

## GABARITO

1. Células da imunidade inata reconhecem sinais do meio extracelular por meio de receptores em sua superfície. Uma classe importante de receptores nessas células são os receptores de reconhecimento de padrão (PRR), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs). A ligação dos PAMPs ou DAMPs aos PRRs ativa a porção citoplasmática dos receptores, com transdução de sinal até o núcleo da célula, gerando modificações na transcrição de genes específicos. Sobre este processo biológico, responda:

a) Quais os tipos de RNA explorados no artigo de Allen e colaboradores, e qual o papel deles na expressão gênica (10 pts)?

No artigo de Allen são abordados os pequenos RNAs microbianos (msRNA), RNA mensageiros (mRNA), RNA ribossomal (rRNA), RNA transportador (tRNA) e pequenos RNA de interferência RNAs (siRNA). Os msRNA são estruturais/ribossomais. Nos hospedeiros, Allen e colaboradores mostraram que os msRNA ativam os receptores do tipo toll 8 (TLR8) promovendo a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo da célula e aumento da transcrição gênica e, consequentemente, aumento de mRNA de genes alvos. O mRNA é uma cópia de um segmento do DNA e leva a informação genética para a tradução de proteínas nos ribossomos. Os ribossomos são compostos de rRNA e proteínas ribossômicas. Os rRNA são importantes no processo de tradução de proteínas, com função catalítica, de reconhecimento do códon de iniciação e alinhamento do mRNA, relevantes na decodificação do mRNA e na produção de proteínas. Neste processo o tRNA conecta o código genético do mRNA aos aminoácidos correspondentes, no qual cada tRNA carrega um aminoácido específico. Os siRNA regulam a transcrição gênica através do silenciamento da expressão de genes específicos, através da degradação do mRNA alvo ou inibição da sua tradução.

b) A figura 1G mostra que o tratamento com nLDL induz a expressão de mRNA para IL1B e IL6 em macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (derivados de monócitos estimulados com GM-CSF e IFNgama), enquanto o tratamento com nLDL não altera a expressão de mRNA de IL1B e IL6 em macrófagos alternativamente ativados (derivados de monócitos estimulados com M-CSF, IL4 e IL-13). Quais possíveis diferenças de controle da expressão dos genes para IL1B e IL6 nos subtipos de macrófagos que poderiam explicar estes resultados (10 pts)?

Abordar possíveis controles diferenciais na expressão gênica. Ex: Presença e atividade aumentada de fatores de transcrição específicos, ex: NF $\kappa$ B, nos macrófagos pró-inflamatórios. Marcas epigenéticas diferenciais nas regiões promotoras gênicas. Por exemplo, a ausência de metilação de citosinas e presença de acetilação de caudas de histonas nas regiões promotoras dos genes de ILB e IL6 dos macrófagos pró-inflamatórios, o que leva ao menor empacotamento da cromatina e maior expressão destas citocinas nas células com fenótipo pró-inflamatório. Foi considerada nota integral, as respostas contendo pelo menos 2 possíveis controles, e parcial quem considerou apenas um.

**2.** Nos artigos publicados em revistas científicas de elevada relevância e alcance é muito comum a utilização de múltiplas metodologias para validar ou confirmar um mesmo resultado, por exemplo, técnicas que avaliam tanto a expressão gênica quanto a presença do produto do gene.

**a)** A Figura 1 demonstra que o tratamento com nLDL induz inflamação em macrófagos pela via do fator de transcrição NF-KB. Aborde quais metodologias foram utilizadas e como elas explicam a questão central – inflamação induzida pela LDL (10 pts).

