

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Renato Kanda Maalouf

Pesquisa de polimorfismos de genes da via de ativação do *AhR* em camundongos suscetíveis e resistentes à artrite experimental

São Paulo

2022

Renato Kanda Maalouf

Pesquisa de polimorfismos de genes da via de ativação do *AhR* em camundongos suscetíveis e resistentes à artrite experimental

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador: Dr. José Ricardo Jensen

São Paulo

2022

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Maalouf, Renato Kanda

Pesquisa de polimorfismos de genes da via de ativação do *AhR* em camundongos suscetíveis e resistentes à artrite experimental / Renato Kanda Maalouf ; orientador José Ricardo Jensen - São Paulo, 2022.

32 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. autoimunidade. 2. *Arnt*. 3. *Ahrr*. 4. camundongos selecionados geneticamente. 5. sequenciamento de cDNA. I. Jensen, José Ricardo. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

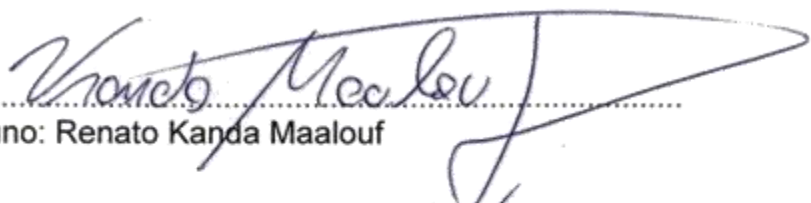
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

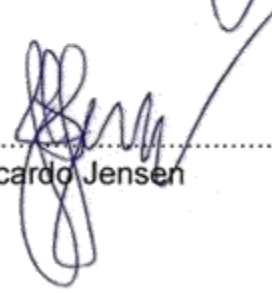
Eu, Renato Kanda Maalouf, aluno do curso Especialista em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 28 de Janeiro de 2022


.....
Aluno: Renato Kanda Maalouf

De acordo:.....
Orientador: José Ricardo Jensen


RESUMO

MAALOUF, Renato Kanda. **Pesquisa de polimorfismos de genes da via de ativação do *AhR* em camundongos suscetíveis e resistentes à artrite experimental.** 2022. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

INTRODUÇÃO: A Artrite Reumatoide (RA), doença inflamatória crônica autoimune cujos eventos autoimunes primordiais não são totalmente conhecidos, envolve em sua suscetibilidade tanto um elemento genético quanto fatores ambientais. Um deles, a microbiota intestinal, pode modular significativamente o sistema imunológico através de produtos do metabolismo microbiano, muitos dos quais são ligantes do receptor de aril-hidrocarbonetos (*AhR*). O *AhR* é ativado por diversos ligantes, exógenos ou endógenos, os quais ativam programas transcricionais específicos, sendo uma ponte entre estímulos ambientais e fisiologia, e situando-se na multifatoriedade da Artrite Reumatoide. A ativação do *AhR* ocorre mediante interação com o translocador nuclear do *AhR* (ARNT), e pode ser reprimida através da competição com seu repressor (AhRR). Os genes *Arnt* e *Ahrr* estão contidos no intervalo de confiança de dois *loci* de suscetibilidade à artrite mapeados em camundongos selecionados fenotipicamente para alta (HIII) ou baixa (LIII) produção de anticorpos. Estas linhagens, quando submetidas ao modelo de artrite induzida por pristane (PIA), demonstram suscetibilidade extremamente divergente, possivelmente decorrente de suas genéticas distintas: completamente resistentes e suscetíveis, respectivamente. Elas também albergam microbiotas intestinais distintas, que podem ser parcialmente transferidas entre as linhagens, modulando os fenótipos de suscetibilidade à artrite. O envolvimento dos genes da via do *AhR* na progressão da artrite reumatoide ainda é pouco explorado, porém é pertinente investigar se os animais HIII e LIII apresentam alelos distintos destes genes, o que poderia sugerir um papel no desenvolvimento da doença, a ser avaliado em estudos posteriores. **OBJETIVO:** Investigar presença e distribuição de possíveis polimorfismos dos genes *Arnt* e *Ahrr* em camundongos HIII e LIII, e suas eventuais relevâncias na suscetibilidade à PIA. **METODOLOGIA:** RNA de camundongos das linhagens HIII e LIII foi convertido para cDNA por transcrição reversa. O material obtido foi amplificado por PCR com primers específicos para fragmentos dos genes alvo, e então submetido a eletroforese, com posterior purificação do DNA do gel ou do produto de PCR. Os produtos purificados foram então sequenciados. **RESULTADOS:** Para o *Arnt*, três de cinco fragmentos foram amplificados. Já para o *Ahrr*, apenas um de três fragmentos foi amplificado. As reações de sequenciamento realizadas indicaram uma divergência de uma base entre os animais HIII e LIII em um fragmento do *Arnt*, no entanto em uma sequência de baixa qualidade. **DISCUSSÃO:** Limitações intrínsecas aos genes, como baixa taxa de expressão e extensas UTRs 3' de seus mRNAs, além de problemas técnicos que comprometeram o sequenciamento das extremidades dos fragmentos sequenciados, não permitiram concluir que a divergência encontrada seja um polimorfismo, e não um artefato de sequenciamento. **CONCLUSÃO:** A maior fragmentação da sequência a ser amplificada, ou ainda a clonagem de fragmentos

