sugerindo que a formação de granuloma em pacientes DGC-X reflete tanto o aumento da atividade pró-inflamatória e defeituosa apoptose e que ROS contribuir direta ou indiretamente para a resolução da resposta inflamatória por influenciar a transcrição gênica de PMN. No entanto, estudos que visam a identificação de genes relacionados a eventos transcricionais, em especial relacionados ao processo de *splicing* e regulação da transcrição do gene *CYBB* em pacientes DGC são escassos na literatura que possibilitem comparações dos nossos achados.

O advento de novas tecnologias que foram sendo desenvolvidas enquanto nos desenvolvíamos o presente estudo nos levaram a optar pelo uso do *high throughput RNA sequencing (RNA-Seq)* na tentativa de analisar os genes do sistema NADPH oxidase com maior nitidez. O RNA-Seq é uma tecnologia que foi desenvolvida para a identificação de

perfis de expressão transcriptômicos através do *deep-sequencing*. Estudos que utilizaram este método já alteraram a nossa visão da extensão e da complexidade do transcriptoma de eucariotos. RNA-Seq também fornece uma medida mais exata dos níveis de transcritos e suas isoformas que outros métodos (122). Além disto, esta tecnologia fornece tanto a sequência quanto a frequência das moléculas de RNA que se encontram presentes em qualquer momento particular em um tipo específico de célula, tecido ou órgão. Ele possibilita a contagem do número de mRNAs que são codificadas por genes individuais e desta forma proporciona um indicador do potencial de codificação de proteínas, que por sua vez é um dos principais contribuintes para a formação do fenótipo (123). Os ensaios de RNA-seq desenvolvidos por nós em foram desenvolvidos apenas em neutrófilos purificados de camundongos C57/BL6 devido ao nosso acesso facilitado para uso desta tecnologia apenas em células murinas. Os dados encontrados para este conjunto pequeno de genes nos revelaram que o tratamento *in vitro* de LPS e IFN- $\gamma$  são capaz de induzir alteração de diferentes perfis de expressão dos transcritos analisados sugerindo uma possível regulação de *splicing* culminando com a formação de diferentes proporções de vários transcritos a partir de um único gene. Identificamos também dados já esperados como aumento de expressão de todos os transcritos do sistema NADPH oxidase quando estes foram estimulados pelo IFN $\gamma$  e LPS. Os dados de RNA-seq realizados até o presente sustentam ideias a serem desenvolvidos em trabalhos futuros a serem desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa através do mapeamento de genes co-expressos importantes para a imunidade inata possam trazer mais informações sobre este processo, bem como sobre os como o IFN- $\gamma$  pode estar tendo influência sobre o mecanismo de *splicing*.

A nossa linha de pesquisa envolvendo a citocina IFN- $\gamma$  e seus benefícios para pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* recebeu em 2013 o prêmio de Colaboração Internacional dado pelo *International Pediatric Research Foundation* (IPRF) (Anexo C). A colaboração de longa data entre o Dr. Condino-Neto e o Dr. Newburger, assim como os achados provenientes dos projetos desenvolvidos pelo aluno Josias Brito Frazão foram considerados cruciais para o recebimento desta premiação.

O presente estudo traz informações interessantes sobre um possível papel do IFN $\gamma$  na indução de genes importantes para o processo de edição do RNAm em leucócitos de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* ao reportar que o efeito benéfico do IFN $\gamma$  observado em outros estudo pode estar atrelado a um aumento de expressão de genes importantes para o processo de *splicing* e a uma possível modificação de expressão de perfil de transcritos de um gene. Manifestações similares são encontradas para outra citocina, o

TNF- $\alpha$ . Uma vez este fenômeno confirmado, novas características acerca do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  estarão sendo elucidados, fornecendo dessa forma subsídios para o uso sistemático do IFN- $\gamma$  a um subgrupo de pacientes que apresentam DGC por defeitos de *splicing* cujas células são responsivas em ensaios *in vitro*. Para isso pretendemos dar continuidade às nossas descobertas neste campo do conhecimento, pretendemos também nos estudos a ser desenvolvido nos anos seguintes estarmos mais próximos dos questionamentos acerca do mecanismo pelo qual o uso do IFN- $\gamma$  causa benefícios clínicos a esse grupo de pacientes.