As metodologias utilizadas na figura 1 são:

a. Sequenciamento de RNA dos macrófagos THP-1 diferenciados por PMA tratados com 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> nLDL por 24 horas, comparado com controle não tratado e análises de bioinformática dos dados gerados. Com isso foram observados 365 genes regulados positivamente e 141 regulados negativamente (fig 1A). Com a análise de enriquecimento para fatores de transcrição, os autores observaram que vários destes genes estavam relacionados à NF-kB e C/EBPβ (reguladores de inflamação e arteriosclerose) (1B). Em 1C eles apresentam ainda um *heatmap* dos transcritos da figura 1A dentro do cluster ReLA (NF-kB p63)

b. PCR quantitativa (qPCR) por transcriptase reversa (RT-qPCR) para avaliar a expressão relativa de IL1B, IL6, TNF, CXCL2, PLIN2 e IL10 em células THP-1 em três diferentes tempos pós exposição ao nLDL para a validação da resposta observada no sequenciamento de RNA, uma vez que a resposta ao nLDL envolve a produção ou inibição de citocinas relacionadas à NF-kB e C/EBPβ (Fig 1D); PCR quantitativa para verificar a expressão de IL1B, IL6 e TNF em PBMC (CD14+) recém isoladas ou diferenciadas por GM-CSF e IFN ou, alternativamente por M-CSF, IL-4 e IL13, tratadas ou não com nLDL para verificar se o nLDL também induz um padrão inflamatório nas células humanas provenientes de cultivo primário e em qual tipo de macrófagos (Fig 1G) e PCR quantitativa (qPCR) por transcriptase reversa (RT-qPCR) para avaliar a expressão relativa com relação ao tempo (Fig. 1H) ou dose (Fig. 1J) resposta de IL1B, IL6, TNF, CXCL2, PLIN2 em PBMC humanos tratados com GM-CSF e IFN.

c. ELISA para dosagem de citocinas. Foi testada a produção de IL1, IL-6, TNF, VEGF-A, IL-12 p70 IFN em células THP1 tratadas ou não com nLDL em diferentes tempos de exposição (Fig 1E). Também foi dosada a produção de IL6 em PBMC para a verificação do tempo (Fig. 1I) ou dose (Fig. 1K) resposta em PBMC tratadas com GM-CSF e IFN.

d. Western blotting (imunoblotting) para verificar a produção de APOB100, PLIN2, IkBa, IKK $\beta$  e IL1 em células THP-1 após exposição à diferentes doses de nLDL (verificação de efeito dose-resposta)

Em resumo, os autores começaram os testes demonstrando que o tratamento de macrófagos THP-1 (linhagem de células humanas) com nLDL poderia induzir a via do NF-kB e C/EBP $\beta$ , por uma metodologia de alto rendimento (sequenciamento de RNA) e depois validaram o modelo deles mostrando que genes relacionados a esta via estavam diferencialmente expressos em células THP1, em diferentes tempos (RT-qPCR). Também utilizaram ELISA, que é uma metodologia quantitativa para demonstrar a produção de citocinas [ou seja, que o produto do gene está de fato sendo expresso, já que mecanismos pós-transcpcionais podem afetar a produção das proteínas (ou citocinas, neste caso), afetando a obtenção do produto final do gene, que neste caso são as citocinas avaliadas]. Eles também validaram o modelo em cultivo primário de PBMC de humanos (CD14+) e verificaram que as PBMC diferenciadas com GM-CSF e IFN (perfil inflamatório), mas não as diferenciadas alternativamente com M-CSF, IL4 e IL13 apresentavam um perfil de resposta ao nLDL semelhante às células THP1 em função do tempo ou dose. Isso foi observado tanto em relação à expressão de genes relacionados ao NF-kB e C/EBP $\beta$  (RT-qPCR), quanto à produção de IL-6, mensurada por ELISA. Finalmente, a produção de algumas proteínas de forma dose-resposta ao tratamento com nLDL também foi avaliada por imunoblotting, que é uma técnica que também mensura o produto final do gene (proteínas) de forma semi-quantitativa. Com este conjunto de resultados eles demonstraram que nLD produz efeitos tempo e dose resposta tanto em macrófagos de linhagem quanto em células primárias e que estes efeitos estão relacionados à via do NF-kB e C/EBP $\beta$ . Além disso, o tratamento com nLDL resulta no acúmulo de APOB, uma proteína essencial do LDL e na formação de droplets em macrófagos, já que resulta no acúmulo de PLIN2. Este conjunto de experimentos demonstrou o papel do nLDL na ativação de macrófagos via NF-kB e C/EBP $\beta$ .

