

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA
E BIOLOGIA MOLECULAR

ISABELA FERNANDA MORALES MARTINS

**PAPEL DA PROTEÍNA Fbxo7 NO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS EM
LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA HUMANA (THP-1) ESTIMULADA
POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

SÃO CARLOS

2021

ISABELA FERNANDA MORALES MARTINS

**PAPEL DA PROTEÍNA Fbxo7 NO PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS EM
LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA HUMANA (THP-1) ESTIMULADA
POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Área de concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabela Fernanda Morales Martins, realizada em 24/05/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius (UFSCar)

Profa. Dra. Milene Nóbrega de Oliveira Moritz (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todo amor, provisão e cuidado constante demonstrado de forma sempre graciosa em minha vida. “Com efeito, grandes coisas fez o Senhor por nós; por isso, estamos alegres”. Salmos 126:3

À minha mãe Marisa, minha melhor amiga, por sempre acreditar e investir em mim. Sou muito grata por todo apoio, força, suporte durante toda minha jornada e por sempre lutar ao meu lado. Essa conquista também é sua!

À minha família pelo amor e cuidado de sempre. Em especial à Lau e ao Carlos, pelos conselhos e por serem um instrumento de Deus em minha vida.

Aos meus amigos pelas risadas, conversas, companheirismo e por serem minha família em São Carlos. Em especial à Bia, à Bianca e ao Dan por estarem sempre presente. Vocês tornaram os meus dias mais leves e alegres. Não conseguiria sem vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, pela orientação, paciência e ajuda. Obrigada por me receber em seu laboratório e por todo conhecimento transmitido que me fizeram crescer muito profissional e pessoalmente.

À equipe LBqC pela ajuda e por todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa concedida (Processo 88882.461700/2019-01), permitindo a realização desse projeto.

Meus sinceros agradecimentos!

**“Ó profundidade da riqueza, tanto da sabedoria como do conhecimento de Deus!
Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis, os seus caminhos!
Quem, pois, conheceu a mente do Senhor?”**

Romanos 11:33

RESUMO

A função canônica de complexos E3 ubiquitina ligases do tipo SCF é realizar a ubiquitinação de seus substratos, levando-os à degradação proteossomal ou à modulação de função, sendo as proteínas da classe F-box os componentes mais importantes desse complexo por garantir sua especificidade. Em 2012 foi descrito que a proteína Fbxo7 atua como regulador negativo na via de sinalização do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) em linhagem de osteosarcoma humano (U2OS). Essa via é regulada por diversos eventos de ubiquitinação e é responsável pela regulação da inflamação através da ativação da transcrição de genes envolvidos na resposta imune, incluindo as citocinas. Porém, até o presente momento não foi avaliado como a proteína Fbxo7 altera o perfil de citocinas reguladas por NF- κ B. Assim, o objetivo desse trabalho foi compreender o papel da proteína Fbxo7 na produção de citocinas em modelo celular THP-1 estimulado com lipopolissacarídeo (LPS). Como macrófagos auxiliam o direcionamento da resposta imune padrão através de citocinas, utilizamos a linhagem THP-1 diferenciada para esse estudo. Realizamos o *knockdown* de *FBXO7* por siRNA nessas células, estimulamos a via NF- κ B com LPS e avaliamos o perfil de 36 citocinas através de um *array* contendo anticorpos de captura para cada uma delas. Verificamos que houve uma redução na quantidade de CCL1, CCL3, IL-10 e IL-1 β nas células *knockdown* *FBXO7* quando comparadas ao controle. Considerando que IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória e é produzida majoritariamente por macrófagos, avaliamos também a expressão do gene *IL-1 β* por RT-qPCR. Notamos que, embora tenha ocorrido redução no nível proteico de IL-1 β , ocorreu um aumento na transcrição desse gene. Isso sugere que as células estão tentando compensar a redução dos níveis proteicos aumentando a expressão do gene. Além disso, verificamos que não houve alteração na transcrição de NF- κ B após o *knockdown* de *FBXO7*. Considerando que IL-1 β apresenta regulação pós-traducional, sugerimos um mecanismo de regulação da Fbxo7 na secreção de IL-1 β em células THP-1 diferenciadas estimuladas por LPS. Dessa forma, esse trabalho contribuiu para o entendimento do papel de mais uma proteína F-box na resposta imune.

Palavras-chave: Fbxo7, NF- κ B, LPS, citocinas, THP-1.

ABSTRACT

The canonical function of SCF E3 ubiquitin ligase complexes is the ubiquitination of their substrates, directing them to proteasomal degradation or modulation of function. From these complexes, F-box protein class is the most important component due to their substrate recognition, which ensures the specificity of the complex. In 2012, it was described that Fbxo7 acts as a negative regulator in the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway in human osteosarcoma cell line (U2OS). This pathway is regulated by several ubiquitination events, thus being responsible for regulating inflammation via activation of genes involved in the immune response, including cytokines. So far it has not been evaluated whether Fbxo7 can regulate the cytokine profile through NF- κ B. Therefore, the aim of this work was to investigate the role of Fbxo7 in cytokine production using THP-1 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Since macrophages help to direct the standard immune response through cytokines, we used the differentiated THP-1 lineage for this study. We performed *FBXO7* knockdown by specific siRNA in these cells and stimulated the NF- κ B pathway with LPS, followed by the evaluation of 36 cytokines through an array containing capture antibodies for each cytokine. We verified a reduction in the amount of CCL1, CCL3, IL-10 and IL-1 β in *FBXO7* knockdown cells when compared to the control. Considering that IL-1 β is a potent pro-inflammatory cytokine and is produced mostly by macrophages, we also evaluated the expression of the IL-1 β gene by RT-qPCR. We noticed that, although there was a reduction in the protein level of IL-1 β , there was an increase in transcription of this gene, which may suggest that cells are trying to compensate the reduction in protein levels by increasing gene expression. In addition, we did not find any change in the transcription of NF- κ B after the knockdown of *FBXO7*. Considering that IL-1 β is post-translationally regulated, we suggest a regulatory mechanism of Fbxo7 for IL-1 β secretion by LPS-stimulated, differentiated THP-1 cells. Thus, this work contributed for the understanding of the role of another F-box protein in the immune response.

Keywords: Fbxo7, NF- κ B, LPS, cytokines, THP-1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo esquemático do Sistema Ubiquitina-Proteassoma.
- Figura 2.** Modelo esquemático do complexo SCF formado pelas proteínas Skp1, Cullin 1, Rbx1 e F-box e ubiquitinação de um substrato por E3 ubiquitina ligase do tipo SCF.
- Figura 3.** Estrutura da proteína Fbxo7 e as funções de seus domínios
- Figura 4.** Via clássica de ativação de NF- κ B por TNF- α .
- Figura 5.** Via clássica de ativação de NF- κ B por LPS.
- Figura 6.** Regulação molecular de citocinas pró-inflamatórias mediada pelas proteínas Fbx12 e Fbxo3.
- Figura 7.** Esquema do mecanismo geral do *Human Cytokine Array*.
- Figura 8.** Avaliação da morfologia de THP-1 sob tratamento com PMA.
- Figura 9.** Conteúdo de Fbxo7 em células THP-1 tratadas com PMA.
- Figura 10.** *Knockdown* de *FBXO7* por siRNA.
- Figura 11.** Citocinas diferencialmente expressas em células THP-1 *knockdown* de *FBXO7* estimulada com LPS.
- Figura 12.** Citocinas alteradas pelo *knockdown* de *FBXO7* após estímulo por LPS.
- Figura 13.** Expressão de TNF- α e IL-6 em THP-1 controle ou *knockdown* para *FBXO7* estimulada com LPS.
- Figura 14.** *Knockdown* do gene *FBXO7* por siRNA em THP-1 em células tratadas com LPS ou TNF- α .
- Figura 15.** Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* sem estímulo de LPS ou TNF- α .
- Figura 16.** Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* com estímulo de LPS.
- Figura 17.** Curva padrão de diluição das amostras utilizadas para quantificação de IL-1 β presente no sobrenadante celular de THP-1 estimulada por LPS.

Figura 18. Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* com estímulo de TNF- α .

Figura 19. Integridade do RNA total extraído de células THP-1 estimuladas com LPS.

Figura 20. Amplificações dos genes *ACTB*, *FBXO7*, *NF-kB*, *RPL37A*, *IL-8*, *IL-1 β* e *GAPDH* de células THP-1 estimulada com LPS.

Figura 21. Curva de *melting* dos genes *ACTB*, *FBXO7*, *NF-kB*, *RPL37A*, *IL-8*, *IL-1 β* e *GAPDH* de células THP-1 estimulada.

Figura 22. Expressão gênica relativa de *FBXO7*, *IL-1 β* , *NF-kB* e *IL-8* em THP-1 estimulada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências e nomenclaturas dos siRNAs controle e para o *knockdown* de *FBXO7*.

Tabela 2 - Nome e sequências dos *primers* dos genes normalizadores utilizados para RT-qPCR.

Tabela 3- Nome e sequência dos *primers* utilizados para RT-qPCR.

Tabela 4: Citocinas expressas por THP-1 diferenciadas após estímulo com LPS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB: Beta actina

APC: Célula apresentadora de antígeno

BSA: Albumina bovina sérica

CCL1: Ligante 1 de quimiocina com motivo CC

CCL2: Ligante 2 de quimiocina com motivo CC

CCL3: Ligante 3 de quimiocina com motivo CC

CCL5: Ligante 5 de quimiocina com motivo CC

Cdk: Ciclina dependente de quinase

Cdk6: Ciclina dependente de quinase 6

cIAP1/2: Inibidor de apoptose proteína 1

COX-2: Ciclo-oxigenase 2

Cq: *Quantification cycle*

CXCL1: Ligante 1 de quimiocina com motivo CXC

CXCL10: Ligante 10 de quimiocina com motivo CXC

CXCL11: Ligante 11 de quimiocina com motivo CXC

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DP: Doença de Parkinson

DUB: Enzima deubiquitinase

E1: Enzima ativadora de ubiquitina

E2: Enzima conjugadora de ubiquitina

E3: Ubiquitina ligase

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Fbx12: *F-box and leucine rich repeat protein 2*

Fbxo3: *F-box only protein 3*

Fbxo7: *F-box only protein 7*

FP: Domínio de interação Fbxo7/PI31

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSK3 β : Glicogênio sintase quinase 3 β

HECT: *Homologous to E6-associated protein C-terminus*

ICAM-1: Molécula de adesão intracelular 1

IFN: Interferon

IL: Interleucina
IL-1 α : Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-2: Interleucina 2
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-14: Interleucina 14
LPS: Lipopolissacarídeo
LUBAC: Complexo de montagem de cadeia de ubiquitina linear
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MIF: Fator de inibição da migração de macrófagos
MIQE: *Minimum Information for publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*
Myd88: Resposta primária da diferenciação mielóide 88
NEMO: Modulador essencial de NF- κ B
NF- κ B: Fator de transcrição nuclear *kappa B*
NK: *Natural Killer*
NLRP3: Domínio pirina da família NLR
PBS: Tampão fosfato salino
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PHD/U-box: *Plant Homeodomain/U-box*
PI31: Inibidor proteossomal
PINK1: Quinase 1 induzida por PTEN
PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato
qPCR: PCR quantitativo
Rbx1: *RING-box protein*
RING: *Really Interesting New Gene*
RIP1: Serina/treonina-proteína quinase 1
RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RPL37A: Proteína Ribossômica 60S L37a
RT: Transcrição reversa
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

shRNA: *Short hairpin RNA*

Skp1: Proteína associada à quinase da fase S1

siRNA: *small interfering RNA*

TAB1: *TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1*

TAB2: *TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2*

TAK1 ou MAP3K7: *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*

TGF: Fator de crescimento transformador

THP-1: Linhagem celular monocítica humana de leucemia

TLR4: *Toll-like 4*

Tm: Temperatura de *melting*

TNFR1: Receptor do fator de necrose tumoral 1

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRADD: Proteína do domínio DEATH associada ao fator de necrose tumoral

TRAF: Proteínas do fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TRAF2: Fator 2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TRAF6: Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TTBS: *Tween-Tris-buffered saline*

U2OS: Células epiteliais de osteossarcoma ósseo humano

UB1: Domínio do tipo ubiquitina

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1. Sistema Ubiquitina-Proteassoma | 17 |
| 1.2. A proteína Fbxo7 | 20 |
| 1.3. Fbxo7 e a via de sinalização NF- κ B | 22 |
| 1.4. Citocinas | 26 |
| 1.5. Macrófagos e linhagem celular THP-1 | 25 |
| 1.6. Proteínas F-box e regulação da expressão de citocinas | 27 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 30 |
| Objetivo Geral | 30 |
| Objetivos Específicos | 30 |
| 4. METODOLOGIA | 32 |
| 4.1. Obtenção e cultivo de THP-1 | 32 |
| 4.1.2 Diferenciação de THP-1 | 32 |
| 4.2. Avaliação da diferenciação celular e do perfil de expressão da Fbxo7 endógena por <i>Western Blotting</i> | 32 |
| 4.2.1. Lise Celular | 29 |
| 4.2.2. <i>Western Blotting</i> | 30 |
| 4.3. Avaliação do perfil de citocinas | 34 |
| 4.3.1. Transfecção de siRNA para o gene <i>FBXO7</i> em THP-1 | 34 |
| 4.3.2. Estímulo com LPS | 35 |
| 4.3.3. <i>Western Blotting</i> | 35 |
| 4.3.4. <i>Human Cytokine Array</i> | 35 |
| 4.4. Estímulo com TNF- α | 36 |
| 4.5. Quantificação de IL-1 β por ELISA | 37 |
| 4.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR | 37 |
| 4.6.1. Extração de RNA | 37 |
| 4.6.2. Síntese de cDNA | 38 |
| 4.6.3. PCR em tempo real (qPCR) | 38 |
| 4.6.3.1. Genes de referência | 38 |
| 4.6.3.2. Padronização da concentração dos <i>primers</i> | 39 |
| 4.6.3.3. Procedimento da qPCR | 40 |
| 4.7. Análise dos Dados | 40 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. Diferenciação celular de THP-1 e expressão da proteína Fbxo7 nas células diferenciadas | 42 |
| 5.2. Silenciamento do gene <i>FBXO7</i> por siRNA | 44 |
| 5.3. Perfil de citocinas produzidas por THP-1 diferenciadas e estimuladas por LPS em células <i>knockdown</i> de <i>FBXO7</i> | 45 |
| 5.4. Ativação da via NF-kB em células THP-1 estimuladas por TNF- α | 52 |
| 5.3. Quantificação por ELISA de IL-1 β presente no sobrenadante de células THP-1 estimuladas com LPS ou TNF- α | 54 |
| 5.4. Análise da expressão gênica por RT-qPCR de THP-1 estimulada por LPS em células <i>knockdown</i> de <i>FBXO7</i> | 58 |
| 6. CONCLUSÃO E CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO | 66 |
| 7. REFERÊNCIAS | 68 |

1.INTRODUÇÃO

1.1.Sistema Ubiquitina-Proteassoma

Proteínas são mediadoras efetivas da maioria das funções celulares, correspondendo a mais de 50% do peso seco celular (MILO; PHILLIPS, 2016). A complexa interação entre a síntese proteica, dobramentos, tráfego e sua degradação é chamada de homeostase de proteínas. Dessa forma, o controle da disponibilidade proteica no ambiente celular bem como a execução precisa de cada etapa de regulação nos níveis de proteína são importantes para a manutenção da homeostasia e resposta celular. A síntese proteica e sua degradação permitem a substituição das proteínas, além de promover a alteração da composição proteica em resposta a um estímulo (POWERS *et al.*, 2009; ALBER; SUTER, 2019). Nas células há dois principais mecanismos de proteólise: o sistema lisossomal, onde ocorre a degradação das proteínas nessas organelas, e o Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP).

O SUP é o principal mecanismo de proteólise intracelular eucariótico, sendo responsável por cerca de 90% da degradação de proteínas citoplasmáticas e nucleares (SOROKIN; KIM; OVCHINNIKOV, 2009). É um mecanismo altamente seletivo que promove a degradação de proteínas específicas que foram previamente marcadas. Esse processo consiste na conjugação covalente de moléculas de ubiquitina a uma proteína-alvo e corresponde a uma das modificações pós-traducionais mais importantes e prevalentes encontradas nas células, desempenhando papéis versáteis no metabolismo de proteína, apoptose, ciclo celular e transcrição (WANG *et al.*, 2018). Ubiquitinas são polipeptídeos de 76 resíduos de aminoácidos que apresentam sete resíduos de lisina em sua estrutura (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63), os quais podem ser utilizados para formação de cadeias de ubiquitina (KOMANDER, 2009; HERHAUS; DIKIC, 2015). Pode ocorrer a adição de apenas uma ubiquitina no sítio da proteína-alvo (monoubiquitinação) ou a formação de cadeias de poliubiquitina. Dependendo de qual resíduo de lisina ocorra a conjugação de ubiquitinas, conformações estruturais diferentes serão geradas no alvo e estas mediarão diferentes sinalizações celulares. Por exemplo, a monoubiquitinação está relacionada à regulação da função das histonas, já a conformação estendida das cadeias do tipo K63 induzem a proteína-alvo à modulação funcional, e cadeias K48 de conformação globular sinalizam para a célula que as proteínas marcadas devem ser levadas a degradação mediada pelo proteassoma 26S (NEWTON *et al.*, 2008; KOMANDER, 2009, WICKLIFFE *et al.*, 2011).

A conjugação da ubiquitina a seus substratos requer a ação coordenada de três componentes enzimáticos (**Figura 1**): enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ubiquitina-ligase (E3). Mediante reação dependente de ATP, a E1 ativa a ubiquitina e a transfere à E2. Já as enzimas E3 apresentam sítios para ligação da E2 e de interação com substratos específicos, transferindo a ubiquitina conjugada a E2 para um grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina da proteína-alvo ou a um grupo amino de uma ubiquitina anteriormente ligada ao substrato, através de uma ligação isopeptídica (KOMANDER; RAPE, 2012).

Todavia, a ubiquitinação é um processo reversível, uma vez que existem enzimas chamadas deubiquitinases (DUBs) que catalisam a retirada de ubiquitina da proteína-alvo (NIJMAN *et al.*, 2005). Porém as funções das DUBs não se limitam apenas em reverter a ubiquitinação das proteínas marcadas para a degradação via proteassomal 26S. Estão envolvidas no tráfego de proteínas, regulação do ciclo celular, remodelação da cromatina, modulação da atividade das proteínas e das vias de sinalização (KOMANDER; CLAGUE; URBE, 2009; FRAILE *et al.*, 2012). Portanto, tanto as E3 ubiquitina ligases quanto as DUBs são extremamente importantes para a regulação de variados processos celulares e falhas nesse controle resultam em doenças como câncer e neurodegeneração (POPOVIC; VUCIC; DIKIC, 2014).