## 9 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com o presente trabalho nos permitem concluir que:

1. O uso do IFN- $\gamma$  interfere no processamento da mensagem do RNAm causando modificação nos padrões de expressão de transcritos dos genes da NADPH-oxidase (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* e *NOX1*), fator de splicing 2 rico em arginina/serina (*SFRS2*) e para os genes das proteínas spliceossomais U2, U5, U6 snRNPs (*SF3B4*, *PRPF8* e *LSM2*);
2. O uso do IFN- $\gamma$  interfere no processamento da mensagem do RNAm aumentando a expressão de transcritos do gene *CYBB* e *NCF1* ambos componentes do sistema NADPH oxidase tanto de células THP1 U937 e GM12878 quanto de células de linhagem BEBV de indivíduos saudáveis e dos pacientes estudados;
3. O IFN- $\gamma$  causa modificações na expressão de transcritos relacionados a transcrição, ao processo de *splicing*, à genes de fatores de transcrição, genes relacionados à via do TNF- $\alpha$  e em genes com *splicing* alternativos em células THP1, U937 e B-EBV;
4. O IFN- $\gamma$  causa modificações de expressão do gene *SRPK1* em células THP1, e alterações de expressão dos genes *THOC4*, *NONO*, *SF3A1*, *SRRM1*, *UPF3A*, *SRSF10*, *SRSF10*, *SNRPA1* e *C2* em células de pacientes DGC ocasionados por defeitos de *splicing* analisados;
5. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são capazes de induzir a ativação celular causando um aumento da expressão das proteínas envolvidas no processo do *splicing*, ativando dessa maneira o spliceossoma;
6. A presença do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  induzem um aumento da presença de neutrófilos ativados no sítio da inflamação e influem na produção de neutrófilos e na ativação destes no compartimento da medula óssea em camundongos;
7. O IFN- $\gamma$  e o LPS causam modificação em níveis de expressão dos genes do sistema NADPH oxidase através da modificação de padrões de expressão desses transcritos (isoformas, pseudogenes ou formas variantes em regiões codantes de mRNA) em neutrófilos purificados da medula óssea em camundongos sob estimulação *in vitro*.

**REFERÊNCIAS\***

1. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Feb;38(1):3-10.
2. de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):420-7.
3. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. 2001 Apr;99(1):7-17.
4. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973 Mar;52(3):741-4.
5. Rae J, Newburger PE, Dinauer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *Am J Hum Genet*. 1998 Jun;62(6):1320-31.
6. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Oct 15;45(3):246-65.
7. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):155-69.
8. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000 May;79(3):170-200.
9. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1663-81.
10. de Boer M, Bolscher BG, Dinauer MC, Orkin SH, Smith CI, Ahlin A, et al. Splice site mutations are a common cause of X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1992 Sep 15;80(6):1553-8.
11. Johnston RB, Jr. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol*. 2001 Jan;8(1):17-22.
12. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1991 Feb 21;324(8):509-16.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

13. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 2000. Jun 1;95(11):3548-54.
14. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2004. Sep 1;39(5):692-9.
15. Ezekowitz RA, Dinauer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N Engl J Med*. 1988 Jul 21;319(3):146-51.
16. Ott MG, Seger R, Stein S, Siler U, Hoelzer D, Grez M. Advances in the treatment of Chronic Granulomatous Disease by gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2007 Jun;7(3):155-61.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
18. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*. 2002 Feb;23(2):96-101.
19. DeVries TA, Kalkofen RL, Matassa AA, Reyland ME. Protein kinase Cdelta regulates apoptosis via activation of STAT1. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45603-12.
20. Nair JS, DaFonseca CJ, Tjernberg A, Sun W, Darnell JE, Jr., Chait BT, et al. Requirement of Ca<sup>2+</sup> and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 30;99(9):5971-6.
21. Deb DK, Sassano A, Lekmine F, Majchrzak B, Verma A, Kambhampati S, et al. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):267-73.
22. Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol*. 1999 Feb 11;9(3):R93-6.
23. Alsayed Y, Uddin S, Ahmad S, Majchrzak B, Druker BJ, Fish EN, et al. IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway. *J Immunol*. 2000. Feb 15;164(4):1800-6.
24. Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC. Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol*. 2004 Mar;65(3):589-98.
25. Gatesman A, Walker VG, Baisden JM, Weed SA, Flynn DC. Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Mol Cell Biol*. 2004 Sep;24(17):7578-97.
26. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. 2000 Jan 17;19(2):263-72.

27. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 1996 May 3;272(5262):719-22.
28. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*. 1999 Sep 3;98(5):597-608.
29. Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5833-43.
30. Halfter UM, Derbyshire ZE, Vaillancourt RR. Interferon-gamma-dependent tyrosine phosphorylation of MEKK4 via Pyk2 is regulated by annexin II and SHP2 in keratinocytes. *Biochem J*. 2005 May 15;388(Pt 1):17-28.
31. Roy SK, Hu J, Meng Q, Xia Y, Shapiro PS, Reddy SP, et al. MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jun 11;99(12):7945-50.
32. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
33. Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Dec 15;360(2):158-64.
34. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4719-25.
35. Errante PR, Frazao JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2008 Nov;3(3):225-30.
36. Lopez JA, Newburger PE, Condino-Neto A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the eosinophilic differentiation and NADPH oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2003 Dec;23(12):737-44.
37. Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4960-7.
38. Newburger PE, Ezekowitz RA. Cellular and molecular effects of recombinant interferon gamma in chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988 Jun;2(2):267-76.
39. Horie S, Gleich GJ, Kita H. Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Aug;98(2):371-81.

40. Yoshie O, Majima T, Saito H. Membrane oxidative metabolism of human eosinophilic cell line EoL-1 in response to phorbol diester and formyl peptide: synergistic augmentation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol.* 1989 Jan;45(1):10-20.
41. Ohtsu H, Yamauchi K, Yoshie O, Tanno Y, Saito H, Hayashi N, et al. The effect of cytokines on the differentiation of an eosinophilic leukemia cell line (EoL-1) is associated with down regulation of c-myc gene expression. *Cell Struct Funct.* 1993 Apr;18(2):125-33.
42. Cassatella MA, Hartman L, Perussia B, Trinchieri G. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1570-9.
43. Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Jul;85(14):5215-9.
44. Eklund EA, Luo W, Skalnik DG. Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription. *J Immunol.* 1996 Sep 15;157(6):2418-29.
45. Jacobsen BM, Skalnik DG. YY1 binds five cis-elements and trans-activates the myeloid cell-restricted gp91(phox) promoter. *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):29984-93.
46. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13957-65.
47. Eklund EA, Kakar R. Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6095-105.
48. Kumatori A, Yang D, Suzuki S, Nakamura M. Cooperation of STAT-1 and IRF-1 in interferon-gamma-induced transcription of the gp91(phox) gene. *J Biol Chem.* 2002 Mar 15;277(11):9103-11.
49. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 2006 Mar 3;281(9):5657-67.
50. Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, Aragao-Filho WC, Pereira PV, Rehder J, et al. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):1453-60.
51. Condino-neto A, Muscara MN, Bellinati-Pires R, Carneiro-Sampaio MM, Brandao AC, Grumach AS, et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-gamma on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1996 May;16(5):357-64.

52. Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, et al. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. *Blood*. 2001 Jul 15;98(2):436-41.
53. Nunoi H, Ishibashi F, Mizukami T, Hidaka F. Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations. *Jpn J Infect Dis*. 2004 Oct;57(5):S25-6.
54. Chapel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clin Exp Immunol*. 2012 Apr;168(1):58-9.
55. Heyworth PG, Curnutte JT, Rae J, Noack D, Roos D, van Koppen E, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis*. 2001 Jan-Feb;27(1):16-26.
56. Ezekowitz RA, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 1987 Oct;80(4):1009-16.
57. Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RB, Jr. Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1988 Jun;2(2):253-66.
58. Agudelo-Florez P, Prando-Andrade CC, Lopez JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, et al. Chronic granulomatous disease in Latin American patients: clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Feb;46(2):243-52.
59. Noack D, Heyworth PG, Newburger PE, Cross AR. An unusual intronic mutation in the CYBB gene giving rise to chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Sep 28;1537(2):125-31.
60. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem*. 1990 Nov 25;265(33):20241-6.
61. Schapiro BL, Newburger PE, Klempner MS, Dinauer MC. Chronic granulomatous disease presenting in a 69-year-old man. *N Engl J Med*. 1991 Dec 19;325(25):1786-90.
62. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2658-64.
63. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci*. 1993 Feb;18(2):43-7.

64. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest.* 1987 Sep;80(3):732-42.
65. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood.* 1993 Nov 15;82(10):3183-91.
66. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001 Dec;25(4):386-401.
67. Morris P, Stetler DA. Monoclonal antibody against the lupus antigen Sm cross-reacts with RNA polymerase I. *Autoimmunity.* 1989;2(3):241-51.
68. Nojima Y, Minota S, Yamada A, Takaku F. Identification of an acidic ribosomal protein reactive with anti-Sm autoantibody. *J Immunol.* 1989 Sep 15;143(6):1915-20.
69. Masaki Y, Yamamoto K, Yanagi K, Miura H, Ichijo H, Kato T, et al. B cell epitope on the U1 snRNP-C autoantigen contains a sequence similar to that of the herpes simplex virus protein. *Eur J Immunol.* 1993 May;23(5):1064-71.
70. Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science.* 1981 Jan 23;211(4480):400-2.
71. Venables PJ, Smith PR, Maini RN. Purification and characterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens. *Clin Exp Immunol.* 1983 Dec;54(3):731-8.
72. Wolin SL, Steitz JA. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Apr;81(7):1996-2000.
73. Yamagata H, Harley JB, Reichlin M. Molecular properties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibody. *J Clin Invest.* 1984 Aug;74(2):625-33.
74. Rinke J, Steitz JA. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell.* 1982 May;29(1):149-59.
75. Pruijn GJ, Slobbe RL, Van Venrooij WJ. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep.* 1990;14(2-3):43-8.
76. Gottlieb E, Steitz JA. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 1989 Mar;8(3):851-61.
77. Gottlieb E, Steitz JA. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J.* 1989 Mar;8(3):841-50.

78. Bachmann M, Chang S, Slor H, Kukulies J, Muller WE. Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1990 Dec; 191(2):171-80.
79. Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, Muller WE. The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Mol Cell Biochem.* 1989 Feb 21;85(2):103-14.
80. Gui JF, Lane WS, Fu XD. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature.* 1994 Jun 23;369(6482):678-82.
81. Wang HY, Arden KC, Bermingham JR, Jr., Viars CS, Lin W, Boyer AD, et al. Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes. *Genomics.* 1999 Apr 15;57(2):310-5.
82. Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, et al. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol.* 1998 Feb 23;140(4):737-50.
83. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med.* 2002 Nov 4;196(9):1213-25.
84. Lukasiewicz R, Velazquez-Dones A, Huynh N, Hagopian J, Fu XD, Adams J, et al. Structurally unique yeast and mammalian serine-arginine protein kinases catalyze evolutionarily conserved phosphorylation reactions. *J Biol Chem.* 2007 Aug 10;282(32):23036-43.
85. Umehara H, Nishii Y, Morishima M, Kakehi Y, Kioka N, Amachi T, et al. Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 7;301(2):324-9.
86. Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, Hagiwara M. The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):11125-31.
87. Subramanian KK, Jia Y, Zhu D, Simms BT, Jo H, Hattori H, et al. Tumor suppressor PTEN is a physiologic suppressor of chemoattractant-mediated neutrophil functions. *Blood.* 2007 May 1;109(9):4028-37.
88. Mizgerd JP, Quinlan WM, LeBlanc BW, Kutkoski GJ, Bullard DC, Beaudet AL, et al. Combinatorial requirements for adhesion molecules in mediating neutrophil emigration during bacterial peritonitis in mice. *J Leukoc Biol.* 1998 Sep;64(3):291-7.
89. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Nov;87(22):9010-4.

90. Yui S, Sasaki T, Araki N, Horiuchi S, Yamazaki M. Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1943-9.
91. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science.* 1988 Jun 10;240(4858):1546-8.
92. Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, Skolnik EY, Makita Z, Sharma V, et al. Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2165-72.
93. Wheelock EF. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science.* 1965 Jul 16;149(3681):310-1.
94. Kerr IM, Stark GR. The antiviral effects of the interferons and their inhibition. *J Interferon Res.* 1992 Aug;12(4):237-40.
95. Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res.* 1990; 38:147-200.
96. Revel M. Genetic and functional diversity of interferons in man. *Interferon.* 1983;5:205-39.
97. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:571-611.
98. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994 Jun 3;264(5164):1415-21.
99. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:369-98.
100. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):331-4.
101. Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:621-51.
102. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
103. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:227-57.
104. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:635-73.

105. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
106. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 1995 Oct;58(4):373-81.
107. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev.* 1991 Dec;124:5-24.
108. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:385-409.
109. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:151-77.
110. Green SP, Hamilton JA, Uhlinger DJ, Phillips WA. Expression of p47-phox and p67-phox proteins in murine bone marrow-derived macrophages: enhancement by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha but not colony stimulating factor 1. *J Leukoc Biol.* 1994 Apr;55(4):530-5.
111. Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca VD, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. *Eur J Immunol.* 2001 Mar;31(3):929-38.
112. Almeida AC, Rehder J, Severino SD, Martins-Filho J, Newburger PE, Condino-Neto A. The effect of IFN-gamma and TNF-alpha on the NADPH oxidase system of human colostrum macrophages, blood monocytes, and THP-1 cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Sep;25(9):540-6.
113. Gauss KA, Bunger PL, Larson TC, Young CJ, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, et al. Identification of a novel tumor necrosis factor alpha-responsive region in the NCF2 promoter. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb;77(2):267-78.
114. Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res.* 2004 Mar 1;61(4):671-82.
115. Clark RA, Valente AJ. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):799-810.
116. Weissmann G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2004. Jun;10(3 Suppl):S26-31.
117. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):23-8.

118. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006 Jul 15;71(2):216-25.
119. Eklund EA, Skalnik DG. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J Biol Chem.* 1995 Apr 7;270(14):8267-73.
120. Gupta JW, Kubin M, Hartman L, Cassatella M, Trinchieri G. Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Cancer Res.* 1992 May 1;52(9):2530-7.
121. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, Whitney AR, Nauseef WM, Malech HL, et al. Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):636-43.
122. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57-63.
123. Hampton M, Melvin RG, Kendall AH, Kirkpatrick BR, Peterson N, Andrews MT. Deep sequencing the transcriptome reveals seasonal adaptive mechanisms in a hibernating mammal. *PLoS One.* 2011;6(10):e27021.

***ANEXOS***

---

ANEXO A – Relato de atividades desenvolvidas durante estágio na University of Massachusetts sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Edwin Newburger



Department of Pediatrics  
University of Massachusetts Medical School  
55 Lake Avenue North  
Worcester, MA 01605-2324  
508.856.4225 (office) 508.856.1989 (fax)  
peter.newburger@umassmed.edu (e-mail)

Peter E. Newburger, M.D.  
Ali and John Pierce Professor of  
Pediatric Hematology/Oncology  
Vice Chair for Research  
Director, Pediatric Hematology/Oncology

May 24, 2012

To whom it may concern:

Josias Brito Frazão conducted research in my laboratory **starting on May 16, 2011 and ending on January 31, 2012**. This work represents an important part of an ongoing collaboration between my laboratory and that of Prof. Antonio Condino-Neto. Please feel free to contact me if you need any further information or documentation.

During this time in my laboratory, Mr. Brito Frazão undertook training and conducted research involving confocal microscopy, cell culture, mRNA and microRNA separation/extraction, real-time PCR, microarray analysis of gene expression, neutrophil purification in resting and activated state, in vitro stimulation of neutrophils with LPS and IFN-gamma, collaborations in deep sequencing analysis of gene expression with the laboratories of Professors Sherman Weisman (Yale University) and Michael Snyder (Stanford University), mouse embryo dissection, bioluminescent NF-kappaB gene reporter assays, design of primers for chromosome conformation capture (3C) assays. He also participated in laboratory meetings, journal club discussions, and departmental and medical school seminars and lectures.

His work focused on the molecular basis of neutrophil activation by interferon-gamma in cells from normal individuals and chronic granulomatous disease (CGD) patients, as well as mouse models of neutrophil function and CGD. His research has formed a critical part of the long-term ongoing collaboration between my laboratory and that of Prof. Antonio Condino-Neto, and should result in several joint publications in the near future. The work should also contribute to an ongoing collaboration of both of our laboratories with Prof. Jean-Laurent Casanova's group in Paris and New York. Overall, Mr. Brito Frazão proved himself to be both an outstanding, productive investigator and an excellent citizen of the research community.