do gene em plasmídeos para posterior sequenciamento poderiam superar os obstáculos encontrados no decorrer deste estudo, e indicam os próximos passos a serem seguidos na investigação do papel que a via do AhR exerce na suscetibilidade à PIA.

Palavras-chave: autoimunidade. *Arnt*. *Ahrr*. camundongos selecionados geneticamente. sequenciamento de cDNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão esquemática das posições dos primers para o sequenciamento da região codificante do gene Arnt	16
Figura 2 - Visão esquemática das posições dos primers para o sequenciamento da região codificante do gene Ahrr	16
Figura 3 - Gel de agarose com produtos de PCR para os primers ARNT-F1/R1, ARNT-F2/R2, e ARNT-F3/R3	18
Figura 4 - Gel de agarose com produtos de PCR de amostras HIII para os primers ARNT-F1B/R1B, ARNT-F23B/R23B	19
Figura 5 - Sequenciamento do fragmento Arnt2 para amostras HIII e LIII	20
Figura 6 - Sequenciamento do fragmento Arnt3 para amostras HIII e LIII	21
Figura 7 - Gel de agarose com produtos de PCR em gradiente de temperatura (59°C; 60°C) das amostras de animais HIII e LIII para o primer AHRR-F5/R5	22
Figura 8 - Gel de agarose com produtos de PCR das amostras HIII e LIII para o primer AHRR-F5/R5	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Artrite Reumatoide	8
1.2 <i>AhR</i>	9
1.3 Artrite induzida por pristane em camundongos HIII e LIII	11
2 OBJETIVOS	13
3 METODOLOGIA	13
3.1 Materiais biológicos	13
3.2 Transcrição Reversa	14
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
3.4 Eletroforese e purificação de DNA	16
3.5 Sequenciamento	17
4 RESULTADOS	17
4.1 Sequenciamento do gene <i>Arnt</i> nas linhagens HIII e LIII	17
4.1.1 Amplificação de fragmentos do <i>Arnt</i> nas linhagens HIII e LIII	17
4.1.2 Análise das sequências dos fragmentos do <i>Arnt</i>	19
4.2 Sequenciamento do gene <i>Ahrr</i> nas linhagens HIII e LIII	21
4.2.1 Amplificação de fragmentos de <i>Ahrr</i> nas linhagens HIII e LIII	21
4.2.2 <i>Ahrr5</i>	22
4.2.3 Sequenciamento do fragmento <i>Ahrr5</i>	23
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	27
APÊNDICE	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite Reumatoide

A Artrite Reumatoide (RA) é uma doença inflamatória crônica autoimune de prevalência global estimada em 0,46% (ALMUTAIRI et al., 2020), que acomete principalmente mulheres de meia-idade. Suas manifestações clínicas costumam incluir poliartrite, primeiramente de pequenas articulações e, posteriormente, irradiando para as maiores. Histologicamente, é observada inflamação e proliferação da sinóvia, com subsequente erosão de cartilagens e ossos articulares, resultando em deformação e comprometimento das articulações (SYMMONS et al., 2003). Apesar de ser caracterizada por manifestações clínicas bem definidas, estudar a artrite reumatoide com base somente em casos clínicos não permite aprofundar o entendimento dos eventos primordiais que desencadeiam o processo autoimune da doença, nem de todas as suas modulações, uma vez que na época do diagnóstico os principais eventos desencadeadores da doença já ocorreram.

A suscetibilidade à artrite reumatoide envolve elemento genético importante. Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade, especialmente o gene *HLA-DRB1*, desempenham um significativo papel na modulação da suscetibilidade (MCINNES et al., 2011). Ainda assim, estes genes não são em si determinantes, de modo que outros fora do MHC também estão envolvidos. Além disso, a artrite reumatoide também envolve fatores ambientais que interagem com a genética dos pacientes. Um destes fatores, o tabagismo, tem sido apontado como atuante na predisposição à RA (MCINNES et al., 2011). Outro destes fatores, a microbiota intestinal, tem sido objeto de muitos estudos recentemente.