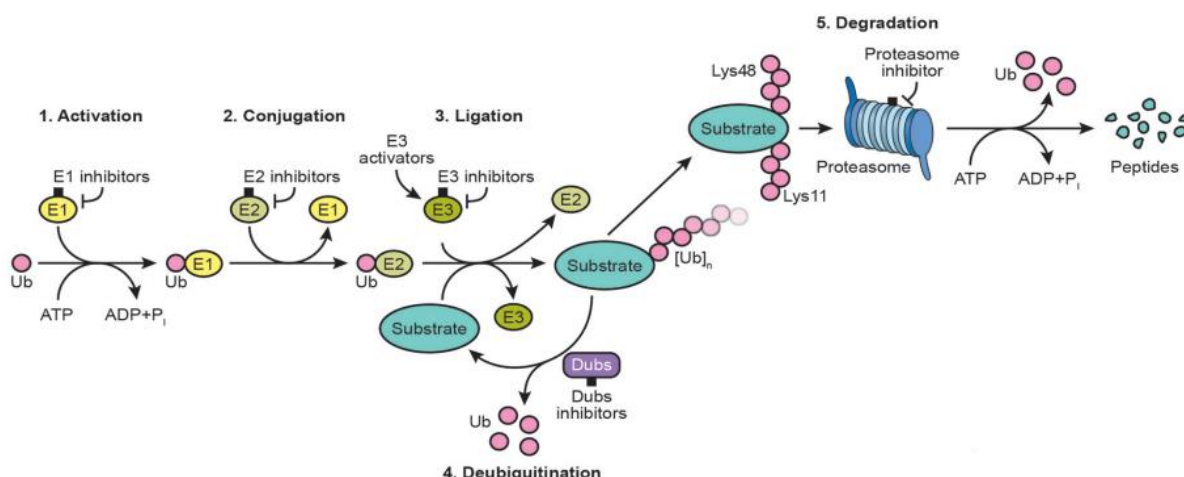


Figura 1. Modelo esquemático do Sistema Ubiquitina-Proteassoma. A ubiquitina é ativada pela enzima E1 e em seguida é transferida para E2 para que se ligue a E3, transferindo a ubiquitina para o substrato. As E3 catalisam a ligação da ubiquitina a proteína-alvo, a qual, dependendo do tipo de cadeia de ubiquitina adicionada, será destinada a degradação proteassomal ou à modulação funcional. Em contrapartida, enzimas DUBs podem remover as ubiquitinas adicionadas e alterar assim o sinal anteriormente gerado. Fonte: Modificado de HUANG; DIXIT, 2016.

O genoma humano codifica apenas duas enzimas E1 (UBA1 e UBA6), aproximadamente 30 enzimas de conjugação E2 e mais de 600 ligases E3 ubiquitina ligases (WIJIK; TIMMERS, 2010). As enzimas E3 podem ser divididas em três famílias principais, dependendo da estrutura de seu domínio catalítico e o modo de catálise: HECT (*Homologo f the E6-AP Carboxyl Terminus*), RING (*Really Interesting New Gene*) e PHD/U-box (Plant Homeodomain/U-box) (BERNDSSEN; WOLBERGER, 2014). A maioria das E3 ligases pertence à família RING (DESHAIES; JOAZEIRO, 2009), e essa família é composta em sua maioria por complexos SCF. O complexo SCF é composto por proteína associada à quinase da fase S1 (Skp1), RING-box protein (Rbx1), Cullin 1 e proteínas do tipo F-box, as quais apresentam um domínio com esse nome (FRESCAS; PAGANO, 2008) como indicado na **Figura 2**. A proteína F-box corresponde ao componente mais importante do complexo SCF por ser responsável pelo reconhecimento do substrato garantindo a especificidade do complexo (XIE, JIN, WANG, 2019).

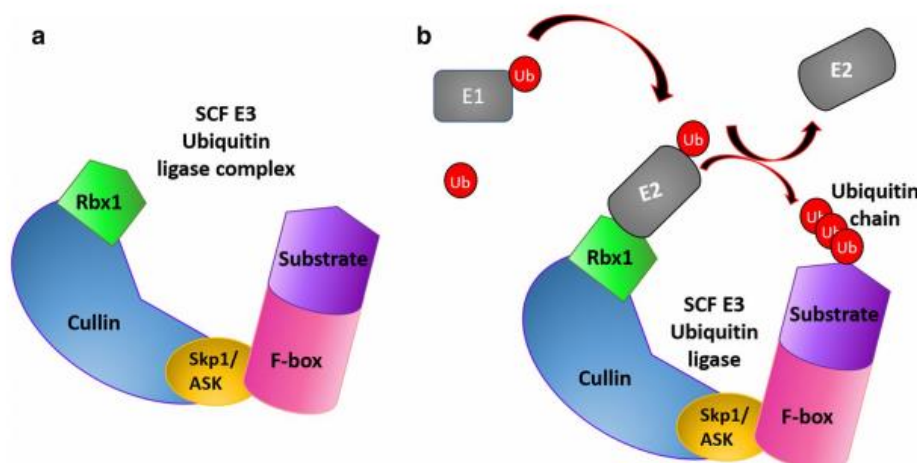


Figura 2. A) Modelo esquemático do complexo SCF formado pelas proteínas Skp1, Cullin 1, Rbx1 e F-box. B) Ubiquitinação de um substrato por E3 ubiquitina ligase do tipo SCF. Fonte: HAMID *et al.*, 2020.

As proteínas F-box (PFB) além do domínio F-box de interação com Skp1, possuem outro domínio de interação com seus substratos e por isso são classificadas em três subfamílias: as FBXL, com domínio rico em leucina; FBXW com domínio rico em triptofano e ácido aspártico e por fim, FBXO que possuem outros domínios de interação com substrato (CENCIARELLI *et al.*, 1999). O genoma humano codifica cerca de 22 FBXL, 10 FBXW e 37 FBXO (TEKCHAM *et al.*, 2020). Dentre as 69 proteínas F-box, a Fbxo7 é a quinta mais abundante encontrada em complexo SCF em células humanas (Lee *et al.*, 2011).

1.2. A proteína Fbxo7

Embora a Fbxo7 possa ser parte de um complexo SCF(Fbxo7) e desempenhar sua função canônica de ubiquitinar seus substratos, vários de seus ligantes não são ubiquitinados por ela, exercendo funções não-canônicas de regulação de processos celulares (NELSON; RANDLE; LAMAN, 2013) (**Figura 3B**). A primeira função não-canônica de Fbxo7 foi verificada na regulação do ciclo celular em células de fibroblasto murino interagindo com uma ciclina D viral oncogênica, especificamente com Cdk6, sendo essencial para a formação do complexo Cdk/ciclina entre Cdk6/ciclinaD. As ciclinas virais são capazes de ativar de forma robusta as Cdks da fase G1, induzindo essas

células à fase S. Além disso verificaram que a superexpressão de *Fbxo7* em fibroblastos murinos induziu a formação de tumores mediante a indução desse complexo. Assim, a *Fbxo7* foi descrita como um potencial proto-oncogene (**Figura 3B**) (LAMAN *et al.*, 2005).

Fbxo7 também tem sido associada como regulador da atividade proteassomal interagindo com alta afinidade através de seu domínio FP (**Figura 3A**) com a proteína PI31, um inibidor de proteassoma, sugerindo assim, a participação de *Fbxo7* na regulação desse complexo (**Figura 3B**) (KIRK *et al.*, 2008).

Mutações no gene *FBXO7* estão relacionadas a variadas patologias humanas, incluindo câncer, distúrbios sanguíneos e doença de Parkinson (DP) (LAMAN *et al.*, 2005; NELSON *et al.*, 2013; RANDLE; LAMAN, 2016). Mutações autossômicas recessivas em *PARK15* (*FBXO7*) foram observadas pela primeira vez através da análise do genoma de famílias afetadas por essa doença, de modo que os pacientes apresentavam o fenótipo clássico de DP (SHOJAEI *et al.*, 2008). Várias mutações em *FBXO7* já foram encontradas em pacientes, dentre elas: T22M, R378G e R498X (**Figura 3A**) (SHOJAEI *et al.*, 2008; LOHMANN *et al.*, 2015). Essas mutações alteram a interação da *Fbxo7* com proteínas parceiras, afetando diferentes processos celulares como, por exemplo, a mitofagia (**Figura 3A**), exercendo assim um papel fundamental para a manutenção do controle de qualidade mitocondrial (MATSUDA *et al.*, 2010; JOSEPH *et al.*, 2018).

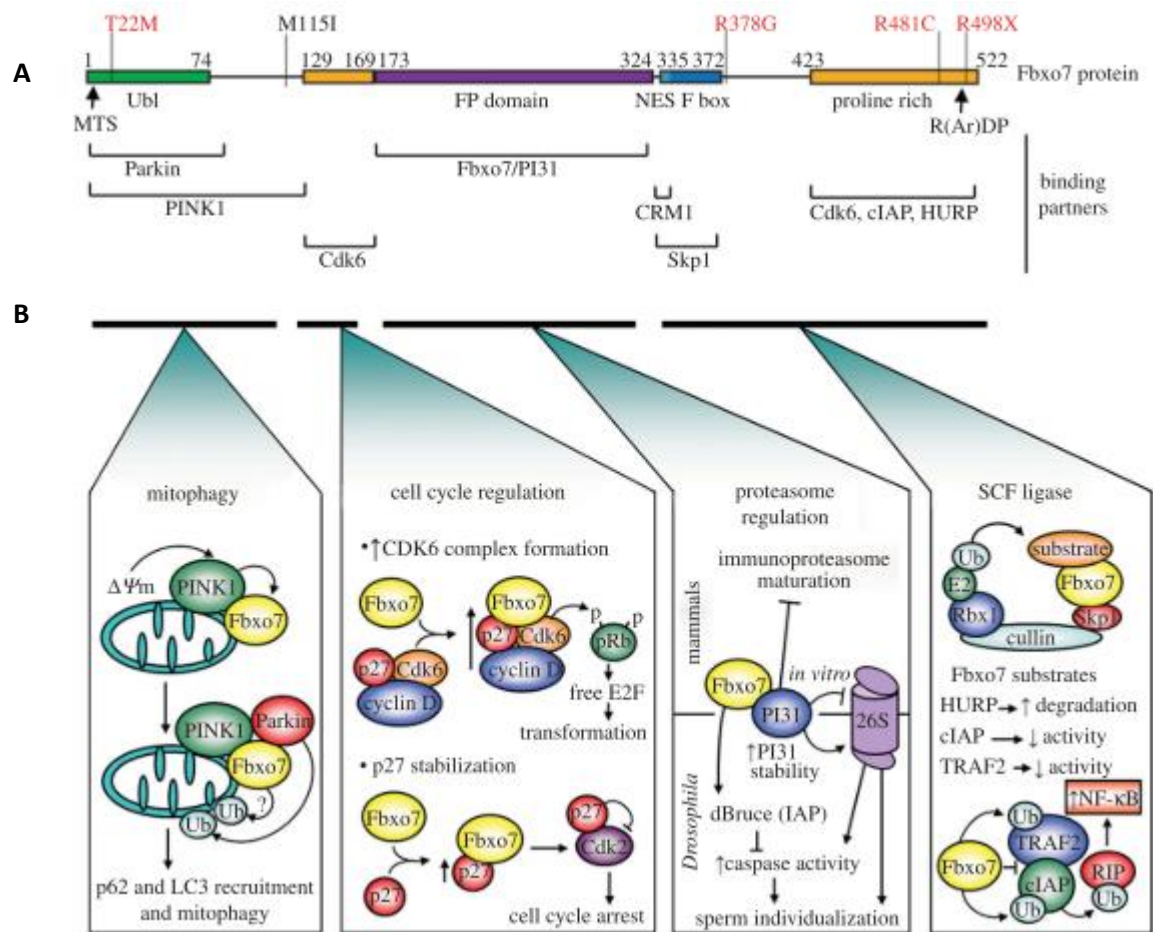


Figura 3. Estrutura da proteína Fbxo7 e as funções de seus domínios. **A)** Estrutura da isoforma 1 de Fbxo7. As barras indicam os domínios de interações com outras proteínas, sendo Ub1 domínio do tipo ubiquitina; FP domínio de interação Fbxo7/PI31 e R(Ar)DP o motivo R onde Ar é um aminoácido aromático. Em vermelho estão representadas as mutações patogênicas ligadas à DP. **B)** Funções de cada domínio da proteína Fbxo7, as quais são divididas em não-canônicas (mitofagia, regulação do ciclo celular e regulação do proteossomal) e canônicas (complexo SCF ligase). Fonte: Modificado de NELSON; RANDLE; LAMAN, 2013.

1.3. Fbxo7 e a via de sinalização NF-κB

A proteína Fbxo7 também foi associada à regulação da via de sinalização do fator de transcrição nuclear κB (NF-κB), a qual é regulada por diversos eventos de ubiquitinação (KUIKEN *et al.*, 2012). Os fatores de transcrição nuclear são compostos por proteínas que se ligam à região promotora dos genes ativando o processo transcricional de genes alvo (XIAO, 2004). A família do NF-κB desempenha um papel

crucial em eventos celulares como diferenciação e proliferação celular, apoptose, bem como a regulação da inflamação aguda mediante a ativação e produção de mediadores pró-inflamatórios (LI *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005; HOESEL; SCHMID, 2013). Essa família consiste em cinco subunidades: p65 (RelA), cRel, RelB, p50 e p52, as quais se formam homo ou heterodímeros, resultando em dímeros ativadores (RelA/p50) ou repressores (p50/p50 e p52/p52) da expressão gênica, sendo o heterodímero RelA/p50 o mais abundante (MEFFERT; BALTIMORE, 2005; MALEK *et al.*, 2007). Quando não estimulado, o NF- κ B se encontra no citoplasma conjugado ao I κ B, uma proteína inibitória que impede sua translocação para o núcleo e consequentemente a ativação transcricional (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; SIEBENLIST, 1997).

Há duas vias descritas para a ativação de NF- κ B: a via canônica (clássica) e a via não-canônica (alternativa). A via canônica é a mais comum e está relacionada à expressão de genes pró e anti-inflamatórios, à resposta imune inata e à sobrevivência celular (XIAO, 2004). Sua forma de ativação mais estudada é aquela promovida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α). A ligação do TNF- α em seu receptor cognato TNFR1 (receptor do fator de necrose tumoral 1) promove a trimerização deste e o rápido recrutamento de um complexo multiproteico de sinalização composto por TRADD, TRAF2, cIAP1/2 e RIP1 (**Figura 4**). Este por sua vez, recruta o complexo linear de montagem de cadeia de ubiquitina chamado LUBAC, o qual é composto por E3 ubiquitina-ligase e responsável pela ubiquitinação do modulador essencial do NF- κ B (NEMO). Este processo resulta na ativação de IKK, o qual será responsável por fosforilar I κ B, destinando-o a interação com a E3 ligase SCF(β -TrCP) que promove sua ubiquitinação e consequente degradação proteossomal. Dessa forma, NF- κ B se desloca para o núcleo da célula e promove a ativação da transcrição gênica (CHAN, 2007; WAJANT; SCHEURICH, 2011).

Um estudo de 2012 verificou que em células epiteliais de osteossarcoma ósseo humano (U2OS) a Fbxo7 realiza a ubiquitinação de cIAP1 e TRAF2. TRAF2 atua como proteína adaptadora, a qual se liga ao adaptador TRADD e recruta cIAP1/2 ao receptor TNFR1. Por sua vez, cIAP1/2 é responsável por promover a poliubiquitinação via K63 de RIP1, resultando na ativação de IKK e, consequentemente, na degradação de I κ B e translocação de NF- κ B para o núcleo. Logo, com a ubiquitinação de cIAP1 e TRAF2 pela Fbxo7, há uma redução na ubiquitinação de RIP1 e na ativação de IKK, resultando, em uma menor ubiquitinação e degradação do inibidor I κ B e, portanto, reduzindo a expressão dos genes regulados por NF- κ B (KUIKEN *et al.*, 2012).

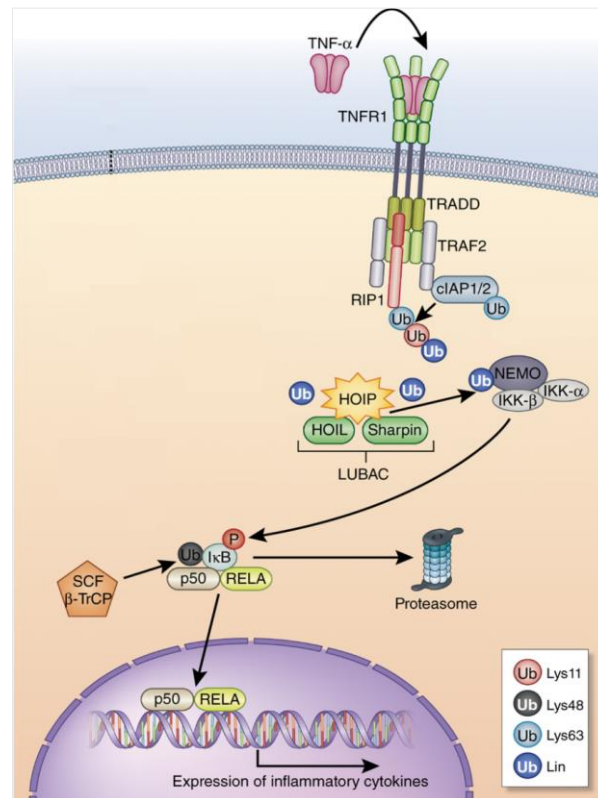


Figura 4. Via clássica de ativação de NF- κ B por TNF- α . A ligação de TNF- α em seu receptor cognato TNFR1 desencadeia uma cascata de reações dependentes de ubiquitinação que resultam na ativação e translocação do NF- κ B para o núcleo celular, e, consequentemente, na expressão de genes pró e anti-inflamatórios. Fonte: Modificado de POPOVIC *et al.*, 2014.

Outro fator importante de ativação do NF- κ B ocorre através de lipopolissacarídeo (LPS) (**Figura 5**). Este é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas, correspondendo a um padrão molecular associado ao patógeno (PAMPs) conservado ao longo da evolução. Sua liberação ocorre a partir da proliferação das bactérias ou quando estas são fagocitadas por células de defesa (TUIN *et al.*, 2006) e seu reconhecimento é mediado por outras proteínas, como proteína ligante de LPS (LBP), proteína mieloide diferenciadora 2 (MD-2) e proteína *cluster* de diferenciação 14 (CD14), as quais transferem o LPS para o receptor denominado *Toll-like* 4 (TLR4) (AKIRA; TAKEDA, 2004). Posteriormente, há o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas por interações domínio-domínio específicas através da via dependente ou

independente da proteína Myd88 (resposta primária da diferenciação mieloide 88), sendo que ambas as vias convergem para ativação do IKK. Na via dependente de Myd88, esta proteína adaptadora se liga às proteínas IRAKs e promove a ativação das mesmas. Em seguida, essas proteínas se dissociam de Myd88 e interagem com a TRAF6 (fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral), a qual se autoubiquitina e recruta um complexo de quinase composto por TAK1, TAB1 e TAB2 (DENG *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001). Esse complexo ativa IKK, o qual fosforila I κ B e recruta a E3 ligase SCF(β -TrCP) para mediar a degradação proteossomal de I κ B, permitindo por fim, a translocação do NF- κ B para o núcleo celular e sua ativação transcricional (KAWAI; AKIRA, 2006; CARMODY; CHEN, 2007).