Tópicos avaliados quanto à menção/discussão, durante a correção da questão:

- Sequenciamento de RNA e análises de bioinformática
- Importância do NF-kB e C/EBP $\beta$
- RT-qPCR
- ELISA
- Imunoblotting
- Uso de diferentes tipos celulares (células de linhagem – THP1 e de cultivo primário – CD14+ derivadas de PBMC)
- Tempo e dose-resposta

**b)** Os autores também utilizaram diferentes abordagens experimentais para identificar os receptores responsáveis pelo reconhecimento do RNA microbiano nas LDL. Dentre os diversos receptores considerados, qual receptor foi identificado como essencial para a ativação dos macrófagos? Como a participação desses receptores foi comprovada ou descartada experimentalmente? Cite as abordagens experimentais utilizadas (10 pts).

Como os próprios autores mencionam, TLR8 é necessário e suficiente para a ativação de NF- $\kappa$ B em macrófagos humanos. Vários experimentos corroboraram esta hipótese.

Primeiro, embora os autores tivessem demonstrado que as partículas de nLDL isoladas por eles não continham LDL oxidado (oxLDL) (material suplementar) eles fizeram alguns experimentos para descartar a presença de oxLDL e o efeito relacionado a estas partículas. Eles trataram previamente as células CD14+ (diferenciadas por GM-CSF e IFN) com C29, que é um inibidor de TLR2, e viram que este pré-tratamento não bloqueou o efeito produzido por nLDL, verificado pela expressão de IL1B, IL6 e TNF (Fig. 2A) ou pela produção de IL-6 (testada por ELISA) (Fig. 2B) induzidas pelo tratamento com nLDL. Além disso, o tratamento com nLDL não induziu a expressão gênica de HMOX1, gene chave cuja produção é induzida por oxLDL. Com estes primeiros testes os autores demonstraram que o efeito observado realmente é dependente de nLDL e não das partículas oxidadas (oxLDL), já que estas estimulam TLR2.

Em seguida, eles verificaram a secreção de TNF em macrófagos THP1 pré-tratados com bafilomicina A ou EGTA. Enquanto o EGTA, que é um quelante, aboliu a secreção de TNF em resposta à LPS (ligante de TLR4), ssRNA40 (ligante de TLR8) e nLDL, a baflomicina, que é um inibidor da maturação do fago-lisossomo, só aboliu o efeito ao ssRNA40 e ao nLDL, mostrando que o efeito observado ao tratamento com nLDL se deve, provavelmente à um receptor endossomal (como, por exemplo, TLR8) (Fig. 2C).

Cada receptor de TLR foi ainda co-expreso em células HEK293T com um gene repórter de luciferase controlado por um promotor de NF- $\kappa$ B e as células foram tratadas com o ligante de cada TLR ou com nLDL e foi observado que o tratamento com nLDL só ativou o TLR8 (Fig. 2D),

Por immunoblot foi demonstrado que os níveis de TRL nas células HEK transfectadas foi semelhante aos níveis encontrados nas células THP1 ou nos macrófagos CD14+ isolados primariamente de humanos (Fig. 2E).

Macrófagos THP1 foram silenciados com siRNA anti-TLR8 (e com siRNA “embaralhado” – siScr – usado como controle) e foi confirmado que siTLR8, mas não siScr reduziu a expressão de TLR8 (RT-qPCR). Além disso, siTLR8, mas não siScr reduziu a expressão gênica de genes relacionados a NF $\kappa$ B (IL1, IL6 e TNF) (RT-qPCR) (Fig 2F) e a produção de IL6 e TNF (mensurada por ELISA) (Fig 2G) em células tratadas com nLDL, corroborando que o efeito de nLDL em THP1 se dá por ativação de TLR8.