O microbioma intestinal é capaz de exercer uma significativa modulação sobre o sistema imunológico, ao ponto de diversas patologias de componente imune serem acompanhadas de disbiose da microbiota intestinal, caracterizada por redução da diversidade bacteriana e por desbalanço em determinados grupos ou espécies de bactérias. Em pacientes portadores de artrite reumatoide, já foi observada disbiose nos microbiomas oral e fecal, concomitante ao curso da doença, e sua parcial reversão com o tratamento da artrite (ZHANG et al., 2015). Os autores constataram a depleção de *Haemophilus spp.* e o aumento de *Lactobacillus salivarius* nos microbiomas salivar, dentário e intestinal de pacientes acometidos pela artrite

reumatoide. Scher et al. (2013) também correlacionaram a abundância de *Prevotella copri* à doença. O balanço existente entre sistema imune e microbiota pode ser interessante para proporcionar um melhor entendimento dos estágios pré-clínicos da doença.

A compreensão de aspectos precoces da etiologia da artrite reumatoide permitiria abordagens clínicas em estágios iniciais da progressão da doença, otimizando e racionalizando seu tratamento, e conferindo melhor prognóstico aos pacientes acometidos.

A interação entre a microbiota e o sistema imune pode ser mediada por produtos do metabolismo microbiano que atuam como ligantes de receptores celulares importantes para a regulação das atividades de linfócitos T e B, por exemplo. Um destes grupos de metabólitos é o dos ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato (CORRÊA et al., 2016), que se ligam a receptores associados a proteínas G.

Um outro grupo muito importante de metabólitos bacterianos são os derivados do aminoácido triptofano. Diversos destes metabólitos são ligantes do receptor de aril-hidrocarbonetos (*AhR*).

1.2 *AhR*

O fator de transcrição *AhR* (receptor de aril-hidrocarbonetos) foi primeiramente descrito como receptor da 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD, ou dioxina), xenobiótico tóxico proveniente da queima de tabaco e da combustão de derivados de petróleo (HUBBARD et al., 2015). Inicialmente, sua atividade era aceita como sendo específica à promoção de genes das vias das enzimas metabolizadoras de xenobióticos. No entanto, estudos recentes destacaram também os papéis fisiológicos do *AhR* e a sua inserção em vias ativadas também por ligantes endógenos (GUYOT et al., 2013).

A ativação do *AhR*, situado em forma inativa no citosol das células pela complexação a chaperonas, ocorre mediante interação com ligantes específicos, seguida pela translocação do complexo formado ao interior do núcleo celular. Neste compartimento, o complexo previamente formado se dissocia, permitindo a formação

de nova associação, desta vez entre o fator de transcrição e o ARNT (translocador nuclear do *AhR*), proteína já presente no espaço nuclear da célula. Este heterodímero liga-se a elementos responsivos das regiões promotoras de genes-alvo, recruta outras moléculas e o complexo resultante modula a transcrição destes genes (GUYOT et al., 2013). Outra molécula de interesse envolvida nas vias de ativação do *AhR* é o seu repressor AhRR. Proteína nuclear capaz de se complexar ao ARNT, o repressor do *AhR* compete com o fator de transcrição pela formação de heterodímero com a molécula translocadora. Análises recentes de cristalografia de raios-X do complexo translocador-repressor também indicam que pode haver competição entre AhR/ARNT e AhRR/ARNT pela ligação a sítios do DNA, num mecanismo específico de repressão (SAKURAI, 2017).

O *AhR* pode ser ativado por uma ampla gama de ligantes, tanto exógenos quanto endógenos, podendo resultar no reconhecimento de elementos responsivos distintos, com conseqüente ativação de programas transcricionais específicos. Isto faz do receptor de aril-hidrocarbonetos um fator de transcrição de evidente plasticidade, formando uma ponte entre estímulos ambientais e dinâmicas fisiológicas e, portanto, promissora aplicação em eventuais abordagens clínicas (GUYOT et al., 2013).