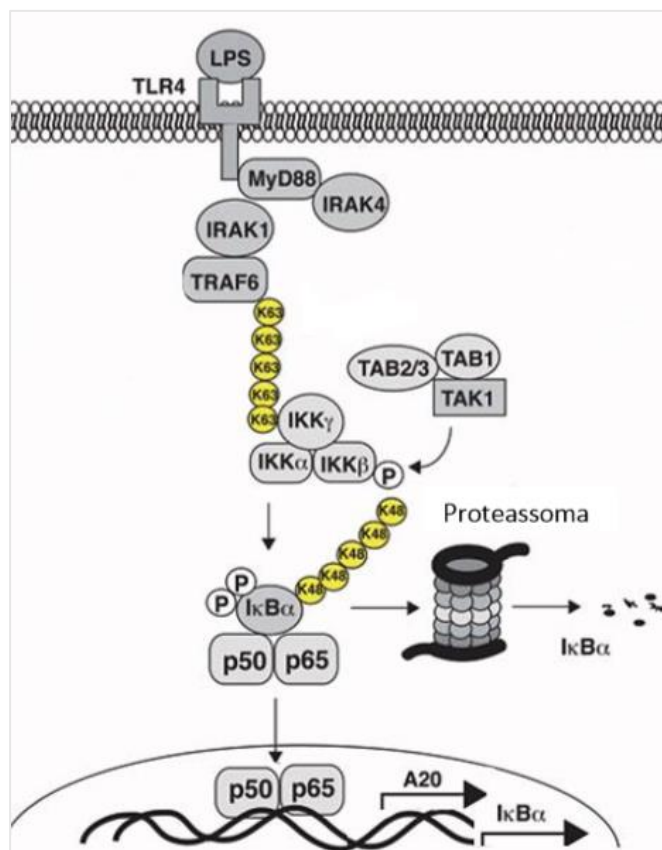


Figura 5. Via clássica de ativação de NF- κ B por LPS. A ligação do LPS no receptor TLR4 resulta no recrutamento de proteínas que serão responsáveis pela ativação de IKK e consequente degradação proteossomal de I κ B. Sem o inibidor, NF- κ B migra para o núcleo celular e ativa a transcrição gênica. Fonte: Modificado de HARHAJ; DIXIT, 2011.

Seja a ativação de NF- κ B por TNF- α ou LPS, este fator de transcrição nuclear é responsável por regular a expressão de citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral),

e interleucinas (IL) 1 β , 2, 6, 8, 12, ligante 5 de quimiocina de motivo CC (CCL5), ligante 1 de quimiocina de motivo CXC (CXCL1), além de moléculas de adesão e enzimas como COX-2 e iNOX (ciclo-oxigenase 2 e óxido nítrico sintase indutível, respectivamente) (CHRISTMAN; LANCASTER; BLACKWELL, 1998).

1.4. Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas solúveis que regulam funções do sistema imunológico orquestrando a imunidade inata e adaptativa de modo a induzir a inflamação local e as respostas sistêmicas da fase aguda e crônica (HOLDSWORTH; GAN, 2015). Sua síntese tem início através da ativação transcricional de um gene após um determinado estímulo, sendo essa ativação transitória (SMALE; TARAKHOVSKY, 2014). São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por várias células do sistema imune, atuando de forma parácrina, nas células vizinhas, ou de modo autócrino, nelas mesmas (LIN; CALVANO, LOWRY, 2001).

As células-alvo das citocinas apresentam receptores específicos em sua membrana celular, os quais desencadeiam a ativação da sinalização intracelular após a ligação da citocina, resultando, posteriormente, em modificações na transcrição gênica. Desse modo, essas proteínas apresentam a capacidade de modificar a proliferação, diferenciação e demais funções celulares particulares (BERRAONDO *et al.*, 2018).

As citocinas desempenham papéis fundamentais no sistema imune inato em resposta à infecção ou lesão tecidual por promover a resposta inflamatória aguda. Assim, as principais citocinas inatas agudas, tais como IL-1, TNF- α , IL-12, atuam ativando células endoteliais, células dendríticas e leucócitos, resultando na liberação de quimiocinas e recrutando demais células para o local. Além disso, promovem o aumento da expressão de moléculas de adesão, alterando a permeabilidade vascular e facilitando o acúmulo de outras proteínas. Desse modo, o antígeno é processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos (APC) a outras células para dar início à imunidade adaptativa (HOLDSWORTH; GAN, 2015). Em contrapartida, citocinas como IL-10, 13, 14 apresentam ação anti-inflamatória, atenuando a inflamação gerada e induzindo o reparo (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997) de modo a antagonizar de maneira orquestrada os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, regulando assim, a intensidade e duração da resposta imune (JAFFER, WADE; GOURLAY, 2010).

Além disso, determinadas citocinas podem induzir a síntese de outras, levando a uma cascata onde a segunda ou terceira citocina pode mediar a função biológica da

primeira. Há também o mecanismo de pleiotropia, onde células diferentes secretam a mesma citocina e esta pode agir em diversos tipos celulares. Podem ser também redundantes em suas atividades, isto é, diferentes citocinas podem desencadear ações semelhantes (ZHANG, 2007). A capacidade de uma citocina em estimular ou inibir a produção de outras, corresponde a um importante sistema de regulação para a resposta imune e inflamatória, visto que a ausência desse controle resulta em lesão tecidual (HOLDSWORTH; GAN, 2015).

A nomenclatura das citocinas tem evoluído constantemente devido à redundância de função dessas proteínas e à capacidade de leucócitos e células do parênquima tecidual em produzi-las, tornando suas definições imprecisas. Recentemente o termo IL (interleucina) associado à um número tem sido atribuído para classificar as citocinas com base na homologia de sequência e semelhança de seus receptores, bem como suas propriedades funcionais (HOLDSWORTH; GAN, 2015; AKDIS *et al.*, 2016). No entanto, a nomenclatura de algumas citocinas persiste como TNF, interferons (IFN), fatores de crescimento transformador (TGF), entre outros (HOLDSWORTH; GAN, 2015).

1.5. Macrófagos e linhagem celular THP-1

Os monócitos e macrófagos desempenham um papel fundamental durante as respostas imunes, orquestrando diferentes processos fisiológicos e patológicos (GORDON; PLÜDDEMANN; MARTINEZ, 2014). Ao receber um estímulo local, os monócitos circulantes na corrente sanguínea migram para o local de infecção ou inflamação, onde diferenciam-se em macrófagos (HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019) e passam a desempenhar funções específicas, tais como: fagocitose de antígenos estranhos ao organismo e a apresentação destes a outras células, ação microbicida e alta capacidade biossintética de citocinas, fatores de crescimento, de coagulação e prostaglandinas, produzindo, portanto, mediadores que interferem na resposta imune (GEISSMANN *et al.*, 2010; NIKITA *et al.*, 2018). Por essas razões, os macrófagos são alvos interessantes para a pesquisa básica e clínica. No entanto, essas células não apresentam expansão *ex vivo* adequada o que limita sua quantidade para estudos funcionais (LORKOWISK *et al.*, 2001).

Desse modo, a linhagem celular monocítica humana de leucemia (THP-1) tem sido amplamente utilizada para estudos com monócitos e macrófagos. Isso é possível, porque essas células podem ser diferenciadas PMA, adquirindo assim características

fenotípicas e funcionais de macrófagos humanos primários (FENG *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2007), permitindo seu estudo no estágio normal e ativado. Além disso, THP-1 tem sido utilizada para avaliar o efeito da resposta inflamatória mediada por LPS, pois, embora essa linhagem seja imortalizada, a assinatura de sua expressão gênica após estimulação por LPS é muito semelhante aos dos macrófagos humanos primários (SHARIF *et al.*, 2007). Logo, a linhagem THP-1 representa um modelo útil para elucidar respostas de macrófagos a estímulos inflamatórios além de facilitar os estudos bioquímicos por constituírem uma população homogênea (CHANPUT *et al.*, 2010).

1.6. Proteínas F-box e regulação da expressão de citocinas

Em 2013, MALLAMPAPALLI *et al.*, demonstraram o papel de proteínas F-box na regulação da expressão de citocinas (**Figura 6**). Verificaram que Fbxo3 e Fbxl2 regulam a secreção de citocinas mediante a estabilização de proteínas do fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF). Estas são proteínas adaptadoras que medeiam a transdução de sinal proveniente de receptores TNFR e TLR de modo a promover a ativação do NF- κ B, ativando rapidamente a expressão gênica (RICKERT, R; JELLUSOVA, J; MILETIC, 2011). Porém, a ausência de controle da liberação de citocinas mediadas por TRAF pode causar choque anafilático, graves edemas e falência múltipla de órgãos (LONDON *et al.*, 2010).

Constataram em uma linhagem de pulmão de camundongo que seis proteínas TRAF (TRAF 1-6) são substratos de Fbxl2, a qual destina essas proteínas à degradação proteossomal. Além disso, verificaram que o *knockdown* de *FBXL2* em macrófagos (U937) resultou em um aumento de proteínas TRAF nessas células e, conseqüentemente, um aumento na expressão de citocinas após exposição ao LPS. Esses dados sugerem que Fbxl2 atua como um repressor do processo inflamatório por reduzir a secreção de citocinas (MALLAMPAPALLI *et al.*, 2013).

Em contrapartida, observaram que Fbxo3 tem como alvo a ubiquitinação para degradação de Fbxl2, sendo esse processo facilitado pela glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β). Verificaram também que a superexpressão de *FBXO3* em células U937 diminuiu os níveis de Fbxl2 e aumentou os níveis de TRAF1-6. Desse modo, Fbxo3 atua como um regulador positivo na produção de citocinas pró-inflamatórias ao destinar Fbxl2 para a degradação proteossomal (MALLAMPAPALLI *et al.*, 2013).

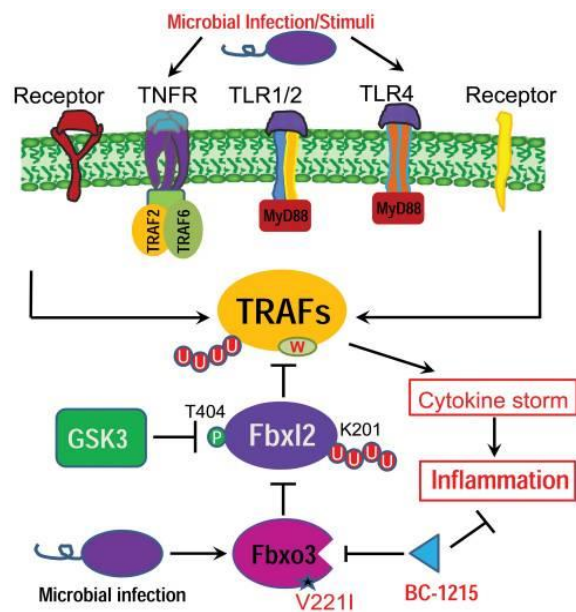


Figura 6. Regulação molecular de citocinas pró-inflamatórias mediada pelas proteínas Fbx12 e Fbxo3. Fbx12 atua como regulador negativo da secreção de citocinas por destinar proteínas TRAFs à degradação proteassomal. Em contrapartida, Fbxo3 destina Fbx12 à degradação, aumentando assim a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Fonte: MALLAMPALLI *et al.*, 2013.

2. JUSTIFICATIVA

Embora tenha sido descrita a relação da proteína Fbxo7 atuando como regulador negativo na via NF- κ B em células U2OS após ativação por TNF- α , não foi avaliado até o momento como essa proteína altera o perfil de citocinas reguladas por NF- κ B. Como os macrófagos auxiliam o direcionamento da resposta imune padrão através de citocinas, utilizamos para esse estudo a linhagem celular THP-1 *knockdown* para *FBXO7* e estimulada por LPS para avaliar a função dessa proteína na produção das citocinas neste modelo celular. Assim, este projeto irá contribuir para o entendimento do papel da proteína Fbxo7 na resposta imune ao LPS através da análise do perfil de citocinas.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o papel da proteína Fbxo7 na produção de citocinas em linhagem celular THP-1 diferenciada após estímulo por lipopolissacarídeo.

Objetivos Específicos

- Verificar a expressão da Fbxo7 por *western blotting* em células THP-1 não-diferenciadas e diferenciadas por PMA (24, 48, 72h, 96h e 120h);
- Realizar *knockdown* de *FBXO7* por siRNA em THP-1 diferenciada;
- Estimular com LPS células THP-1 diferenciadas *knockdown* de *FBXO7*;
- Identificar e quantificar as citocinas expressas presentes no sobrenadante celular através de *Human Cytokine Array*;
- Quantificar por ELISA IL-1 β diferencialmente expressa pelo *knockdown* de *FBXO7*;
- Avaliar por RT-qPCR a expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-8*, *FBXO7* e *NF-kB* em células THP-1 *knockdown* de *FBXO7* estimuladas.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção e cultivo de THP-1

A linhagem celular de leucemia monocítica humana (THP-1, ATCC:TIB-202) utilizada foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Dario Simões Zamboni da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP), sendo cultivada em meio RPMI 1640 com glutamina (Gibco), 10% de SFB (Gibco) e 1% penicilina/streptomicina (100 µg/mL, Invitrogen) em atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada dois dias. Todos os ensaios foram realizados a partir de confluência celular de 80%.

4.1.2 Diferenciação de THP-1

Para a diferenciação em macrófagos, as células THP-1 foram incubadas com 10 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) diluído em meio RPMI (Gibco), em placas de seis poços (Kasvi) a uma concentração de 5×10^5 células/poço ou em placas de 100 mm (Corning) com 3×10^6 de células, durante 48h, tempo necessário para que a THP-1 adquira completamente o fenótipo e funcionalidade de macrófago (PARK *et al.*, 2007; LUND *et al.*, 2016). Após a diferenciação, o meio contendo PMA foi substituído por um meio RPMI completo e as células utilizadas em seguida.

4.2. Avaliação da diferenciação celular e do perfil de expressão da Fbxo7 endógena por *Western Blotting*

A fim de avaliar o perfil de expressão da proteína Fbxo7 na linhagem celular THP-1 sob indução da sua diferenciação por PMA, as células foram plaqueadas em placas de seis poços, a 5×10^5 células/poço, e expostas ao composto durante 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Como controle negativo, foram plaqueadas células não-diferenciadas na mesma concentração. A diferenciação celular foi monitorada e registrada através do *CytoSMART*TM (Lonza), cedido gentilmente pela Prof^a. Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, UFSCar. As imagens foram registradas a cada uma hora ininterruptamente por cinco dias.

4.2.1. Lise Celular

Para extração das proteínas, as células diferenciadas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) gelado e lisadas na própria placa com tampão de lise RIPA –

Modified radioimmunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS) com adição de inibidores de proteases (Sigma FAST) e fosfatases (Fluoreto de sódio 5 mM e Ortovanadato de sódio 2 mM). Já as células não-diferenciadas (em suspensão) foram centrifugadas e o *pellet* lavado com PBS, o qual foi centrifugado novamente e, posteriormente, lisado com tampão RIPA. Os lisados foram então coletados e mantidos por 30 minutos em gelo, e posteriormente, centrifugados a 14.000 x g. Os sobrenadantes contendo as proteínas foram recuperados e quantificados pelo reagente de *Bradford* (B1916, Sigma-Aldrich). Para isso, os extratos celulares clarificados foram diluídos em tampão de lise e adicionado o reagente de Bradford em placa de 96 poços para reação por 10 minutos protegida da luz. Em seguida, foi feita a leitura da placa pelo espectrofotômetro *Multiskan FC Microplate Photometer* (ThermoScientific) a 595 nm, utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações de 0,0625 a 0,5 mg/mL.

4.2.2. Western Blotting

O *input* (extrato total), 40 µg, foi resolvido em *SDS-PAGE* 10% (1mm). Após a separação eletroforética, o conteúdo proteico foi transferido para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) em sistema submerso no tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS diluído a 10%) utilizando a voltagem de 150V por 1h30m. Após a transferência, as membranas foram coradas com reagente *Ponceau* a fim de avaliar o conteúdo proteico, bem como a eficiência da transferência. Após a remoção do corante por tampão TTBS (1M Tris-HCl pH 7,2; 5M NaCl e 0,1% de Tween 20) as membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio (5% de leite ou BSA em TTBS) e em seguida incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-Fbxo7 (AB154098, ABCAM, diluição 1:1000) ou anti-GAPDH (G8795, Sigma, diluição 1:10000) a 4°C sob leve agitação. Novamente as membranas foram lavadas com TTBS e depois incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou mouse conjugados à peroxidase. As membranas foram então reveladas em *ChemiDoc Imaging System* (Bio-Rad) utilizando o *kit Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology). Por fim, a intensidade das bandas foi quantificada através do software *Image J* (W. Rasband, NIH, EUA).

4.3. Avaliação do perfil de citocinas

4.3.1. Transfecção de siRNA para o gene *FBXO7* em THP-1

As células THP-1 são consideradas difíceis de transfectar pelos métodos convencionais de reagentes de transfecção. Foi descrita transfecção viral nessas células (LEE *et al.*, 2004) e transfecção não-viral, tendo esta última resultado em perda de viabilidade e funcionalidade celular (MARTINET *et al.*, 2004). A nucleofecção com protocolo adaptado é a técnica descrita mais adequada para transfecção de THP-1 até o momento (SCHONOR *et al.*, 2009). No entanto, otimizamos um protocolo de transfecção utilizando o reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen) e *small interfering RNA* (siRNA) para *FBXO7*, a partir do qual obtivemos resultados satisfatórios.

Para este ensaio, 3×10^6 de THP-1 foram diferenciadas por 48h com PMA em placas de 100 mm. Para realizar o *knockdown* de *FBXO7*, as células foram transfectadas com *duplexes* siRNA siFbx7-443 (Sigma-Aldrich) e lipofectamina. Como controle negativo, foi utilizado um siRNA com sequência aleatória de nucleotídeos (SIC001, Sigma-Aldrich), portanto, sem especificidade a qualquer mRNA e incapaz de realizar o silenciamento gênico. As sequências dos siRNAs utilizados estão descritas na tabela a seguir (**Tabela 1**):

Tabela 1. Sequências e nomenclaturas dos siRNAs controle e para o *knockdown* de *FBXO7*.

| Especificidade ao mRNA | Sequência (5'-3') | Nomenclatura |
|------------------------|--|-------------------------------|
| Ausente | Não fornecida | Universal Negative Control #1 |
| <i>FBXO7</i> | F: CUGAGUCAAUUCAAGAUAA R: UUAUCUUGAAUUGACUCAG | siFbx7-443 |

Foram utilizados 2,5 µg de cada siRNA (100 µM), o qual foi diluído em meio opti-MEN (ThermoScientific), recebendo, posteriormente, a adição de lipofectamina a uma relação de 3 µL lipofectamina: 1 µg de siRNA. A solução foi agitada suavemente e mantida por 5 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada reação foi adicionado em suas respectivas placas contendo células já diferenciadas. Decorrido quatro horas de transfecção, foi realizada a troca de meio de cultivo, por meio RPMI 1640

com glutamina (Gibco) contendo 10% de SFB (Gibco) e 1% penicilina/streptomicina (100 µg/ml).