Finalmente, células THP1 foram pré-tratadas com CU-CPT9a, que é um inibidor de TLR 8 e foram expostas à ssRNA40 ou nLDL e, este tratamento com inibidor de TRL-8 afetou de forma similar a produção de citocinas em resposta ao tratamento tanto com ssRNA40 quanto com nLDL, mostrando que ambos participam da mesma via (Fig 2H – expressão gênica – RT-qPCR) (Fig. 2I – ELISA).

Complementarmente, eles mostraram que camundongos knockout para TLR7 também respondem à nLDL via NFkB, embora o uso de CU-CPT9 não tenha bloqueado o efeito do nLDL em camundongos.

Tópicos avaliados quanto à menção/discussão, durante a correção da questão:

- Menção ao TLR8
- Exclusão do efeito causado por LDL oxidado, via TLR2, por meio do uso do antagonista C29
- Exclusão do efeito causado por LDL oxidado pela ausência de indução da expressão de HMOX
- Demonstração da participação de algum TLR endossomal na resposta ao nLDL (experimentos com EGTA e Baf1)
- Experimento de co-expressão de cada um dos TLR com um gene repórter de luciferase controlado por um promotor de NF-kB em células HEK293T
- Menção ao blotting, demonstrando que TLR8 estava sendo produzido nas células HEK293T
- Menção aos experimentos com TLR7
- Experimentos de silenciamento com siRNA anti-TLR8, demonstrando o papel deste receptor no efeito produzido por nLDL
- Uso do antagonista de TLR8 (CU-CPT), reafirmando o papel deste receptor no efeito induzido por nLDL

**2 c)** No estudo de Allen e Colaboradores, dois modelos de animais transgênicos foram utilizados para o estudo da aterosclerose, o camundongo knockout para ApoE (Apoe -/-) e o camundongo knockout para ApoB100 (Abob100-/-). Tomando por base a função fisiológica destas proteínas, explique por que estes são bons modelos de aterosclerose? (10 pts)

A apolipoproteína E (ApoE) tem a função fisiológica de transporte reverso do colesterol, possibilitando à lipoproteína de densidade alta (HDL) recolher o excesso de colesterol dos tecidos e levá-lo ao fígado, onde poderá ser transformado em sais biliares e posteriormente eliminado do organismo. A ApoE também participa do transporte do colesterol e triglicerídeos de origem da dieta, através da associação com a lipoproteína Quilomicron, permitindo a entrada do quilomicrônio remanescente no fígado. Atua, portanto, na homeostase do colesterol no organismo.

A apolipoproteína B (ApoB) tem função essencial na estrutura de LDL. Atua também no transporte e metabolismo das lipoproteínas que carregam colesterol e triglicerídeos, especialmente as lipoproteínas de densidade baixa e de densidade muito baixa (LDL e VLDL, respectivamente). A ApoB é o ligante do receptor de LDL (Ldlr), permitindo a captação de LDL, e portanto colesterol, pelos tecidos.

Com base na função fisiológica dessas proteínas, os camundongos apoE ou Ldlr knockout não realizam o transporte de colesterol da corrente sanguínea para os tecidos, e esse se acumula na circulação na forma de LDL, possibilitando sua adesão nas paredes dos vasos sanguíneos durante a formação das placas ateroscleróticas. Dessa forma, esses animais permitem o estudo da interação entre lipídios, inflamação, e imunidade na aterosclerose.

Foram consideradas satisfatórias as respostas que citaram as funções da ApoE e/ou ApoB, e correlacionaram com a fisiopatologia da aterosclerose.

3) Na Figura 3, os autores demonstram que as LDL nativas transportam moléculas de RNA pequenas, de origem do próprio hospedeiro e/ou de microorganismos. No entanto, apenas mostrar que as LDL contém estas moléculas de RNA não é suficiente para determinar sua participação na ativação de macrófagos. Como os autores comprovaram que os sRNAs que estavam aumentando o perfil inflamatório dos macrófagos eram microbianos (10 pts)?