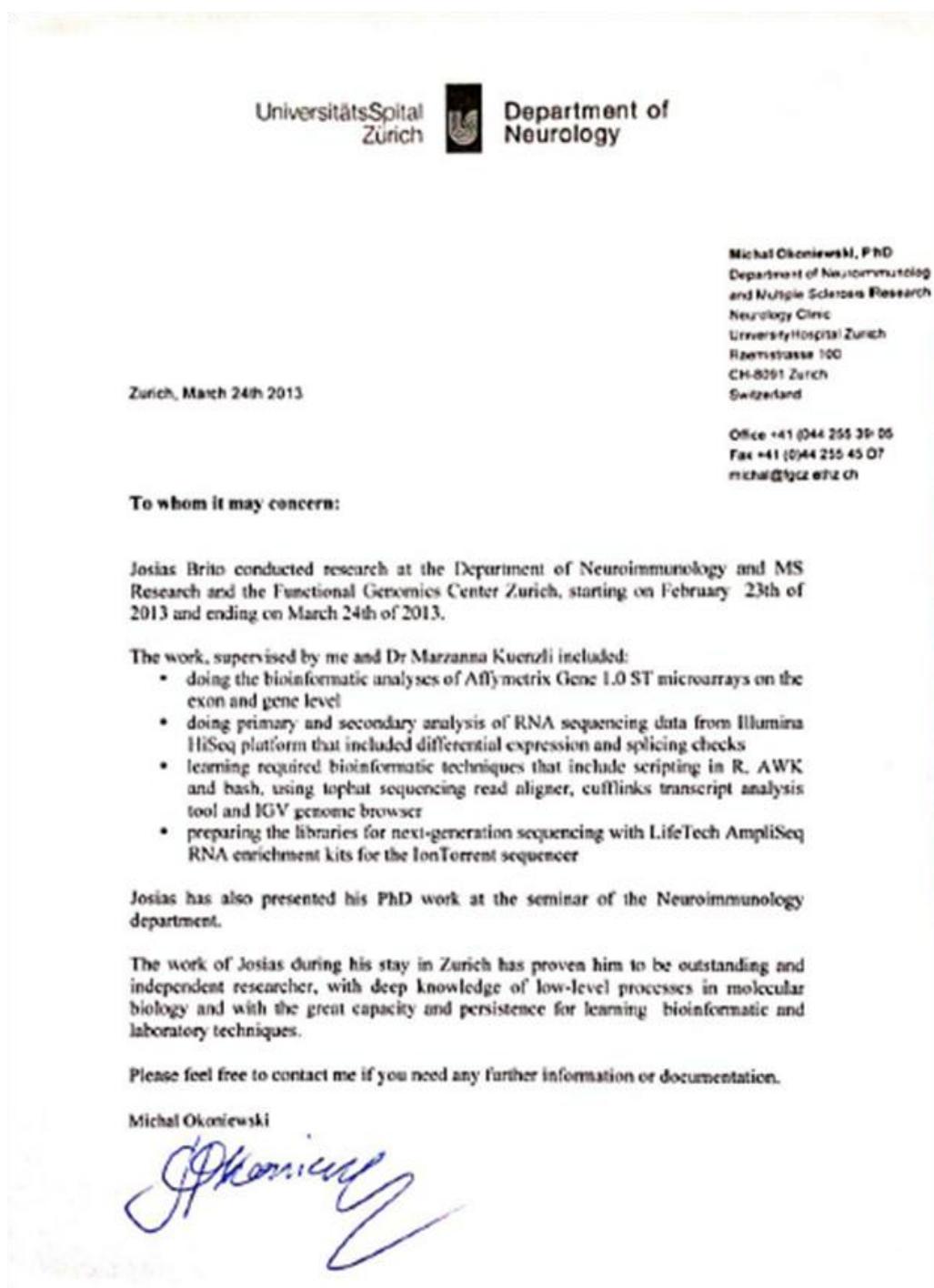
Funding for the equipment and supplies used in these studies was provided by my NIH grant (R01-DK054369) and by University of Massachusetts Medical School endowment funds.

Please feel free to contact me if you need any further information or documentation.

Sincerely,

Peter E. Newburger, MD

**ANEXO B** – Relato de atividades desenvolvidas durante estágio na UniversitätsSpital  
Zürich sob a supervisão do Dr. Michal Okoniewski



**ANEXO C** – Prêmio de Colaboração Internacional da International Pediatric Research Foundation (IPRF) recebido em 2013 pelo nosso grupo.



INTERNATIONAL PEDIATRIC  
RESEARCH FOUNDATION

---

---

Funding Opportunities - International Collaborative Award Recipients

**2013**



Peter Newburger, MD



Antonio Condino-Neto, MD

*“Effects of interferon-gamma on gene expression and splicing in leukocytes from chronic granulomatous disease patients”*

This project will foster and expand a collaboration between investigators in the U.S. and Brazil to pursue basic science research involving exchange of reagents, personnel, expertise, patient-derived cells and cell lines to better understand chronic granulomatous disease.

---