4.3.2. Estímulo com LPS

Decorridas as 48h da transfecção, as células dos grupos controle negativo e tratado foram estimuladas por 1 µg/mL de LPS de *E.coli* (K12, InvivoGen) durante 16h, para ativação da via do NF-κB, seguindo as instruções do fabricante do kit utilizado para identificação e quantificação das citocinas expressas. Posteriormente, os sobrenadantes celulares foram recolhidos e centrifugados a 150 x g por 5 minutos para exclusão de detritos celulares. As alíquotas foram armazenadas a -20°C para descongelamento único e uso para os seguintes ensaios.

4.3.3. Western Blotting

Posterior a coleta dos sobrenadantes, as células foram lisadas como descrito anteriormente para verificação do *knockdown* de *FBXO7* por *western blotting*, sendo o *input* (40 µg) resolvido por *SDS-PAGE* 10% (1 mm) e avaliado por *western blotting*, utilizando anticorpo anti-Fbxo7 (AB154098, ABCAM, diluição 1:1000). Foi utilizado como normalizador anti-Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (anti-GAPDH, G8795, Sigma, diluição 1:10000). A intensidade das bandas foi quantificada através do software *Image J* (W. Rasband, NIH, EUA).

4.3.4. Human Cytokine Array

Após a validação da redução da expressão de *FBXO7* pelo siRNA-*FBXO7* utilizado, o perfil de citocinas nos sobrenadantes das amostras controle e *knockdown* de *FBXO7* foi determinado utilizando o kit *Proteome Profiler™ Array – Human Cytokine Array Panel A* (ARY005, R&D Systems). Esse *kit* é uma ferramenta sensível e rápida que permite a detecção concomitante de 36 citocinas humanas presentes em uma única amostra, seja ela soro, lisados celulares, plasma ou sobrenadante. Essa amostra é então misturada com um coquetel de anticorpos de detecção e aplicada nas membranas de nitrocelulose contendo anticorpos de captura de citocinas. Posteriormente, essas membranas são expostas à estreptavidina-HRP e reveladas em um fotodocumentador, sendo a intensidade de luz produzida em cada *spot* diretamente proporcional à quantidade de citocinas ligadas (**Figura 7**). Os ensaios foram realizados em duas membranas para

cada grupo (controle ou siRNA-*FBXO7*), sendo que cada membrana possuía dois *spots* de cada uma das 36 citocinas, totalizando quatro *spots* por citocina em cada tratamento.

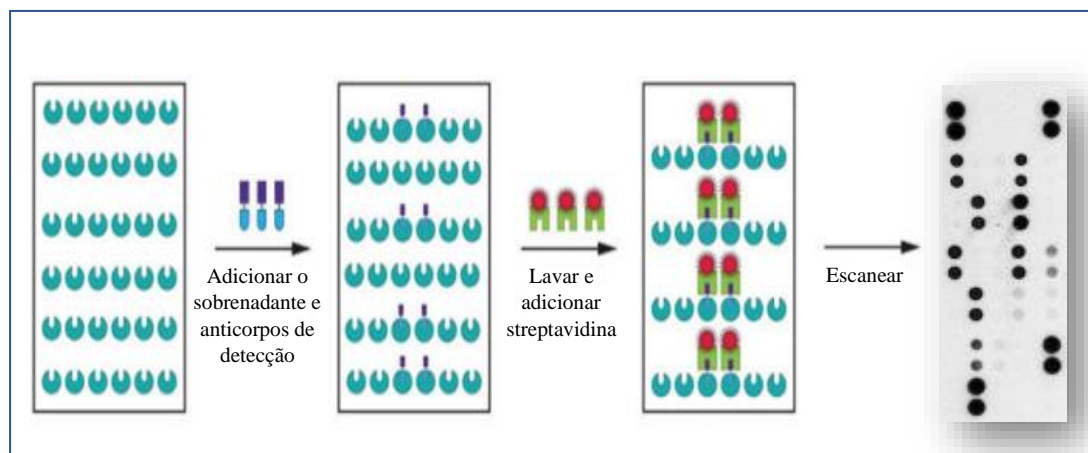


Figura 7. Esquema do mecanismo geral do *Human Cytokine Array*. As membranas foram lavadas com solução tamponante e incubadas com o sobrenadante celular e anticorpos de detecção. Após a incubação e lavagens, as citocinas foram expostas à streptavidina-HRP e reveladas em fotodocumentador.

Todas as etapas para realização deste ensaio, sucederam-se de acordo com as especificações do fabricante. A identificação das citocinas foi feita manualmente através da sobreposição de um molde transparente da matriz fornecido pelo *kit* com as respectivas coordenadas para a identificação do analito.

Os *spots* foram quantificados com auxílio do Dr. André Luiz Brandão Bitencourt (FMRP/USP), através do software *Image J* (W. Rasband, NIH, EUA), mediante a instalação de um *plug-in* para *Microarray Profile*. Os valores obtidos foram transportados para o *Microsoft Excel*, no qual foi determinado o sinal médio da quadruplicata de cada citocina. Desse valor foi subtraída a média do *background*.

4.4. Estímulo com TNF- α

As células foram diferenciadas em placas de 6 poços e transfectadas com siRNA-*FBXO7* ou siRNA controle, como descrito anteriormente. Um grupo foi exposto a 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, outro por 10 ng/mL de TNF- α , ambos por 16h, e por fim, um grupo que não recebeu estímulo algum, sendo este o controle negativo. Posteriormente, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados e armazenados a -20°C até o momento da

quantificação de IL-1 β por ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). As células foram lisadas para obtenção do extrato proteico para validação do *knockdown* de *FBXO7* através de *western blotting*.

4.5. Quantificação de IL-1 β por ELISA

A quantificação de IL-1 β presente no sobrenadante celular de cada tratamento foi realizada utilizando o *Kit ELISA IL-1 β* (4212108, ThermoScientific), seguindo as instruções do fabricante em amostras não diluídas. Estas tiveram suas absorbâncias detectadas em leitor de placa (Asys UVM 340) com comprimento de onda de 450 nm. Foram realizadas triplicatas biológicas e técnicas para cada amostra.

4.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Este ensaio seguiu em todas as etapas de execução as diretrizes de MIQE *Guidelines (Minimum Information for publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)*, as quais fornecem instruções para uma correta execução e interpretação dos resultados da RT-qPCR, essenciais para a validação desses experimentos (BUSTIN et al., 2009).

4.6.1. Extração de RNA

As células THP-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços, contendo 6×10^5 células/poço e diferenciadas com PMA por 48h. Posteriormente foi realizada a transfecção com siRNA-*FBXO7* ou siRNA controle e feita a estimulação com LPS por 16h. Após esse período, as células foram lavadas com solução tampão salina gelada para dar início à extração de RNA.

A extração do RNA total das amostras foi feita a partir do *Kit SV Total RNA isolation System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Ao final do processo foram obtidos 50 μ L de RNA diluído em água livre de nuclease e tratado com DNase I. A concentração de material genético foi determinada por fluorometria através do método *QUBIT RNA IQ Assay* (Invitrogen), já o grau de pureza foi avaliado por espectrofotometria a partir do NanoVue (GE), ambos utilizando 1 μ L de amostra de RNA. Para a síntese de cDNA, foram utilizadas as amostras com a razão A260/A280 entre 1,9 a 2,1 e A260/A230 entre 1,5 a 1,8, a fim de evitar o uso de amostras contaminadas por proteínas, fenol e sais. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em

gel de agarose a 1% mediante a visualização das bandas ribossomais 18S e 28S. Posteriormente, as amostras foram estocadas em freezer a -80°C até o momento de uso.

4.6.2. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (ThermoScientific) a partir de 100 ng de RNA total. Este kit utiliza *primers* aleatórios para iniciar a síntese de cDNA de forma eficiente para todo tipo de molécula de RNA presente na amostra, incluindo o mRNA em questão. O kit emprega a transcriptase reversa MultiScribe™, além de tampão, água livre de nuclease e mix de dNTP. Cada reação foi feita seguindo a proporção informada pelo kit, utilizando 10 µL de RNA da respectiva amostra, adicionada à 10 µL do RT *master mix*. A síntese foi realizada no termociclador Biometra T-One por 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Ao final do processo, o cDNA foi armazenado a -20°C.

4.6.3. PCR em tempo real (qPCR)

4.6.3.1. Genes de referência

Para o controle de variações inespecíficas entre as amostras, tais como erros de pipetagem, quantidade ou integridade de RNA, foram utilizados genes de referências, também chamados de constitutivos. Esses genes apresentam expressão constante que não variam com o tratamento aplicado e condição fisiológica, permitindo, portanto, a normalização da expressão dos genes alvos e a confiabilidade de RT-qPCR.

Para esse ensaio foram utilizados os genes de referência: *ACTB*, *GAPDH* e *RPL37A* (Proteína Ribossômica 60S L37a). As sequências desses genes estão descritas na tabela a seguir (**Tabela 2**):

Tabela 2 - Nome e sequências dos *primers* dos genes normalizadores utilizados para RT-qPCR.

| Nome do Gene | Abreviação do Gene | Sequência (5'-3') |
|---------------------------------------|--------------------|---|
| Beta-actina | <i>ACTB</i> | F: ATTGAAATCAGCCAGCACGC R: AGGAACCACAGTGCCAGATCC |
| Proteína Ribossômica 60S L37a | <i>RPL37A</i> | F: ATTGCCGACAGGATGCAGAA R: GCTGATCCACATCTGCTGGAA |
| Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | <i>GAPDH</i> | F: CAACAGCGACACCCACTCCT R: CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA |

4.6.3.2. Padronização da concentração dos *primers*

Além do gene de interesse *IL-1 β* , outros genes tiveram sua expressão avaliada. *IL-8* (Interleucina 8) foi utilizado como parâmetro, visto que de acordo com os resultados do *array* de citocinas, o *knockdown* do gene *FBXO7* não causou alteração em nível proteico desta citocina. Foi avaliado também o *NF-kB* para verificação de aumento ou diminuição da ativação dessa via, e por fim, o gene *FBXO7*, para validação do *knockdown*. As sequências dos *primers* utilizados para esse ensaio estão descritas na tabela a seguir (**Tabela 3**):

Tabela 3- Nome e sequência dos *primers* utilizados para RT-qPCR

| Nome do Gene | Abreviação do Gene | Sequência (5'-3') |
|-----------------------------|-------------------------------|--|
| Interleucina 1 beta | <i>IL-1β</i> | F: AACCTATCTTCTTCGACACATGGGATA R: CAAGGCCACAGGTATTTTGTCATTACT |
| Interleucina 8 | <i>IL-8</i> | F: AGCACTCCTTGGCAAACACTG R: CGGAAGGAACCATCTCACTG |
| Fator nuclear kappa β | <i>NF-kβ</i> | F: TGAGTCCTGCTCCTTCCA R: GCTTCGGTGTAGCCCATT |
| F-box Protein 7 | <i>FBXO7</i> | R: CGCTGGAATGTCATCTTGAAGA F: AGTCCCTGCTGTGCACCTG |

Para otimização do ensaio do qPCR, foram realizados testes com todos os *primers* nas concentrações de 100 nM e 200 nM, sendo 100 nM escolhida por ser a concentração máxima utilizada que não gerou dímeros de primers.

4.6.3.3. Procedimento da qPCR

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o sistema *SYGreen mix* (PCR Biosystems) em placas de 96 poços próprias para o procedimento. Cada reação ocorreu com 3 μL de cDNA (3 ng), 0,5 μL de cada primer (100 nM), 5 μL do qPCR *master mix* o qual contém dNTPs, tampão, DNA polimerase e o agente fluoróforo intercalante de DNA e por fim, 1 μL de ddH₂O, totalizando o volume de 10 μL por poço para cada reação. Cada amostra foi realizada em triplicata biológica e técnica. Foram realizados também controles negativos para cada gene, a fim de verificar presença de contaminação. Para todos os genes, as reações ocorreram no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR Systems (ThermoScientific) nos seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos e 60°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 30 segundos. Para verificação da especificidade das reações e da formação de dímeros de primers ou outras ligações inespecíficas, todas as amplificações foram finalizadas com a curva de *melting*, elevando a temperatura gradualmente de 55°C a 95°C.

A eficiência de cada reação, bem como seus valores de Cq (*quantification cycle*), foram determinados através do software *Real-Time PCR Miner* (ZHAO; FERNALD, 2005) o qual fornece um método preciso e conveniente ao abordar os parâmetros importantes para este tipo de análise, de modo a eliminar a necessidade de estimativas e/ou julgamentos qualitativos presentes em outros métodos. Para normalização dos dados, foi realizada a média aritmética das eficiências de amplificação de cada par de primers.

4.7. Análise dos Dados

As análises estatísticas e os gráficos foram gerados no software *Prism* (*GraphPad*). Os dados obtidos foram submetidos ao Teste t de *Student* não-pareado ou teste de Friedman e de múltipla comparação de Dunn, sendo a significância estatística aceita em valores de $p \leq 0,05$. Os asteriscos indicam o valor de p: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$ e ***: $p \leq 0,01$.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Diferenciação celular de THP-1 e expressão da proteína Fbxo7 nas células diferenciadas

A fim de avaliarmos a diferenciação celular de THP-1 e o perfil da expressão da proteína Fbxo7 nessas células, estas foram diferenciadas com PMA por cinco dias consecutivos. Para avaliarmos a aquisição de um fenótipo semelhante à de macrófago, realizamos o monitoramento da diferenciação celular pelo *CytoSMART*. Verificamos que durante a estimulação as células se tornaram aderentes, adquiriram um aumento citoplasmático e tiveram sua morfologia alterada para a forma amebóide (**Figura 8**). Este é um dos critérios aceitos para indicar a diferenciação celular por PMA. Essa modificação é causada porque o tratamento com PMA induz a aderência e o aumento na expressão de marcadores de superfície celular associados à diferenciação de macrófagos, tais como CD11b, CD14 e CD36 (SHWENDE *et al*, 1996; ZHOU *et al.*, 2010).

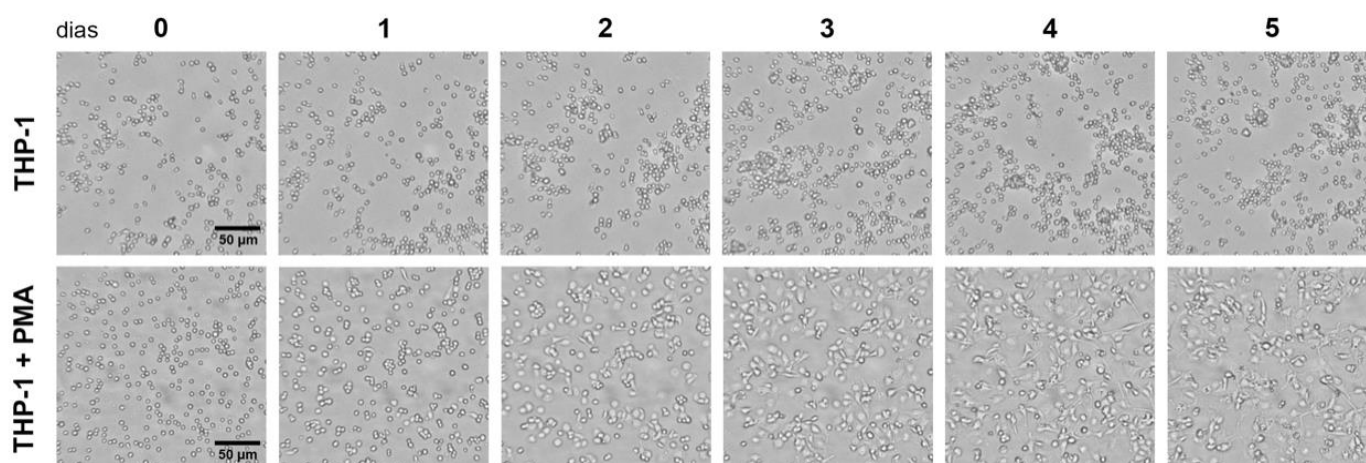


Figura 8. Avaliação da morfologia de THP-1 sob tratamento com PMA. O grupo THP-1 corresponde às células não tratadas. Em THP-1+PMA, o tempo 0 corresponde às células não expostas ao PMA e os tempos 1, 2, 3, 4 e 5 aos dias de exposição das células ao tratamento. As células foram visualizadas pelo *Cytosmart* e as fotografias registradas com objetiva de 10x.

Com a validação do protocolo de diferenciação por microscopia, realizamos este mesmo protocolo lisando as células após cada tempo de tratamento. Os extratos celulares foram submetidos a *SDS-PAGE* e *western blotting*, onde observamos que o conteúdo

proteico de Fbxo7 foi semelhante entre os diferentes tempos de tratamento (**Figura 9**), não havendo, portanto, relação direta entre o tempo de diferenciação e conteúdo de Fbxo7. Estes resultados sugerem duas possibilidades; que a proteína Fbxo7 não participa diretamente do processo de diferenciação celular por PMA neste tipo celular ou as vias intracelulares ativadas por este tratamento não modulam o conteúdo de Fbxo7 nas células THP-1. Considerando que o período de 48h de exposição de THP-1 ao PMA é comumente utilizado para que os monócitos adquiram o fenótipo e funcionalidade semelhantes à de macrófagos humanos primários (PARK *et al.*, 2007; LUND *et al.*, 2016), prosseguimos com esse período de diferenciação para os ensaios posteriores.

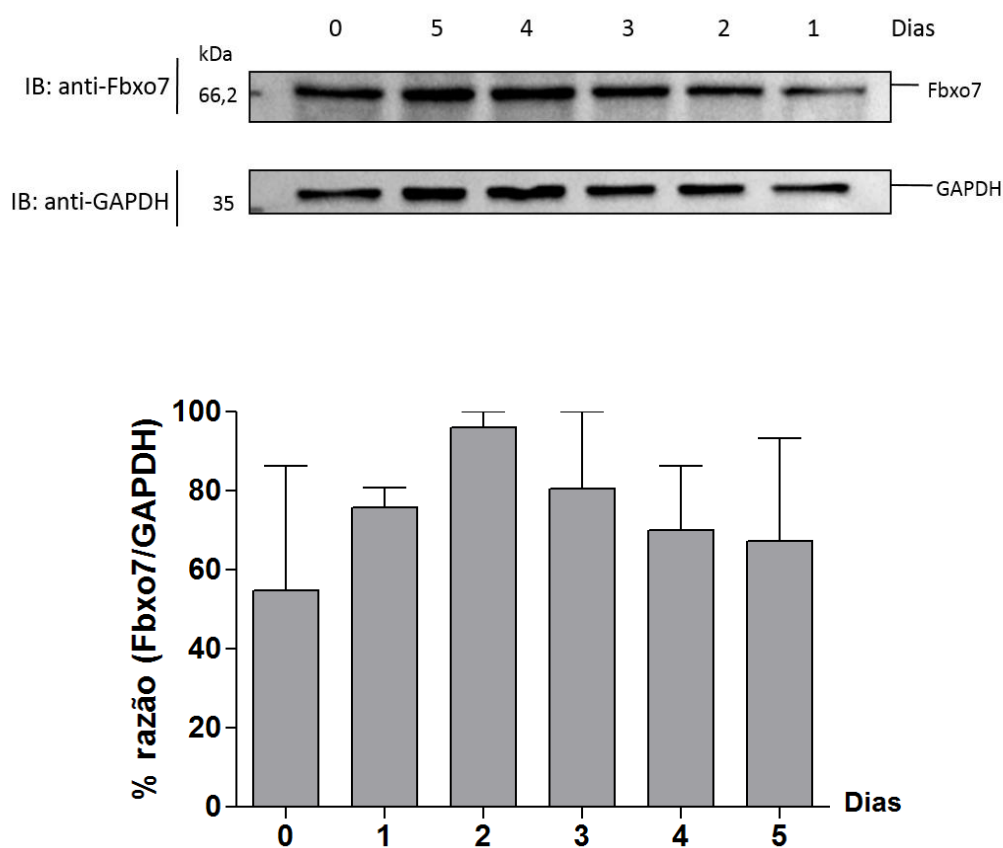


Figura 9. Conteúdo de Fbxo7 em células THP-1 tratadas com PMA. O tempo 0 corresponde às células não tratadas pelo agente de diferenciação. Essas células foram lisadas e tiveram seu extrato total resolvido por *SDS-PAGE* e avaliado por *western blotting*. A razão entre a densitometria das bandas reveladas com anti-Fbxo7 e anti-GAPDH foram realizadas por *ImageJ* e os dados foram plotados utilizando *GraphPrism*. Este ensaio foi realizado em duplicata biológica. Foram aplicados os testes de Friedman e de múltipla comparação de Dunn, com valor de p significativo se $p < 0,05$.