Primeiramente os autores caracterizam as moléculas de sRNAs dos LDL por RNAseq. Fizeram mapeamento contra o genoma humano (host) e contra bancos de dados de RNAs estruturais (ex. SILVA - banco de dados de rRNA). Perceberam que os sRNA microbianos eram 16X mais abundantes que do próprio host. Para comprovar se estes sRNA estavam aumentando o perfil inflamatório, os sRNAs de tamanhos similares foram isolados de células humanas e de *Escherichia coli* e foram transferidos para macrófagos THP-1. Os sRNAs de *E. coli* promoveram aumento da expressão de IL1B, IL6

e IL12B quando comparados ao controle positivo (ssRNA ORN06). Por fim, para determinar se o conteúdo de sRNAs confere à nLDL sua capacidade inflamatória em macrófagos, partículas de LDL reconstituída (rLDL) sem sRNAs foram geradas por meio da remoção seletiva do núcleo lipídico neutro da nLDL. Apenas a nLDL foi capaz de aumentar a expressão de genes inflamatórios e a secreção de citocinas nos macrófagos tratados.

Foram consideradas satisfatórias, de forma comparativa, as respostas que citaram os três experimentos acima.

4. Considere as afirmações abaixo sobre os diversos modelos e estratégias experimentais usados no artigo de Allen e Colaboradores *LDL delivery of microbial small RNAs drives atherosclerosis through macrophage TLR8*.

- (A) Análise global do sRNA do hospedeiro e microbiano em amostras de LDL nativa isoladas de voluntários saudáveis.
- (B) Análise em larga escala do transcriptoma de células únicas isoladas das placas de ateroma de camundongos com aterosclerose.
- (C) Estímulo de macrófagos com LDL nativas após a remoção de seu núcleo lipídico e reconstituição com colesterol-linoleato marcado.
- (D) Investigação do smRNA em LDL de camundongos de linhagem *germfree*.
- (E) Estabelecimento dos oligonucleotídeos nt-LNA como antagonistas seletivos de TLR8 humano e murino.

Responda:

a) Lipoproteínas tem diversas funções biológicas reconhecidas tanto no metabolismo lipídico quanto na resposta inflamatória. Qual dos modelos e abordagem experimental acima estabelece que a ativação de macrófagos pela nLDL se deve à presença de RNA microbiano? Justifique sua respostas e descreva quais experimentos controles foram necessários para atestar que as demais funções das LDLs não foram afetadas pelo procedimento realizado.

**Resposta:** Modelo C: Estímulo de macrófagos com LDL nativas após a remoção de seu núcleo lipídico e reconstituição com colesterol-linoleato marcado.

Ao remover o núcleo lipídico das LDL (que continha os sRNA microbianos) e reconstituí-las com colesterol-linoleato, as LDL perderam a função de ativação inflamatória dos macrófagos. As respostas que indicaram apenas o Modelo A não foram consideradas corretas, uma vez que demonstrar a presença de sRNA microbiano nas nLDL não necessariamente indica que estes sRNA são responsáveis pela ativação

dos macrófagos. Apenas ao remover os sRNA observar a perda de função, pode-se estabelecer relação de causa e consequência entre esses eventos (presença de sRNA microbiano e ativação inflamatória do macrófago).

Para controlar que o modelo funciona e as demais funções das LDL não haviam sido afetadas pela reconstituição os autores realizaram diversos experimentos à fim de demonstrar:

- 1) Ausência de sRNA nas LDLs reconstituídas;
- 2) Quantificação de proteínas, colesterol, triacilgliceróis, fosfolipídeos e apolipoproteínas nas LDL nativas e reconstituídas, demonstrando semelhança entre elas;
- 3) Avaliação da capacidade das LDLs reconstituídas de entregar lipídeos aos macrófagos, avaliada a partir da marcação de lipídeos neutros com *oil red O* em macrófagos incubados com as LDL reconstituídas em comparação à LDL nativa.

b) Qual dos modelos e abordagem experimental acima estabelece uma ferramenta biotecnológica com potencial terapêutico. Justifique sua resposta e explique por que os experimentos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, suportam uma sensibilidade conservada ao nLDL apesar das diferenças estruturais entre os TLR8 de humanos e camundongos.