5.2. Silenciamento do gene *FBXO7* por siRNA

O silenciamento de um gene-alvo permite a obtenção de informações acerca da função que a proteína codificada por ele exerce na célula (MORRIS *et al.*, 2004). O *knockdown* por siRNA é transiente e não apresenta completa eficiência, porém o suficiente para que possamos observar as consequências da redução da expressão de um determinado gene enquanto as células transfectadas sobrevivem ao tratamento (ABEL; REDERSTORFF, 2015). Para entender o papel do gene *FBXO7* nas células THP-1, otimizamos um protocolo de transfecção de siRNA em células diferenciadas a fim de reduzir os níveis proteicos de Fbxo7. A análise por *western blotting* dos extratos celulares obtidos após o silenciamento em comparação ao controle negativo demonstrou um *knockdown* de aproximadamente 60% da proteína Fbxo7 (**Figura 10**), demonstrando a eficiência do siRNA-*FBXO7* utilizado e tornando possível a investigação do papel dessa proteína no perfil de citocinas expressas por THP-1 diferenciadas.

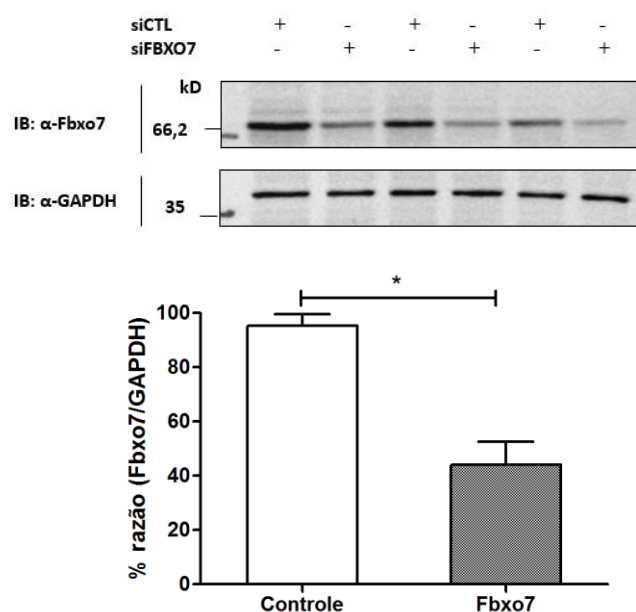


Figura 10. *Knockdown* de *FBXO7* por siRNA. Células THP-1 diferenciadas por 48h foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* para o *knockdown* de *FBXO7* e estimuladas posteriormente por LPS. Após a lise celular, o extrato proteico total foi resolvido por *SDS-PAGE* e avaliado por *western blotting* com os anticorpos indicados. Foi realizada a densitometria das bandas através do *ImageJ* e os gráficos gerados em *GraphPrism* através da razão densitométrica das bandas de Fbxo7 pelo normalizador GAPDH. Foi aplicado o teste estatístico teste t não-pareado e paramétrico, com n=3 para cada tratamento. Os asteriscos indicam o valor de p: *p<0,01, **p<0,001 e ***p<0,0001.

A transfecção de células diferenciadas por reagentes lipossomais demonstra uma baixa eficiência, como observamos ao transfectar estas células com plasmídeo pEGFP-N1 expressando a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), dados não mostrados. Porém, mesmo com uma baixa eficiência de transfecção ainda foi possível obter um nível aceitável de *knockdown* de *FBXO7* para posteriores análises de sua função no perfil de expressão de citocinas nas células THP-1 diferenciadas e estimuladas.

5.3. Perfil de citocinas produzidas por THP-1 diferenciadas e estimuladas por LPS em células *knockdown* de *FBXO7*

Os monócitos e macrófagos, componentes do sistema imunológico inato, estão relacionados em processos inflamatórios e apresentam a capacidade de sintetizar e secretar citocinas. Células THP-1 tem sido utilizadas como modelo para avaliar a capacidade de resposta inflamatória mediada por LPS, a qual pode ser obtida medindo a presença das citocinas presentes no sobrenadante celular após o estímulo (CHANPUT *et al.*, 2010).

Após as revelações das membranas do *kit* utilizado, observamos a expressão de 15 citocinas (**Figura 11**) e (**Tabela 4**) em ambos tratamentos, com apenas quatro delas (CCL1, CCL3, IL-1 β e IL-10) com expressão alterada pelo *knockdown* de *FBXO7* (**Figura 11**) (destacadas em quadros vermelho, amarelo, verde e azul, respectivamente). Os resultados demonstraram que o *knockdown* de *FBXO7* reduziu significativamente a indução de expressão de CCL1, CCL3, IL-1 β , e IL-10 sob estímulo com LPS (**Figura 12**). CCL3 foi a citocina mais expressa, seguida por CCL1, IL-1 β e por fim IL-10.

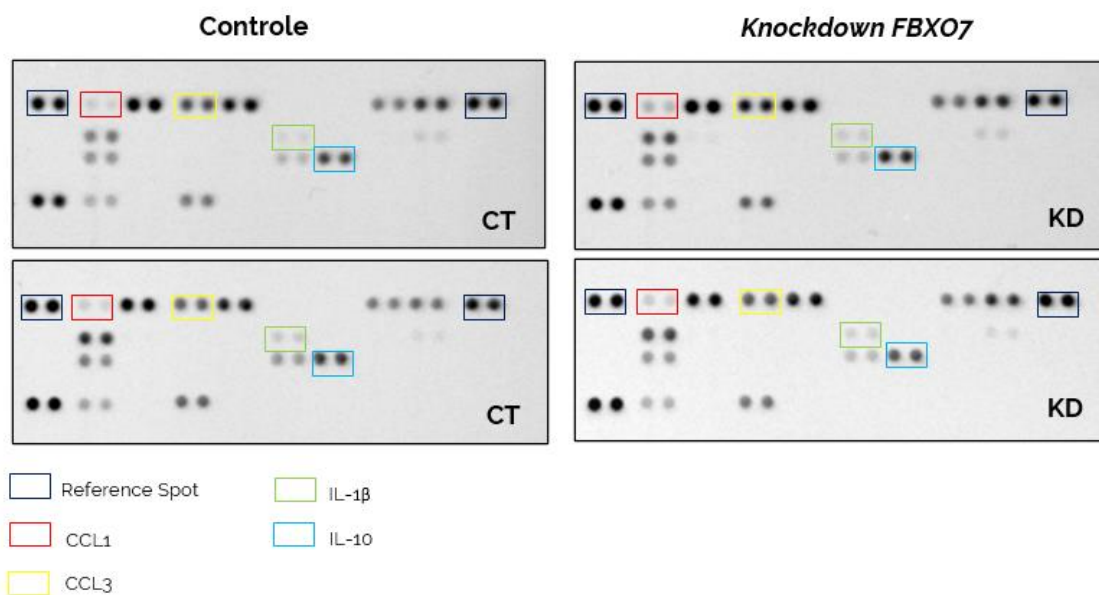


Figura 11. Citocinas diferencialmente expressas em células THP-1 *knockdown* de *FBX07* estimulada com LPS. CCL1, CCL3, IL-1 β e IL-10 tiveram sua expressão reduzida com o *knockdown* de *FBX07*. Após a aplicação do sobrenadante celular do grupo controle e *knockdown* em suas respectivas membranas e sua revelação em fotodocumentador, os analitos foram identificados através das coordenadas disponíveis no próprio *array* e quantificados através do *ImageJ*, utilizando um *plug-in* para *Microarray Profile*. Os valores dos *spots* foram transportados para o Excel, onde foi determinado o sinal médio da quadruplicata de cada citocina e subtraído o valor da média do *background*.

Tabela 4: Citocinas expressas por THP-1 diferenciadas após estímulo com LPS.

| | Nomenclatura Usual | | Outros Nomes |
|---------------------------|--------------------|---|----------------------|
| Quimiocinas | CCL1 | Ligante 1 de quimiocina com motivo CC | I-309 |
| | CCL2 | Ligante 2 de quimiocina com motivo CC | MCP-1 |
| | CCL3 | Ligante 3 de quimiocina com motivo CC | MIP-1a |
| | CCL5 | Ligante 5 de quimiocina com motivo CC | RANTES |
| | CXCL1 | Ligante 1 de quimiocina com motivo CXC | Gro- α |
| | CXCL10 | Ligante 10 de quimiocina com motivo CXC | IP-10 |
| | CXCL11 | Ligante 11 de quimiocina com motivo CXC | ITAC |
| | IL-8 | Interleucina 8 | CXCL8 |
| Pró-inflamatórias | TNF- α | Fator de necrose tumoral | TNFSF2 |
| | IL-1 β | Interleucina 1 β | IL1F2 |
| | IL-6 | Interleucina 6 | Interferon β 2 |
| | MIF | Fator de inibição da migração de macrófagos | GIF |
| Anti-inflamatórias | IL-10 | Interleucina 10 | CSIF |
| | IL-1ra | Antagonista do receptor de interleucina-1 | IL1RN |
| Molécula de adesão | ICAM-1 | Molécula de adesão intracelular-1 | CD54 |

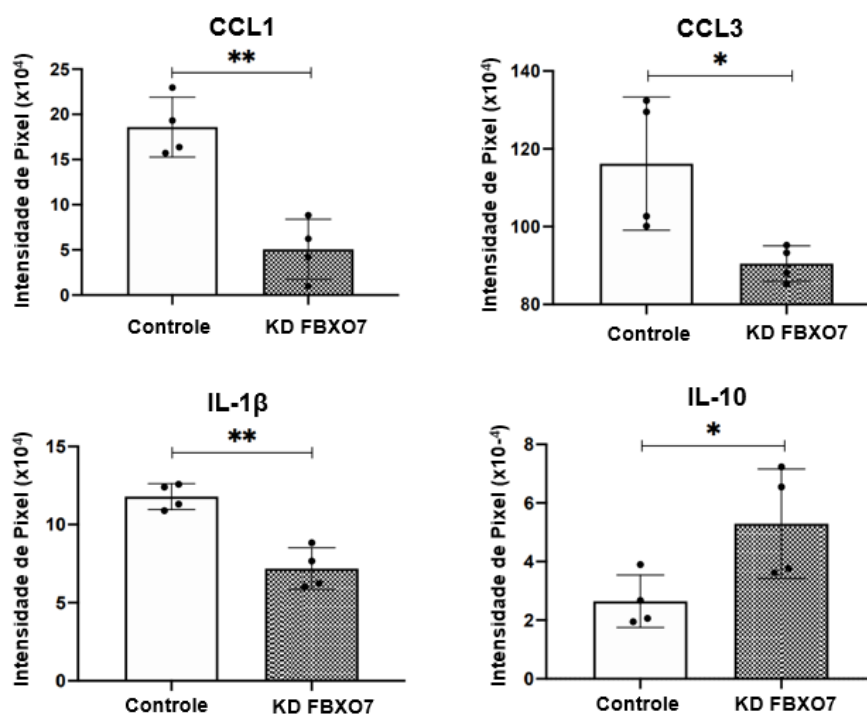


Figura 12. Citocinas alteradas pelo *knockdown* de *FBXO7* após estímulo por LPS. Análise densitométrica dos *spots* das citocinas diferencialmente produzidas em THP-1 estimuladas com LPS (CCL1, CCL3, IL-1 β e IL-10) obtidas de sobrenadantes de células transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e submetidas ao *Human Cytokine Array*. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados em *GraphPrism*. O teste estatístico utilizado foi teste t não-pareado e paramétrico, com n=4. Os asteriscos dos gráficos estão relacionados aos valores de *p value* como segue: **p*<0,01, ***p*<0,001 e ****p*<0,0001.

As quimiocinas são uma família de pequenas citocinas que exercem um papel fundamental na imunidade e inflamação devido a sua propriedade de quimiotaxia (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014). Algumas tem ação pró-inflamatória e são liberadas durante a resposta imune no local de infecção de modo a recrutar subtipos definidos de leucócitos, além de coordenar a interação das células do sistema imune, promovendo a interação entre o sistema imune inato e adaptativo (SOKOL; LUSTER, 2015). Outras, porém, são consideradas homeostáticas e estão relacionadas no controle da migração celular durante o processo de desenvolvimento ou manutenção dos tecidos (RAZ; MAHABALESHWAR, 2009). Além disso, essas proteínas contribuem também para outros processos como o crescimento tumoral e metástase, hematopoiese e organogênese (MOSER *et al.* 2004; ZLOTNIK; BURKHARDT; HOMEY, 2011; MORTIER; VAN DAMME; PROOST, 2012; LAU *et al.*, 2014). Dependendo da posição dos dois resíduos conservados de cisteína do N-terminal, as quimiocinas podem ser subclassificadas em 4 subfamílias: XC, CC, CXC e CX3C (SOKOL; LUSTER, 2015).

CCL1 é uma quimiocina com dupla função, apresentando tanto a ação pró-inflamatória quanto homeostática (LE *et al.*, 2004). É secretada por células endoteliais, linfócitos T, monócitos e macrófagos ativados e ao se ligar ao seu receptor CCR8, promove o influxo de cálcio, induz apoptose e quimiotaxia (TIFFANY *et al.*, 1997; HUGHES; NIBBS, 2018). No local de inflamação é responsável por recrutar monócitos e macrófagos, células Th2 e T reguladoras (ZINGONI *et al.*, 1998). Essa quimiocina está relacionada a carcinomas hepatocelulares (WIELDEMANN *et al.*, 2019), de mama (XU *et al.*, 2017), renal (ERUSLANOV *et al.*, 2013) e de bexiga (CAO *et al.*, 2016). Além disso, no câncer, CCL1 apresenta atividade antiapoptótica (RUCKES *et al.*, 2001) e promove a quimioresistência às drogas administradas (SPINETTI *et al.*, 2003).

CCL3, conhecida também como proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α), é uma quimiocina pró-inflamatória (LE *et al.*, 2004) responsável pelo recrutamento de células dendríticas, NK, T, neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local de inflamação (MENTEN; WUYTS; VAN DAMME, 2002), além de garantir o funcionamento adequado das células T CD8⁺ (CASTELLINO *et al.*, 2006) ao se ligar aos seus receptores CCR1 e CCR5 (COMBADIÈRE *et al.*, 1996). O aumento no número de células imunes recrutadas por CCL3 torna essa quimiocina um fator potencial para a imunoterapia contra o câncer (SCHALLER *et al.*, 2017). No entanto ela também apresenta efeitos pró-câncer por aumentar a proliferação das células cancerosas (LUO *et al.*, 2020). Essa quimiocina é expressa em mieloma múltiplo (ABE *et al.*, 2002) e em

leucemia mieloide aguda e crônica (BABA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020), induz a destruição óssea (CHOI *et al.*, 2001), além de facilitar a metástase em tumores nos pulmões e cérebro (FARMAKI *et al.*, 2016). Assim como CCL1, também promove nas células tumorais a resistência aos medicamentos (CHEN *et al.*, 2019).

IL-10 desempenha papéis fundamentais na regulação da resposta imune durante a inflamação e infecção, protegendo ou contribuindo para doenças autoimunes e câncer (OUYANG; O’GARRA, 2019; WANG *et al.*, 2019). É produzida por células do sistema imune inato e adaptativo, tais como: monócitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, células NK, linfócitos T CD8⁺, CD4⁺ e linfócitos B (OUYANG *et al.*, 2011), e exerce função anti-inflamatória para diminuir o dano tecidual causado por respostas efetoras inflamatórias descontroladas (RUTZ; OUYANG, 2011; ENGELHARDT; GRIMBACHER, 2014). Seus alvos principais são as células apresentadoras de antígenos, principalmente monócitos e macrófagos, para interferir na apresentação de antígenos pela redução da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-II. Além disso, é responsável por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (de WALL-MALEFYT *et al.*, 1991). No entanto, sua produção desregulada está relacionada a doenças inflamatórias e infecções crônicas (KÜHN *et al.*, 1993; OLDSTONE, 2015).

IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, células dendríticas e, majoritariamente, por macrófagos (GARLANDA, DINARELLO, MANTOVANI, 2013). Exerce funções importantes na imunidade inata e adaptativa, sendo responsável pelo influxo e ativação de células mieloides como os neutrófilos no local de inflamação, ativação de linfócitos T e B e produção de citocinas e anticorpos, respectivamente, indução da síntese de prostaglandinas, entre outras funções (TOMINAGA *et al.*, 2001; FERREO-MILIANI *et al.*, 2006). No entanto, está relacionada a diversas patologias como artrite reumatoide, esclerose múltipla, asma, lúpus eritematoso, Alzheimer, infarto do miocárdio, cânceres, entre outras (AKDIS *et al.*, 2016).

Devido às suas propriedades, muitas citocinas, bem como seus receptores e antagonistas, tem sido alvos terapêuticos em diversos estudos clínicos (AKDIS *et al.*, 2016). Diferentes estratégias tem sido utilizadas a fim de se obter resultados terapêuticos mediante a manipulação dessas proteínas, onde a maioria envolve a utilização de anticorpos monoclonais visando a imunoneutralização das citocinas, uso de inibidores competitivos, uso de determinadas drogas ou citocinas que atenuam o efeito de outras

citocinas, além da terapia genética (HOLDSWORTH; GAN, 2015). De acordo com nossos resultados, verificamos que o *knockdown* de *FBXO7* com posterior estímulo de LPS causou uma redução na expressão de CCL1, CCL3, IL-1 β e IL-10 em THP-1, sugerindo uma possível regulação de *Fbxo7* nessas citocinas.

Conforme avaliado no trabalho de Kuiken *et al.* em 2012, a proteína *Fbxo7* atua como um regulador negativo da via de sinalização do NF-kB em células U2OS. Tendo isso em vista, era esperado que o *knockdown* de *FBXO7* resultasse em um aumento da transcrição dos genes regulados por NF-kB, e conseqüentemente, em um aumento na secreção de citocinas pelas células THP-1 estimuladas. Ao contrário do esperado, verificamos uma redução na expressão das citocinas. Possivelmente isso ocorreu por utilizarmos uma linhagem celular diferente e/ou por realizarmos a ativação de NF-kB por LPS.

Embora a ativação de NF-kB possa ocorrer por LPS ou TNF- α e essas vias venham a convergir na ativação de IKK e na translocação do NF-kB para o núcleo, os receptores e as proteínas citoplasmáticas envolvidas em ambas as vias são diferentes. Além disso, até o momento não foi descrito o papel da proteína *Fbxo7* na ativação de NF-kB por LPS. Assim, esses fatores podem ter contribuído para os resultados obtidos. Todavia, a redução da expressão das citocinas na ocorrência do *knockdown* do *FBXO7* sugere uma possível atuação da proteína *Fbxo7* na regulação da expressão dessas citocinas.

Recentemente, foi demonstrado que a proteína PINK1 (quinase 1 induzida por PTEN) é um substrato da *Fbxo7* (LIU *et al.*, 2020). Tendo em vista que PINK1 exerce um papel anti-inflamatório no pulmão (KIM *et al.*, 2013), o efeito do gene *FBXO7* foi avaliado sobre a inflamação pulmonar (LIU *et al.*, 2020). Nesse estudo, verificaram que a superexpressão de *Fbxo7* aumentou a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α no pulmão de camundongos C57BL/6N infectados com *P. aeruginosa* (bactéria *gram-negativa*). Além disso, verificaram que o *knockdown* de *FBXO7* por shRNA (*Short hairpin RNA*) atenuou a liberação dessas citocinas. O estudo sugeriu então que *Fbxo7* atuou como uma proteína pró-inflamatória por regular negativamente o eixo anti-inflamatório PINK1, o que faz desse gene um alvo em potencial para fins terapêuticos (LIU *et al.*, 2020).

Embora também verificamos a redução de IL-1 β com o *knockdown* de *FBXO7* em linhagem celular THP-1 estimulada com LPS, os níveis de TNF- α e IL-6 permaneceram inalterados (**Figura 13**), diferentemente do que foi observado em pulmão de camundongos C57BL/6N infectados, onde houve uma redução na secreção dessas

citocinas. Isso sugere que o perfil de expressão de citocinas reguladas por NF-kB e possivelmente por Fbxo7, variam do tipo de linhagem celular utilizada, mesmo sob ativação da via do NF-kB por LPS.

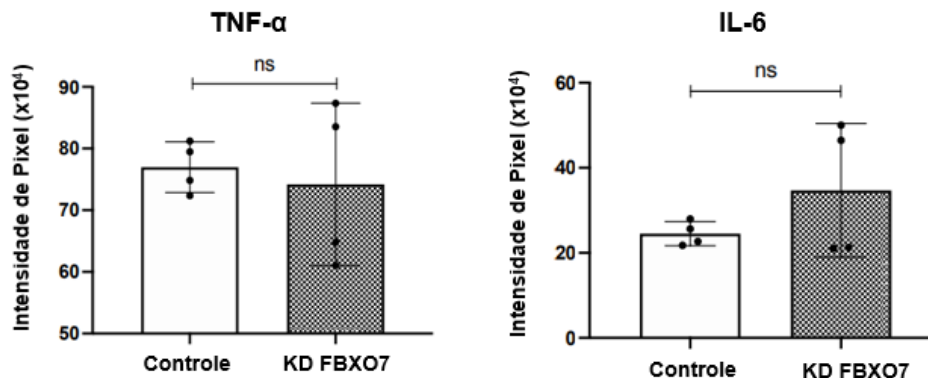


Figura 13. Expressão de TNF- α e IL-6 em THP-1 controle ou *knockdown* para *FBXO7* estimulada com LPS. As citocinas foram quantificadas a partir do sobrenadante de células THP-1 transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e estimuladas com LPS. Os valores obtidos foram transportados para o *Excel*, sendo os gráficos e as análises estatísticas geradas em *GraphPrism*. Foi utilizado o teste estatístico teste t não-pareado e paramétrico, com n=4, onde os asteriscos indicados estão relacionados ao valor de p: *p<0,01, **p<0,001 e ***p<0,0001.

Importante salientar que a resposta pró-inflamatória de macrófagos THP-1 diferenciados por PMA varia dependendo do protocolo de diferenciação utilizado por gerar macrófagos com diferentes estágios de diferenciação, comprometendo as comparações diretas de estudos *in vitro* (LUND *et al.*, 2016). Este estudo avaliou que células THP-1 diferenciadas por 100 ng/mL de PMA apresentaram um aumento no nível da expressão de genes relacionados à inflamação, bem como um aumento na secreção de citocinas como TNF- α e IL-8, quando comparado à utilização de menores concentrações do composto. Além disso, verificaram que o uso de concentrações mais altas de PMA também resulta em células que respondem mais fortemente ao estímulo de LPS. Esses dados sugerem que o uso de altas concentrações de PMA induzem um fenótipo mais ativado dos macrófagos e influenciam de forma significativa sua funcionalidade (LUND *et al.*, 2016). Outro estudo avaliou o uso de PMA para diferenciação em THP-1 nas concentrações de 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL e 60 ng/mL e verificaram que o

composto causou citotoxicidade e posterior morte celular em concentrações superiores a 20 ng/mL (BİRİKEN; YAZIHAN; YILMAZ, 2018).

Como utilizamos a concentração de 10 ng/mL de PMA para a diferenciação de THP-1 em todos ensaios realizados, a resposta inflamatória observada não está enviesada pelos fatores observados nos estudos citados acima.

5.4. Ativação da via NF- κ B em células THP-1 estimuladas por TNF- α

Considerando que IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória produzida majoritariamente por macrófagos e está envolvida em uma gama de patologias humanas (GARLANDA, DINARELLO, MANTOVANI, 2013; AKDIS *et al.*, 2016), escolhemos essa citocina como alvo de estudo nos ensaios posteriores.

Para avaliarmos se a redução da secreção de IL-1 β ocasionada pelo *knockdown* de *FBXO7* em macrófagos THP-1 é inerente ao estímulo por LPS, realizamos também a ativação de NF- κ B por TNF- α . Para isso, as células THP-1 diferenciadas foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e estimuladas com LPS ou TNF- α . Posteriormente, as células foram lisadas e o extrato celular submetido a *SDS-PAGE* e avaliado por *western blotting* a fim de verificar a ocorrência do *knockdown* de *FBXO7*. A análise demonstrou um *knockdown* de aproximadamente 60% e que não houve alteração nos níveis de *Fbxo7* em ambos os grupos (**Figura 14**), semelhante aos resultados obtidos anteriormente por *western blotting*. Esses resultados indicam que ambos tratamentos não afetam os níveis celulares da proteína *Fbxo7*. Com essa validação foi possível utilizar os sobrenadantes armazenados para a análise do conteúdo de IL-1 β por ELISA para fins de comparação entre os tratamentos.

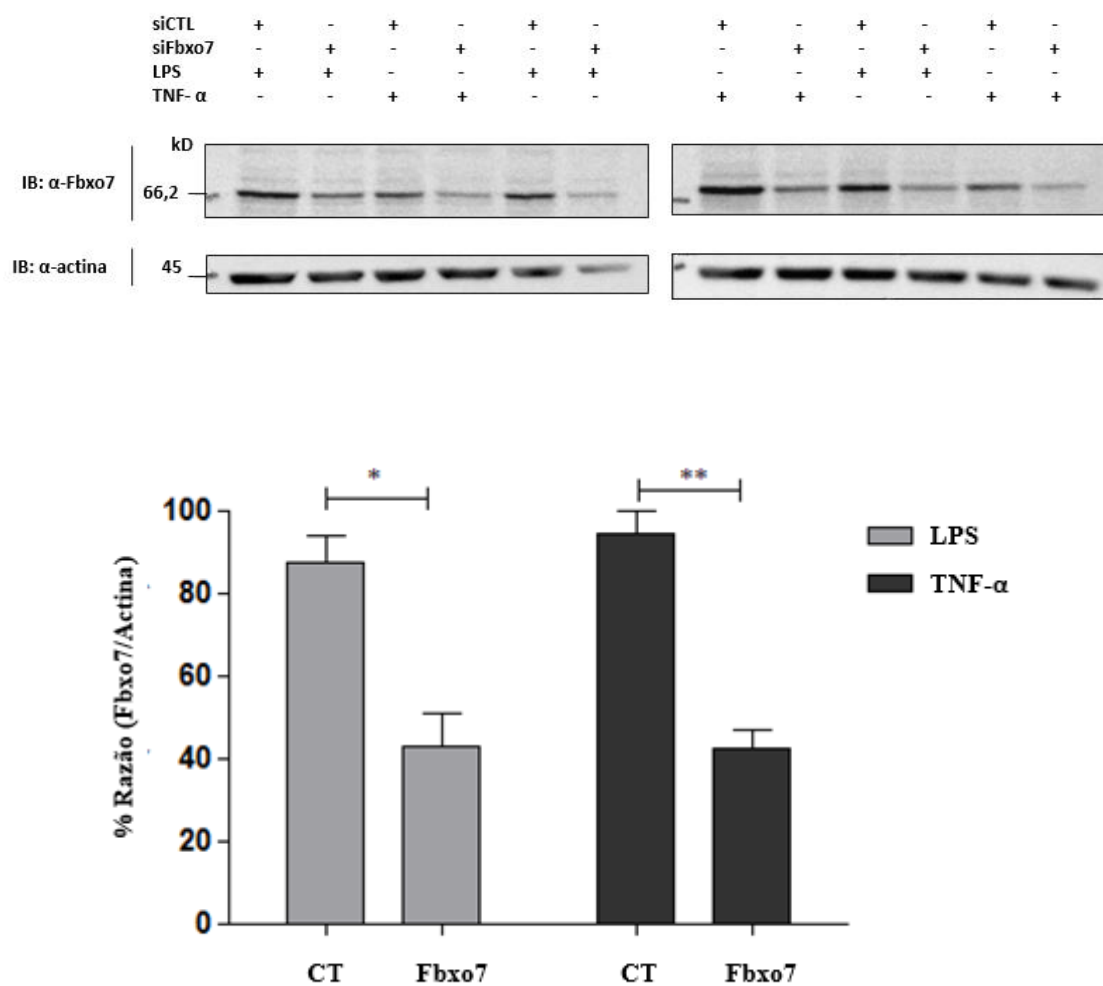


Figura 14. *Knockdown* do gene *FBXO7* por siRNA em THP-1 em células tratadas com LPS ou TNF- α . As células THP-1 diferenciadas foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7*. Um grupo foi estimulado com 1 μ g/mL de LPS e outro por 10 ng/mL de TNF- α , ambos por 16h. Após a lise celular, o extrato proteico total foi resolvido por *SDS-PAGE* e avaliado por *western blotting* com os anticorpos indicados. A densitometria das bandas foi feita no *ImageJ* e os gráficos gerados em *GraphPrism* através da razão densitométrica das bandas de *Fbxo7* pelo normalizador actina. Foi aplicado o teste estatístico teste t não-pareado e paramétrico, com n=3 para cada tratamento. Os asteriscos indicam o valor de p: *p<0,01, **p<0,001 e ***p<0,0001.

5.3. Quantificação por ELISA de IL-1 β presente no sobrenadante de células THP-1 estimuladas com LPS ou TNF- α

Os sobrenadantes das células THP-1 controle e *knockdown* de *FBXO7* estimuladas por LPS ou TNF- α foram utilizados para a quantificação de IL-1 β . Para isso, utilizamos um *kit* de ELISA específico para IL-1 β humana, o qual consiste em uma placa sensibilizada com anticorpos de captura anti-IL-1 β , onde o sobrenadante celular é aplicado juntamente com anticorpos de detecção conjugados a streptavidina-HRP. Dessa forma, essas citocinas são capturadas e sua absorbância é mensurada em seguida por leitor de placa. Foram utilizadas as médias das triplicatas técnicas subtraído a média do branco, sendo esses os valores normalizados em relação à curva de diluição. Além disso, utilizamos como grupo controle células THP-1 diferenciadas transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* sem estímulo por LPS ou TNF- α . Para cada tratamento, foi aplicada análise estatística para comparar a concentração de IL-1 β no controle e no *knockdown* de *FBXO7* do respectivo tratamento: estímulo com LPS, sem LPS ou com TNF- α .

Nas células THP-1 transfectadas que não receberam estímulo com LPS ou TNF- α , notamos uma grande semelhança na concentração de IL-1 β no sobrenadante do controle e do *KD* de *FBXO7* de aproximadamente 400 pg/mL em ambos os casos (**Figura 15**). Esse resultado era esperado, visto que não ocorreu a ativação da via de sinalização NF- κ B, e conseqüentemente, não ocorreu a transcrição dos genes regulados por esse fator de transcrição nuclear, incluindo o gene *IL-1 β* .

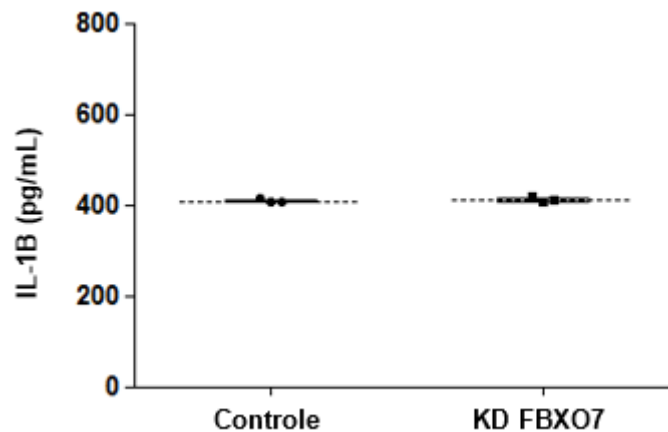


Figura 15. Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* sem estímulo de LPS ou TNF- α . As células THP-1 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7*. Após a transfecção, o sobrenadante celular foi recolhido para posterior quantificação de IL-1 β por ELISA, sem necessidade de diluição. O ensaio ocorreu em triplicata biológica e técnica. Os dados obtidos foram normalizados na curva de diluição e submetidos a análise estatística. O gráfico foi gerado em *GraphPrism*. Os pontos do grupo controle e *knockdown* de *FBXO7*(KD *FBXO7*) indicam as médias das triplicatas técnicas e as linhas centrais pontilhadas do gráfico, as medianas dos grupos. Foi aplicado o teste t não pareado e paramétrico com n=3, com valor de p significativo se p < 0.05.

Verificamos também que a concentração de IL-1 β presente no sobrenadante celular após o estímulo com LPS foi de aproximadamente 600 pg/mL tanto para o controle como para o *knockdown* de *FBXO7* (**Figura 16**). O aumento da concentração de IL-1 β em comparação ao grupo anterior, onde não houve o estímulo com LPS ou TNF- α , é justificado pela ativação da via NF- κ B por LPS, resultando em uma maior expressão de IL-1 β , indicando que as células responderam ao estímulo. Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos controle e *knockdown* de *FBXO7*, diferente do resultado obtido com *Human Cytokine Array*, onde observamos uma diminuição de IL-1 β com o *knockdown* de *FBXO7* quando estimulados com LPS.

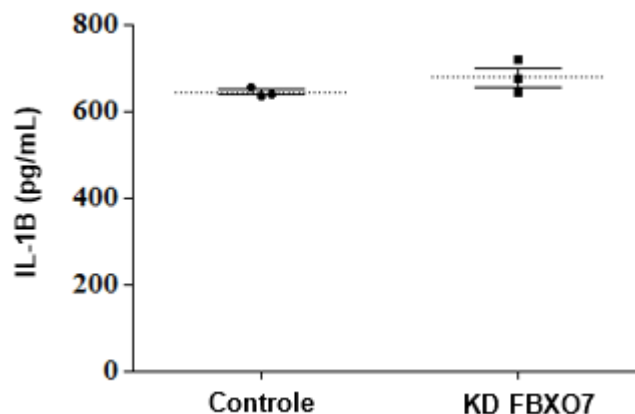


Figura 16. Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* com estímulo de LPS. As células THP-1 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO* e estimuladas com LPS por 16h. Posteriormente o sobrenadante celular foi recolhido para a quantificação de IL-1 β por ELISA. Os dados obtidos foram normalizados na curva de diluição e submetidos a análise estatísticas. Os pontos do grupo controle e *knockdown* de *FBXO7* (KD FBX07) indicam as médias das triplicatas técnicas e as linhas centrais pontilhadas do gráfico, as medianas dos grupos. Foi aplicado o teste t não-pareado e paramétrico com $n=3$ com valor de p relevante se $p < 0.05$. O gráfico e as análises estatísticas foram gerados em *GraphPrism*.

Nas análises das amostras é considerado uma curva padrão confiável quando R^2 apresenta um valor maior que 0,98 (AMSEN, VISSER, TOWN, 2009) porém nosso R^2 foi de 0,96 (**Figura 17**) e, nas triplicatas experimentais encontramos *outliers*. Não foi possível a repetição do ensaio devido a indisponibilidade do kit ELISA para novas quantificações de IL-1 β .

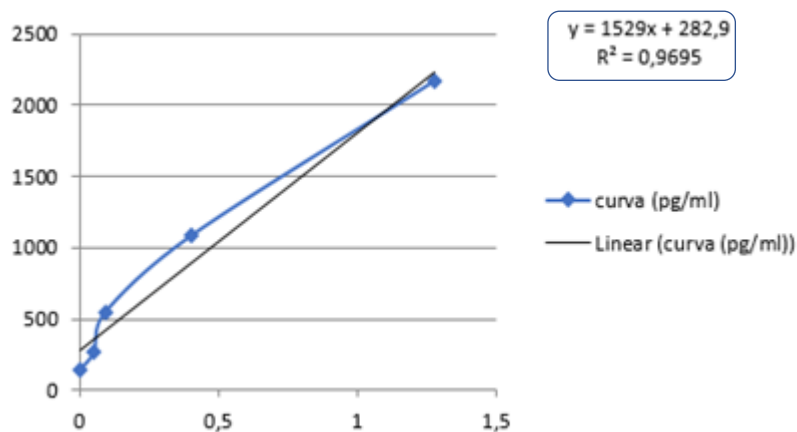


Figura 17. Curva padrão de diluição das amostras utilizadas para quantificação de IL-1 β presente no sobrenadante celular de THP-1 estimulada por LPS. A curva padrão foi gerada através do uso dos calibradores disponíveis no *kit* ELISA anti-IL-1 β , para avaliarmos onde nossas amostras se encontrariam na curva. Para isso, foi subtraído das amostras o valor da média do branco para acharmos a densidade óptica. Posteriormente foi gerada a equação da reta através da relação desses valores com os valores dos pontos da curva. O valor de x foi substituído pela média da triplicata técnica de cada amostra biológica, dessa forma, encontramos a concentração de IL-1 β de cada amostra. A curva padrão foi realizada em duplicata e o ensaio em triplicata biológica e técnica. Os dados foram gerados através do *Excel*.