**Resposta:** Modelo E: Estabelecimento dos oligonucleotídeos nt-LNA como antagonistas seletivos de TLR8 humano e murino.

O modelo acima estabeleceu uma ferramenta com potencial terapêutico, pois o tratamento com mt-LNA demonstrou efeito significativo na proteção contra o avanço, e até na regressão, da patologia em animais com aterosclerose. Em modelos *in vitro*, foi demonstrada ação seletiva do oligonucleotídeo como antagonista do receptor TLR-8 tanto em células primárias humanas, células primárias murinas e modelos de transfecção com o TLR8 humano e murino. A funcionalidade do TLR8 em camundongos é controversa, pois os ligantes até então conhecidos para o TLR8 humano (incluindo os ssRNA virais ou sintéticos) são reconhecidos pelo TLR7 em camundongos. Ou seja, O TLR7 murino reconhece os agonistas de TLR7 e 8 humanos, não sendo até então conhecido um ligante para o TLR8 murino. Além disso, o TLR8 murino falta uma sequência de 5 aminoácidos, em relação ao humano. Os autores identificaram a nLDL como um ligante não só para o TLR8 humano, mas também murino, levando a ativação de NF- $\kappa$ B apesar da falta de resposta aos agonistas sintéticos. Portanto, a nLDL é um agonista com sensibilidade conservada entre as duas espécies. Os autores também demonstraram que, diferente dos demais agonistas do TLR8 humano, a nLDL não é reconhecida pelo TLR7 em camundongos, uma vez que macrófagos derivados da medula de camundongos knockout para o TLR7 ainda eram responsivos à nLDL, demonstrando que este receptor não é necessário para o reconhecimento da nLDL por

macrófagos em camundongos. Tais resultados demonstram a sensibilidade conservada do TLR8 humano e murino à LDL nativa.

**4c)** Os autores demonstraram que as LDL transportam RNA majoritariamente de microorganismos.

**Qual(is) os modelos e abordagem experimental acima busca demonstrar que o sRNA microbiano carregado pelas LDL deriva da microbiota?**

Resposta: **(D)** Investigação do smRNA em LDL de camundongos de linhagem *germfree*.

**Os autores conseguiram validar completamente essa hipótese?**

Resposta: Não validaram completamente

**Justifique com base nos resultados observados**

Resposta: A presença de msRNA em LDL humanas e de camundongos foi demonstrada, e a hipótese inicial sugeria que esses msRNA seriam provenientes da microbiota. Contudo, o estudo com camundongos germfree mostrou que, mesmo na ausência da microbiota, ainda foram detectados níveis similares de msRNA nas lipoproteínas, incluindo LDL e HDL. Assim, os autores concluíram que a origem desses msRNAs pode ser mais complexa, envolvendo tanto fontes endógenas quanto ambientais (exposição ambiental, dieta, manipulação experimental), e não puderam afirmar de forma definitiva que esses RNAs derivam exclusivamente da microbiota residente.

5 - Qual o mecanismo/delineamento molecular proposto para a ativação da resposta inflamatória por msRNA transportado pelas LDL (10 pts)?

**Resposta FIGURA 7 E**

- (1) As nLDL com msRNA associado como carga são internalizadas e catabolizadas na rede endossomal;
- (2) o msRNA liberado durante o catabolismo é reconhecido pelo TLR8 endossomal, o que pode ser inibido por oligonucleotídeos quimicamente modificados (por exemplo, nt-LNA);
- (3) a ativação do TLR8 promove a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo e a indução da expressão de genes-alvo (por exemplo, TNF, IL6 e IL1B);
- (4) ocorre a liberação de citocinas que iniciam uma resposta imune inata;
- (5) a inflamação sustentada mediada por LDL-msRNA promove a progressão da placa aterosclerótica e dificulta sua resolução.