Já a concentração de IL-1 β presente no sobrenadante de células THP-1 estimuladas por TNF- α foi de cerca de 400 pg/mL (**Figura 18**), muito semelhante à concentração de IL-1 β das células que não receberam tratamento de LPS ou TNF- α . Isso sugere que, possivelmente, não houve ativação da via do NF- κ B em células THP-1 com a concentração utilizada de TNF- α no ensaio (10 ng/mL) e, por essa razão, não houve ativação dos genes regulados por NF- κ B. Com isso, não foi possível avaliar a influência do *KD* de *FBXO7* na expressão de IL-1 β após estímulo de NF- κ B por TNF- α em células THP-1 e conseqüentemente comparar com os resultados obtidos após estímulo com LPS.

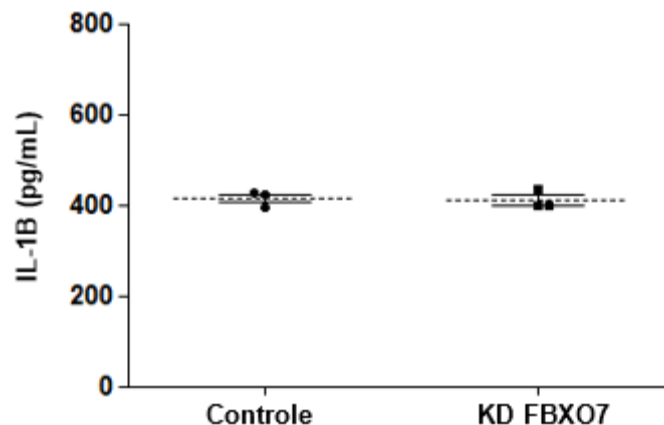


Figura 18. Concentração de citocina IL-1 β (pg/mL) presente no sobrenadante celular de THP-1 nos grupos controles e *knockdown* de *FBXO7* com estímulo de TNF- α . As células THP-1 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e estimuladas com TNF- α por 16h. O sobrenadante celular foi recolhido para a quantificação de IL-1 β por ELISA, sem necessidade de diluição, tendo o ensaio ocorrido em triplicata biológica e técnica. Os dados obtidos foram normalizados na curva de diluição e submetidos a análise estatísticas. Os pontos do grupo controle e *knockdown* de *FBXO7* (KD *FBXO7*) indicam as médias das triplicatas técnicas e as linhas centrais pontilhadas do gráfico, as medianas dos grupos. Foi utilizado o teste t não-pareado e paramétrico com $n=3$, com valor de p relevante se $p < 0.05$. O gráfico e as análises estatísticas foram gerados em *GraphPrism*.

5.4. Análise da expressão gênica por RT-qPCR de THP-1 estimulada por LPS em células *knockdown* de *FBXO7*

A RT-qPCR é uma ferramenta útil, rápida e confiável para análise da expressão gênica sob diferentes condições e processos biológicos. Com ela é possível realizar a medição da abundância do transcrito de mRNA de determinada citocina por ser uma ferramenta altamente sensível e que não necessita de uma grande quantidade de amostra (BUSTIN *et al.*, 2009).

Após a extração do RNA total das amostras e a verificação por gel de agarose de sua integridade (**Figura 19**), foi feito o cDNA das amostras a partir do RNA obtido.

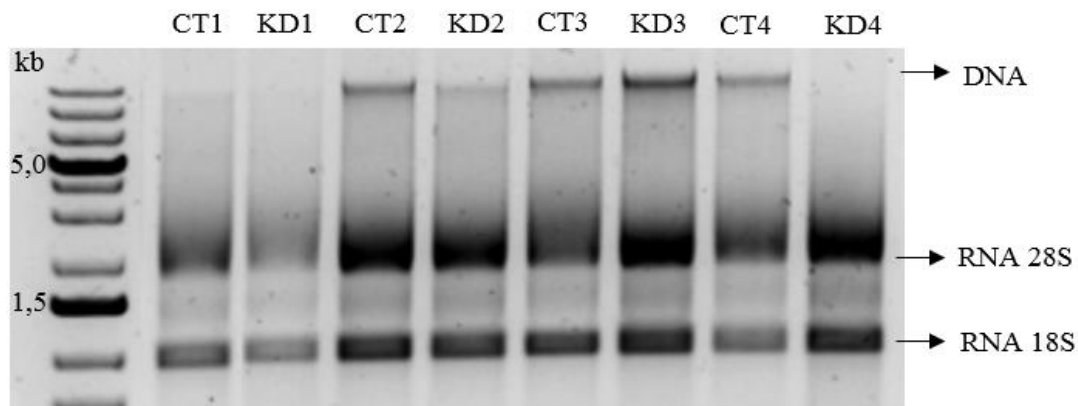


Figura 19. Integridade do RNA total extraído de células THP-1 estimuladas com LPS. Células THP-1 transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e estimuladas com LPS foram lisadas para a extração do RNA total. Após a extração, a integridade do ácido nucleico foi verificada em gel de agarose a 1% para a visualização das bandas ribossomais 28S e 18S, como indicado na figura. O ensaio ocorreu em quadruplicata. CT (1-4) corresponde às amostras obtidas de THP-1 transfectadas com siRNA controle. KD (1-4) se refere às amostras de THP-1 transfectadas com siRNA-*FBXO7*.

Após a síntese de cDNA das respectivas amostras, foram realizadas as reações de qPCR para avaliarmos a expressão do mRNA dos genes *FBXO7*, *IL-1 β* , *NF- κ B* e *IL-8*. Para isso, usamos genes de referência, chamados também de genes constitutivos, os quais apresentam sua expressão constante independentemente do tratamento aplicado ou condição fisiológica. Desse modo, variáveis como quantidade e qualidade do RNA extraído, eficiência das enzimas, diferenças nas pipetagens são normalizadas a partir desses genes (VANDESOMPELE et al, 2002; KOZERA, B.; RAPACZ, M, 2013; BUSTIN et al., 2009).

Normalmente, os genes *GAPDH* ou *ACTB* são escolhidos como normalizadores por apresentarem uma expressão estável. As diretrizes do *MIQE* ressaltam a importância de fazer a validação dos genes de referências para todos os ensaios de RT-qPCR (BUSTIN et al., 2009).

Em 2010, um estudo avaliou 21 genes de referência potenciais para a linhagem celular THP-1 diferenciada e identificaram *ACTB* e *RPL37A* como sendo os normalizadores mais confiáveis por apresentarem maior estabilidade (MAESS; SENDELBACH; LORKOWSKI, 2010). Como as diretrizes de *MIQE* recomendam o uso

de múltiplos genes de referência, para esse ensaio, além dos genes *ACTB* e *RPL37A*, foi utilizado *GAPDH* como normalizador mesmo apresentando menor estabilidade comparada aos outros dois. Por essa razão, a expressão dos genes *FBXO7*, *IL-1 β* , *NF-kB* e *IL-8* foi normalizada através da expressão dos genes de referência *ACTB*, *GAPDH* e *RPL37A*. As amplificações desses genes podem ser verificadas na imagem a seguir (**Figura 20**). Ao final das reações, foi estabelecido o limiar de detecção de fluorescência (*threshold*).

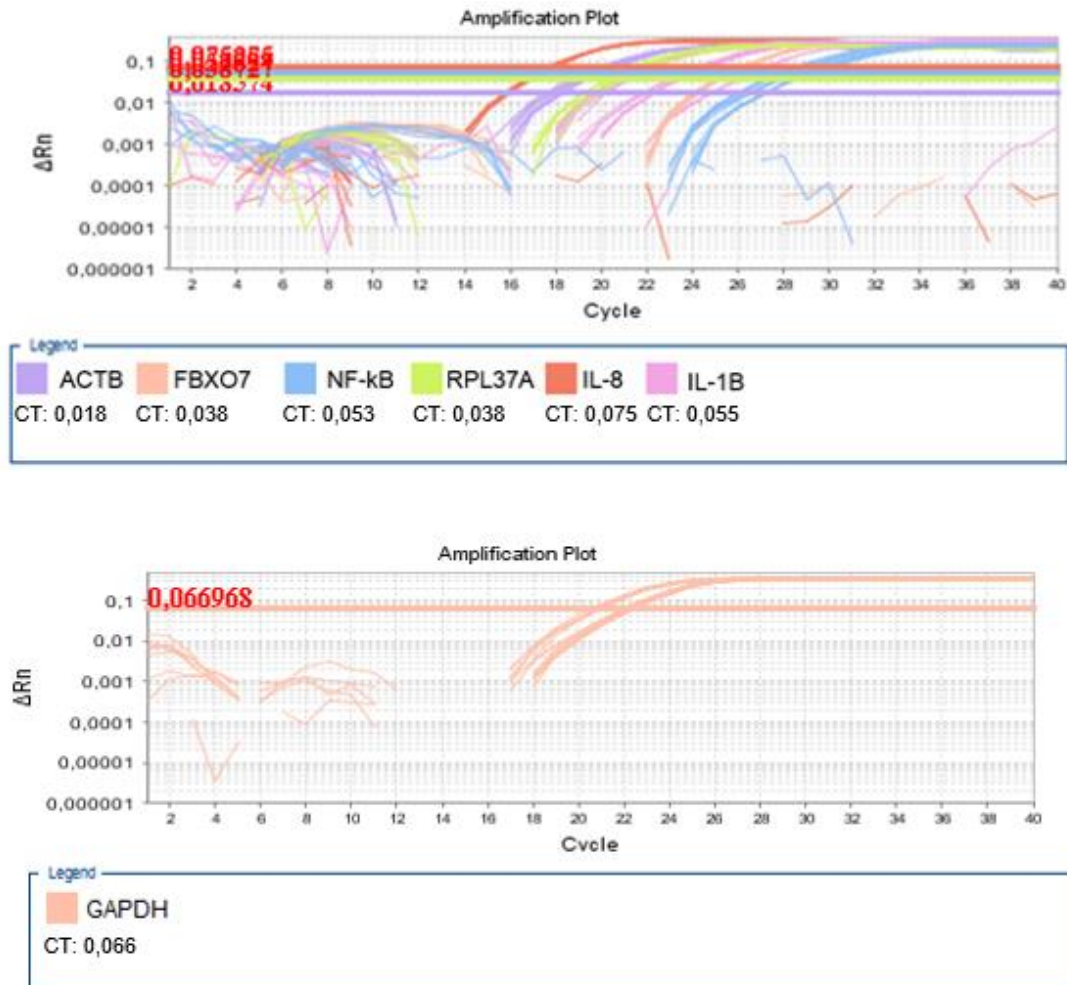


Figura 20. Amplificações dos genes *ACTB*, *FBXO7*, *NF-kB*, *RPL37A*, *IL-8*, *IL-1 β* e *GAPDH* de células THP-1 estimulada com LPS. As células THP-1 foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e posteriormente estimuladas com LPS. Foi realizada a lise celular para a extração de RNA total. Após teste de integridade, o RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA. Este, por sua vez, foi utilizado para as reações de qPCR. A curva de amplificação foi gerada pelo *software 7500 Fast Real-Time PCR*, onde o eixo y indica a quantidade de fluorescência do *SYBR Green*, e o eixo x a quantidade de ciclos. A amplificação de cada gene foi avaliada nas condições controle e *knockdown* de *FBXO7*. As linhas horizontais, também geradas pelo *software*, estão indicando o limiar de detecção de fluorescência (*Threshold*) de cada *primer*.

A especificidade das reações, formação de dímeros de *primers*, ligações inespecíficas foram avaliadas através da curva de *melting* das amostras dos respectivos genes com seus brancos (**Figura 21**). Foi observado ligação inespecífica apenas no gene *ACTB*. No entanto, como a T_m da ligação inespecífica e a T_m das amostras amplificadas estão distantes, infere-se que ocorreu a formação de dímeros de *primers*. Nos demais genes avaliados não houve ligação inespecífica, indicado pelos picos únicos.

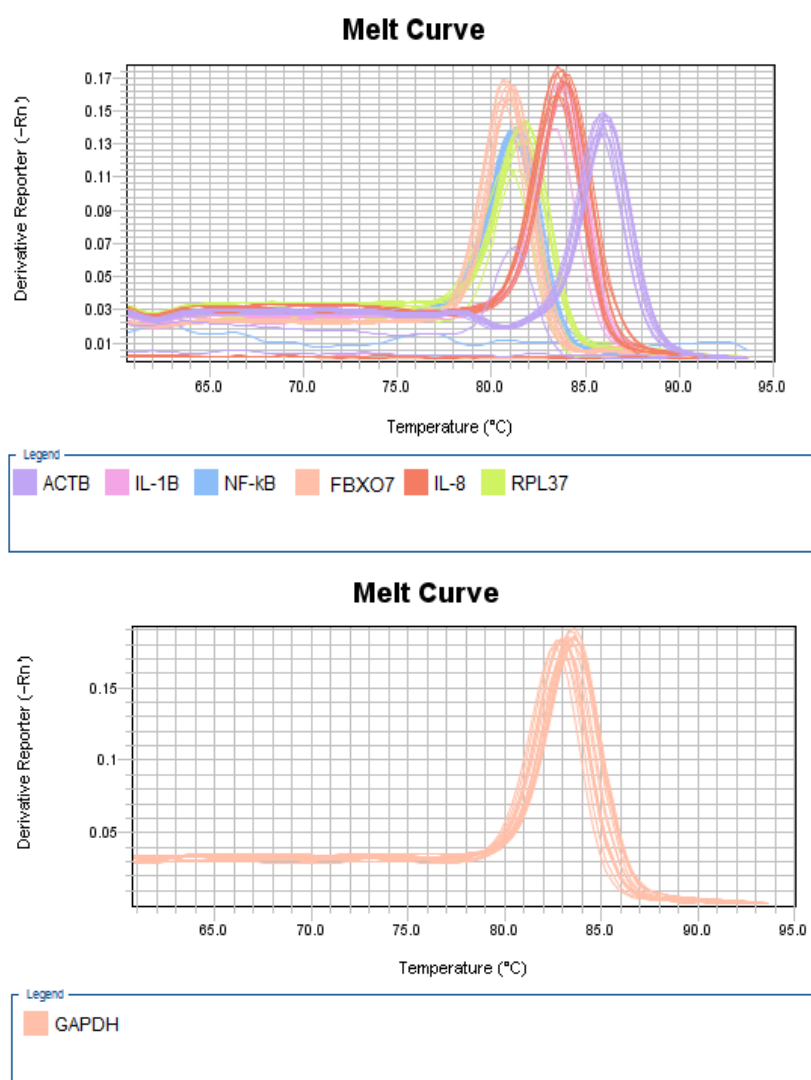


Figura 21. Curva de *melting* dos genes *ACTB*, *FBXO7*, *NF-kB*, *RPL37A*, *IL-8*, *IL-1 β* e *GAPDH* de células THP-1 estimulada. Foram avaliadas as amostras de THP-1 estimulada e transfectada com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* para cada gene, juntamente com seu branco (controle negativo). A curva de *melting* foi obtida pelo software 7500 *Fast Real-Time PCR* e está indicando a especificidade das reações nas amostras.

A eficiência de cada reação, seus valores de Cq e o cálculo da quantificação relativa foram determinados através do software *Real-Time PCR Miner* (ZHAO; FERNALD, 2005), sendo Cq o número do ciclo onde o sinal de fluorescência gerado pela amplificação da amostra intercepta a linha de *threshold*.

Após as análises de expressão de mRNA de *FBXO7* com relação a *ACTB*, *GAPDH* e *RPL37A*, observamos que ocorreu o silenciamento de aproximadamente 60% do gene *FBXO7*, corroborando os dados obtidos anteriormente por *western blotting*, indicando que o siRNA-*FBXO7* foi capaz de silenciar o gene *FBXO7* nas células THP-1 diferenciadas (**Figura 22**). Além disso, verificamos que a expressão de *IL-8* permaneceu inalterada com o *knockdown* de *FBXO7*. Esse resultado está em concordância com a quantificação obtida dessa citocina secretada pelo *array* de citocinas. A expressão do fator de transcrição nuclear *NF-kB* também permaneceu inalterada. Em contrapartida, verificamos que o *knockdown* de *FBXO7* causou uma regulação positiva, de aproximadamente o dobro, da expressão de *IL-1 β* (**Figura 22**), embora a quantificação proteica pelo *array* de citocinas tenha demonstrado uma redução significativa. Essa é a principal desvantagem do uso da técnica de RT-qPCR para esse tipo de aplicação, pois nem sempre a presença de mRNA vai refletir de forma precisa os níveis de proteína expressa (KOZLOV, 2009). Além disso, a secreção de citocinas como IL-10 e IL-4 por exemplo, é regulada em nível de tradução (LE *et al.*, 1997; SCHEU *et al.*, 2006), já citocinas como IL-1 β apresentam regulação pós-traducional (BAUERNFEIND *et al.*, 2009). Nossos dados, portanto, demonstram que não há uma relação direta entre a expressão de mRNA e a secreção da proteína IL-1 β em células THP-1 *knockdown* de *FBXO7* diferenciadas e estimuladas. Essa dissociação também foi observada em outros estudos utilizando células sanguíneas mononucleares periféricas (SCHINDLER; CLARK; DINARELLO, 1990; TURNER, M *et al.*, 1989) embora os mecanismos que explicam esta discrepância ainda não sejam compreendidos.

Considerando que a expressão de *NF-kB* permaneceu inalterada com o *knockdown* de *FBXO7* e que a secreção das citocinas reguladas por ele como IL-6, TNF- α , IL-8 (GUHA; MACKMAN; 2001; KIKUCHI *et al.*, 2002) também permaneceram inalteradas, sugere-se que possivelmente a proteína *Fbxo7* atue apenas na regulação de IL-1 β em macrófagos THP-1 e não na regulação direta do fator de transcrição *NF-kB*.

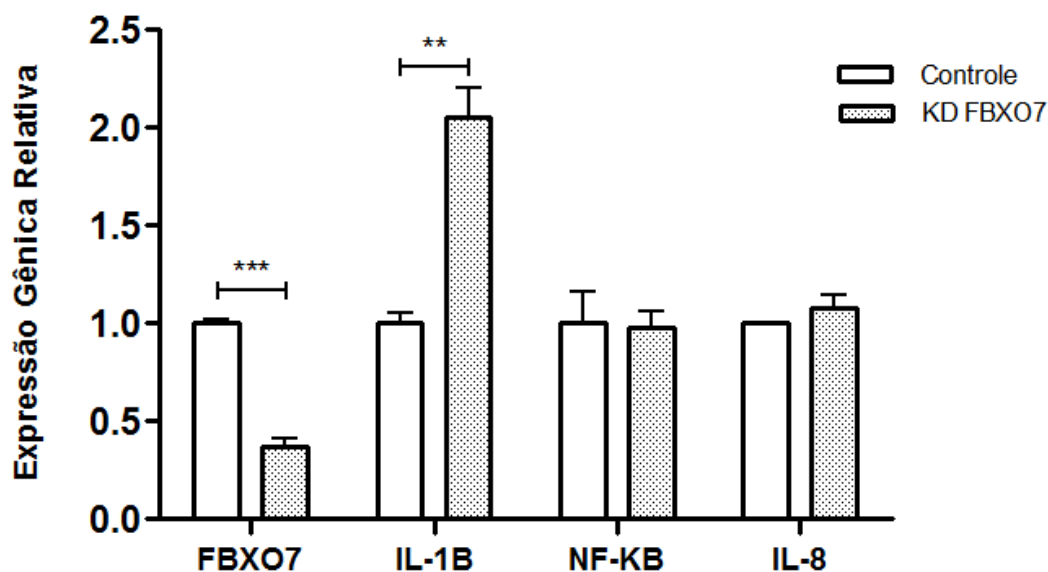


Figura 22. Expressão gênica relativa de *FBXO7*, *IL-1β*, *NF-κB* e *IL-8* em THP-1 estimulada. As células THP-1 diferenciadas foram transfectadas com siRNA controle ou siRNA-*FBXO7* e estimuladas com LPS. Após a lise celular e extração de RNA total foi realizado RT-qPCR. Os valores obtidos pelo software do Real-Time PCR Miner foram normalizados a partir da média geométrica dos níveis de expressão dos genes de referência: *ACTB*, *GAPDH* e *RPL37A*. As barras presentes no gráfico indicam a média e o erro padrão da quadruplicata do respectivo tratamento. Foi utilizado para cada gene o teste estatístico teste t não-pareado e paramétrico, com $n=4$, onde os asteriscos indicados estão relacionados ao valor de p : * $p<0,01$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$.

A produção de *IL-1β* ocorre em duas etapas distintas: inicialmente, ocorre a estimulação de sua síntese após um sinal inflamatório como o LPS, por exemplo, através da ativação da via do *NF-κB* que resulta em um acúmulo de pró-*IL-1β*, sua forma inativa, no citosol. Em seguida, um segundo sinal é necessário para que ocorra a formação de um complexo responsável pela ativação da caspase-1 chamado inflamassoma NLRP3. Este é composto por uma proteína sensora, outra adaptadora e uma efetora, a caspase-1. Esta enzima, depois de ativada pelo complexo, é capaz de clivar a forma pró-ativa da *IL-1β* e realizar o processamento dessa proteína para posteriormente realizar a sua secreção na forma ativa (GARLANDA; DINARELLO, MANTOVANI, 2013). No entanto, os mecanismos moleculares relacionados à montagem desse complexo não são

completamente compreendidos. Embora a produção e a secreção de IL-1 β seja crucial na resposta a infecções, sua produção desregulada contribui para a aquisição de diversas doenças, tais como: diabetes tipo 2, aterosclerose, artrite reumatoide e demais doenças autoimunes (WOOFF *et al.*, 2019). Desse modo a produção dessa citocina é rigidamente regulada pela célula desde o nível de sua transcrição até sua secreção.

Considerando que a modulação da estabilidade do mRNA é uma forma eficiente para regular a expressão gênica, correspondendo a um importante mecanismo regulador da expressão de citocinas em células do sistema imune (IVANOV; ANDERSON, 2013), sugerimos que o aumento da transcrição de *IL-1 β* após o *knockdown* de *FBXO7* em células THP-1 estimuladas, pode ter sido um mecanismo utilizado pela célula para compensar a redução ocorrida a nível proteico de IL-1 β . Essa redução avaliada após o *knockdown* de *FBXO7* pode sugerir ainda que a proteína Fbxo7 contribui de algum modo para o aumento da degradação de IL-1 β , porém, outros ensaios são necessários para avaliarmos os níveis intracelulares de IL-1 β e sua relação com a proteína Fbxo7.

6. CONCLUSÃO E CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO

Embora a proteína Fbxo7 tenha sido associada como regulador negativo da via NF- κ B em células U2OS estimuladas por TNF- α , nossos dados demonstram que o *knockdown* de *FBXO7* não causou em macrófagos THP-1 estimulados por LPS o aumento da expressão dos genes regulados pelo NF- κ B. Ao contrário, observamos redução do conteúdo proteico de CCL1, CCL3, IL-1 β e IL-10. Analisando os transcritos de mRNA de *NF- κ B*, verificamos que não houve alteração pelo *knockdown* de *FBXO7*, porém, ocorreu um aumento na transcrição de *IL-1 β* . Isso sugere que essas células podem estar usando um mecanismo de compensação à redução do nível proteico de IL-1 β através do aumento da transcrição deste gene.

Considerando que a IL-1 β sofre regulação pós-traducional, sugerimos que a proteína Fbxo7 participe desse processo em macrófagos THP-1 ao invés de atuar diretamente na regulação do fator de transcrição NF- κ B. Desse modo, este trabalho contribuiu para a compreensão do papel da proteína Fbxo7 na produção de citocinas em células THP-1 estimuladas. Logo, o desafio está em entender os mecanismos de regulação de Fbxo7 nos níveis proteicos de IL-1 β e quais os aspectos de suas funções podem ser utilizados posteriormente para fins terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS

- ABD-HAMID, N. A. et al. Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology. **Planta**, v. 3, p. 251-268, 2020.
- ABE, M. et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 2195-2202, 2002.
- ABEL, Y.; REDERSTORFF, M. Gene expression knockdown by transfection of siRNAs into mammalian cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 1296, p.199-202, 2015.
- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984-1010, 2016.
- AKIRA, S; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.499-511, 2004.
- ALBER, A. B.; SUTER, D. M. Dynamics of protein synthesis and degradation through the cell cycle. **Cell Cycle**, v. 18, n. 8, p. 784–794, 2019.
- AMSEN, D. et al. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. **Methods in Molecular Biology**, v.511, p. 107-142, 2009.
- ANGERS, S. et al. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 590–593, 2006.
- BABA, T. et al. MIP-1 α /CCL3-mediated maintenance of leucemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 2661-2673, 2013.
- BAEUEERLE, P. A.; BALTIMORE, D. Nf- κ B: Ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 1996.
- BAUERNFEIND, F. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **The Journal of Immunology**, v.183, p.787-791, 2009.
- BERNDSSEN, C. E.; WOLBERGER, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 301–307, 2014.

BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6-15, 2019.

BİRİKEN, D.; YAZIHAN, N.; YILMAZ, Ş. Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 52, n. 2, p. 147–155, 2018

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAO, Q. et al. Long non-coding RNA-GAS5 acts as a tumor suppressor in bladder transitional cell carcinoma via regulation of chemokine (C-C motif) ligand 1 expression. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 27-34, 2016.

CASTELLINO, F. et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. **Nature**, v. 440, p. 890-895, 2006.

CENCIARELLI, C. et al. Identification of a family of human F-box proteins. **Current Biology**, v. 9, n. 20, p. 1177–1179, 1999.

CHAN, F. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. **Cytokine**, v. 37, p. 101-107, 2007.

CHANPUT, W. et al. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. **Food and Function**, v. 1, n. 3, p. 254–261, 2010.

CHEN, Y, L. et al. Blocking ATM-dependent NF-κB pathway overcomes niche protection and improves chemotherapy response in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 33, p. 2365-2378, 2019.

CHOI, S. J. et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1833-1841, 2001.

CHRISTMAN, J. W.; LANCASTER, L. H.; BLACKWELL, T. S. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. **Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 11, p.1131-1138, 1998.

COMBADIÈRE, C. et al. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 147-152, 1996.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

CURFS, J.; MEIS, J.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742-780, 1997.

de WAAL-MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 915-924, 1991.

DENG, L. et al. Activation of the I κ b kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 351–361, 2000.

DESHAIES, R; JOAZEIRO, C. RING domain E3 ubiquitin ligases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 399-434, 2009.

ELOMAA, O. et al. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 8, p. 4530–4538, 1998.

ENGELHARDT, K. R.; GRIMBACHER, B. IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 380, p. 1-18, 2014.

ERUSLANOV, E. et al. Expansion of CCR8 inflammatory myeloid cells in cancer patients with urothelial and renal carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 1670-1680, 2013.

FARMAKI, E. et al. Induction of the MCP chemokines cluster cascade in the periphery by cancer cell-derived CCL3. **Cancer Letters**, v. 389, p. 49-58, 2017.

FERRERO-MILIANI. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 generation. **British Society for Immunology**, v.147, p. 227-235, 2006.

FRAILE, J. M. et al. Deubiquitinases in cancer: New functions and therapeutic options. **Oncogene**, v. 31, n. 19, p. 2373–2388, 2012.

FRESCAS, D; PAGANO, M. Deregulated proteolysis by the F-box protein SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.8, p.438-449, 2008.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, p. 1003-1018, 2013.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ, F. Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews**, v. 262, p. 36-55, 2014.

GRIFFITH, J. K.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokines receptors, positioning cells for host defense and immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 659-702, 2014.

GUHA, M; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cell Signalling**, v.13, p. 85-94, 2001.

HARHAJ, E; DIXIT, V. Deubiquitinases in the regulation of NF-kB signaling. **Cell Research**, v.21, n.1, p.22-39, 2010.

HERHAUS, L; DIKIC, I. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. **EMBO Reports**, v. 16, n. 9, p. 1071-1083, 2015.

HOESEL, B; SCHMID, J. The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 86-101, 2013.

HOLDSWORTH, S. R.; CAN, P. Y. Cytokines: Names and numbers you should care about. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243–2254, 2015.

HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P. Y. Cytokines: names and numbers you should care about. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243-2254, 2015.

HUANG, X.; DIXIT, V. M. Drugging the undruggables: Exploring the ubiquitin system for drug development. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 484–498, 2016.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. A guide to chemokines and their receptors. **The FESB Journal**, v. 285, p. 2944-2971, 2018.

HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 2, p. 98-112, 2019.

IVANOV, P; ANDERSON, P. Post-transcriptional regulatory networks in immunity. **Immunological Reviews**, v. 253, p. 253-272, 2013.

JAFFER, U.; WADE, R.; GOURLAY, T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. **HSR Proceedings in Intensive Care Cardiovascular Anesth**, v. 2, n. 3, p. 161-175, 2010.

JENTSCH, S. The Ubiquitin-conjugation system. **Annual Review of Genetics**, v. 26, n.1, p. 179-207, 1992.

JOSEPH, S.; SCHULZ, J. B.; STEGMÜLLER, J. Mechanistic contributions of FBXO7 to Parkinson disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 144, n. 2, p. 118–127, 2018.

KAWAI, T; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p.816-825, 2006.

KAWAI, T; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 816-825, 2006.

KIKUCHI, T. et al. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- κ B transcription factors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p. 745-755, 2002.

KIM, J. et al. PINK1 deficiency enhances inflammatory cytokine release from acutely prepared brain slices. **Experimental Neurobiology**, v. 22, p. 38-44, 2013.

KIRK, R. et al. Structure of a conserved dimerization domain within the F-box protein Fbxo7 and the PI31 proteasome inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 32, p. 22325–22335, 2008

KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n.5, p. 937-953, 2009.

KOMANDER, D; RAPE, M. The ubiquitin code. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 203-229, 2012.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, p. 391–406, 2013.

KOZLOV, S. V. Inflammation and cancer. Methods and protocols. Volume 1: Experimental models and practical approaches. Preface. **Methods in Molecular Biology**, v. 511, p. 1–27, 2009

KÜHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.

KUIKEN, H. J. et al. Identification of F-box only protein 7 as a negative regulator of NF-kappaB signalling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 2140–2149, 2012.

LAMAN, H. et al. Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6. **The EMBO journal**, v. 24, p. 3104-3116, 2005.

LANG, T. et al. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

LAU, T. S. et al. Cancer cell-derived lymphotoxin mediates reciprocal tumour-stromal interactions in human ovarian cancer by inducing CXCL11 in fibroblasts. **The Journal of Pathology**, v. 232, p. 43-56, 2014.

LE, T. et al. Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. **Blood**, v. 89, p. 4112-4119, 1997.

LE, Y. et al. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 1, n. 2, p. 95-104, 2004.

LEE, J. E. et al. The steady-state repertoire of human SCF ubiquitin ligase complexes does not require ongoing Nedd8 conjugation. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1–9, 2011.

LEE, J.S et al. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9379-9388, 2004.

LEWIS, C.; MCGEE, J. The macrophage. **Oxford University Press**, Nova Iorque (2003).

LI, Q. et al. Enhanced NF-kB activation and cellular function in macrophages lacking Ikb kinase 1 (IKK1). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p.12425-12430, 2005.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–126, 2000.

LIU, Y. et al. Chemical inhibition of FBXO7 reduces inflammation and confers neuroprotection by stabilizing the mitochondrial kinase PINK1. **JCI Insight**, v. 5, n. 11, p. 1–17, 2020.

LOHMANN, E. et al. A new F-box protein 7 gene mutation causing typical Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, p. 1130-1133, 2015.

LONDON, N. R. et al. Targeting Robo4-dependent slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 23, 2010.

LUND, M. E. et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of Immunological Methods**, v. 430, p. 64–70, 2016.

LUND, M. et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of Immunological Methods**, v. 430, p. 64–70, 2016.

LUO, A. et al. Myeloid-derived suppressor cells recruited by chemokine (C-C motif) ligand 3 promote the progression of breast cancer via phosphoinositide 3-kinase-protein

kinase B-mammalian target of rapamycin signaling. **Journal of Breast Cancer**, v. 23, p. 141-161, 2020.

MAESS, M. B.; SENDELBACH, S.; LORKOWSKI, S. Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 90, 2010.

MALEK, R. et al. Role of nuclear factor κ B in the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 59, p. 25-33, 2007.

MARTINET, W et al. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1025-1029, 2003.

MATSUDA, N. et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damage mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **Journal of Cell Biology**, v. 189, p. 211-221, 2010.

MEFFERT, M; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF- κ B. **TRENDS in Neurosciences**, v.28, p.27-43, 2005.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 455-481, 2002.

MILO, R; PHILIPS, R. **Cell Biology by the numbers**. 1.ed. Garland Science, 2016.

MORRIS, K. V et al. Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. **Looney Source**, v. 305, n. 5688, p. 1289–1292, 2015

MORTIER, A.; VAN DAMME, J.; PROOST, P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. **Immunology Letters**, v. 145, p. 2-9, 2012.

MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 75-84, 2004.

NELSON, D. E.; RANDLE, S. J.; LAMAN, H. Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. **Open biology**, v. 3, n. 10, p. 130131, 2013.

NEWTON, K. et al. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. **Cell**, v. 134, p. 668-678, 2008.

NIJMAN, S. M. B. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating

enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773–786, 2005.

NIKITA, E. et al. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2821, 2018.

OLDSTONE, M. B. A jekyll and hyde profile: type 1 interferon signaling plays a prominent role in the initiation and maintenance of a persistent virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. 31-36, 2015.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family cytokines IL-10 and IL-22: from basic Science to clinical translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871-891, 2019.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p.45-50, 2007.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p.45-50, 2007.

PARK, J. et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis-CREB and NF- κ B as key regulators. **Immunity**, v.23, p.319-329, 2005.

POLTRAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. **Science**, v. 282, p.2085-2088, 1998.

POPOVIC, D; VUCIC, D; DIKIC, I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. **Nature Medicine**, v.20, p.1242-1253, 2014.

POWERS, E. T. et al. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 959–991, 2009.

RANDLE, S; LAMAN, H. Structure and function of Fbxo7/PARK15 in Parkinson’s disease. **Current protein and Peptide Science**, v.18, p. 715-724, 2016.

RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1223-1229, 2009.

RICKERT, R. C.; JELLUSOVA, J.; MILETIC, A. V. Signaling by the TNFR superfamily in B-cell biology and disease. **Immunological Reviews**, v. 244, n. 1, p. 115–133, 2012.

RUCKES, T. et al. Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. **Blood**, v. 98, p. 1150-1159, 2001.

RUTZ, S.; OUYANG, W. Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 605-612, 2011.

SCHALLER, T. H. et al. Chemokines as adjuvants for immunotherapy: Implications for immune activation with CCL3. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, p. 1049-1060, 2017.

SCHEU, S. et al. Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. **Nature Immunology**, v. 7, p. 644-651, 2006.

SCHINDLER, R; CLARK, B; DINARELLO. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 18, p.10232-7, 1990.

SCHONOR, Michael et al. Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 344, n. 2, p.109-115, 2009.

SHARIF, O. et al. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. **BMC Immunology**, v. 8, p. 1–17, 2007.

SHOJAEE, S. et al. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500K SNP arrays. **The American Journal of Human Genetics**, v.82, p.1375-1384, 2008.

SHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 555-561, 1996.

SIEBENLIST, U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1332, n. 1, p. R7-13, 1997.

SMALE, S. T.; TARAKHOVSKY, A.; NATOLI, G. Chromatin contributions to the regulation of innate immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 489–511, 2014.

SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. The chemokine system in innate immunity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, 2015.

SOROKIN, A; KIM, R; OVCHINNIKOV, L. Proteasome system of protein degradation and processing. **Biochemistry**, v. 74, p. 1411-1442, 2009.

SPINETTI, G. et al. The chemokine receptor CCR8 mediates rescue from dexamethasone-induced apoptosis via an ERK-dependent pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 201-207, 2003.

SWATEK, K. N.; KOMANDER, D. Ubiquitin modifications. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 399–422, 2016.

TEKCHAM, D. S. et al. F-box proteins and cancer: An update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects. **Theranostics**, v. 10, n. 9, p. 4150–4167, 2020.

TIFFANY, H. L. et al. Identification of CCR8: a human monocyte and thymus receptor for the CC chemokine I-309. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 1, p. 165-170, 1997.

TOMINAGA, K. et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. **Biochemistry Biophys Research Communications**, v. 283, p.821, 2001.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, 2006.

TURNER, M. et al. Regulation of expression of human IL-1 alpha and IL-1beta genes. **The Journal of Immunology**, v. 143, p. 3556-3561, 1989.

WAJANT, H; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. **FEBS J**, v. 278, p. 862-876, 2011.

WANG, C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v.412, p.346-351, 2001.

WANG, R. et al. Blocking migration of regulatory T cells to leukemic hematopoietic microenvironment delays disease progression in mouse leukemia model. **Cancer Letters**, v. 469, p. 151-161, 2020.

WANG, X. et al. Targeting deubiquitinase USP28 for cancer therapy. **Cell Death and**

Disease, v. 9, n. 2, 2018.

WANG, X. et al. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 2, 2019.

WICKLIFFE, K. et al. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. **TRENDS Cell Biol**, v. 21, p. 656-663, 2011.

WIELDEMANN, G. M. Peritumoral CCL1 and CCL2 expressing cells in hepatocellular carcinomas shape the tumour immune infiltrate. **Phatology**, v. 51, p. 586-592, 2019.

WIJK, S. J. L.; TIMMERS, H. T. M. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 981–993, 2010.

WOOFF, Y. et al. IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. **Frontiers in Immunology**, v.10, p.1610-1618, 2019.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, v.1, p. 425-433.

XIE, J.; JIN, Y.; WANG, G. The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2019.

XU, Y. et al. Sox2 communicates with Tregs through CCL1 to promote the stemness property of breast cancer cells. **STEM Cells**, v. 35, p. 2351-2365, 2017.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 69, n. 2, p. 482–489, 2009.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2005.

ZHOU, L. et al. Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cell into macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 335, p. 283-289, 2010.

ZHOU, Z. et al. F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 22, p.6314-6330, 2015.

ZINGONI, A. et al. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 547-551, 1998.

ZLOTNIK, A.; BURKHARDT, A. M.; HOMEY, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 597-606, 2011.