Na artrite reumatoide já foi verificado, tanto em modelos animais, quanto em pacientes humanos, que o *AhR* é ativado por substâncias provenientes da fumaça de tabaco, e modula o agravamento de casos de RA. Em tal mecanismo, após a ativação do *AhR*, microRNAs como o miR-132 são expressos e exercem atividade repressora do gene *Ptgs2*, codificador da enzima COX-2, intensificando a osteoclastogênese (DONATE et al., 2021). Também já foi demonstrado o papel que o *AhR* exerce, de maneira ligante-específica, na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para células Treg ou Th17 (QUINTANA et al., 2008), ambos de importância na artrite reumatoide e em modelos de artrite experimental. Já em modelos de artrite induzida por colágeno, constatou-se a ativação do *AhR* por metabólitos de triptofano secretados por bactérias intestinais e a subsequente modulação das células Breg e redução da artrite. Evidenciou-se também que a suplementação de ácidos graxos de cadeia curta é capaz de estimular a produção de tais metabólitos por bactérias intestinais (ROSSER et al., 2020). A regulação das relações entre microbioma e

hospedeiro situa o *AhR* na multifatorialidade intrínseca à artrite reumatoide. Associa-se, atualmente, a ativação deste fator de transcrição não só à regulação e homeostase das células imunológicas adjacentes ao sistema digestório, mas também à modulação da composição de sua microbiota. E considerando-se que a RA apresenta um componente microbiano, principalmente intestinal, influente na suscetibilidade, é pertinente investigar aspectos da via do *AhR* sob o prisma da artrite reumatoide.

1.3 Artrite induzida por pristane em camundongos HIII e LIII

Um dos modelos atualmente aplicados ao estudo da artrite reumatoide é a artrite induzida por pristane (PIA), modelo baseado na injeção intraperitoneal do pristane (2,6,10,14 tetrametilpentadecano), óleo mineral não-imunogênico, em camundongos (POTTER et al., 1981; JENSEN et al., 2006). À injeção do óleo se segue o desenvolvimento de uma artrite autoimune crônica bilateral, que reproduz diversos atributos e especificidades da artrite reumatoide humana, como a dependência de células T CD4+, produção de autoanticorpos – tais como anti-colágeno, anti-hsp e fator reumatóide – e subsequente hipergamaglobulinemia, além de semelhança histopatológica com a doença humana (WOOLEY et al., 1989). Este modelo, ao mesmo tempo em que reproduz o desenvolvimento crônico da inflamação nas articulações, permite a investigação da sua regulação genética e dos seus mecanismos imunológicos precoces, os quais ocorrem durante a fase pré-clínica do desenvolvimento da doença.

Linhagens de camundongos selecionadas fenotipicamente para alta (HIII) ou baixa (LIII) produção de anticorpos contra antígenos de *Salmonella* (SIQUEIRA et al., 1976), quando injetadas com pristane, demonstram suscetibilidades divergentes. Enquanto os animais HIII se mostram completamente resistentes, a totalidade dos animais LIII desenvolve quadros extremamente graves e precoces de artrite (JENSEN et al., 2006). Possivelmente, a genética distinta entre HIII e LIII exerce uma influência neste fenótipo desde o estágio pré-clínico da PIA. No quarto dia pós-pristane já se observa um maior número de esplenócitos produtores de IL-1 β , IL-12 e TNF- α nos animais LIII do que nos HIII (JENSEN et al., 2006). Ao sétimo dia, a linhagem LIII apresenta uma inflamação peritoneal mais intensa e avançada do que os animais HIII, consequência de níveis elevados de IL12p40, IL-18, IL-23 e de

quimiocinas do tipo CC (ROSSATO et al., 2019). Por outro lado, a análise de polimorfismos de base única (SNPs), microssatélites e da região variável do gene *H2-eb1* indicam que tanto os camundongos HIII quanto os LIII apresentam o mesmo haplótipo *H-2* (*H-2p*, dados não publicados) e evidencia, portanto, que outros genes devam desempenhar papel na suscetibilidade à artrite induzida por pristane.

Os animais LIII carregam o alelo *Ahr^{b1}* de alta afinidade, enquanto os animais HIII têm o alelo *Ahr^d* de baixa afinidade (observações pessoais). Nestas linhagens também foram mapeados dois *loci* reguladores de fenótipos quantitativos da artrite, o *Prta1* no cromossomo 3 (JENSEN et al., 2006) e outro no cromossomo 13 (dados não publicados), ambos contendo em seu intervalo de confiança genes envolvidos na ativação e regulação do *AhR*. São eles o *Arnt* e o *Ahrr*, genes codificadores das proteínas homônimas localizados no QTL *Prta1* do cromossomo 3 e no cromossomo 13, respectivamente. No entanto, ainda não se sabe se estes genes apresentam polimorfismo genético com potencial de influenciar o desenvolvimento da artrite humana e em modelos animais.

Um outro aspecto divergente entre as linhagens HIII e LIII é a microbiota intestinal. Ainda que sejam criados em um mesmo ambiente, sujeitos às mesmas exposições, constatou-se que os animais HIII e LIII albergam microbiotas intestinais distintas (DA SILVA SANTOS et al., 2017), possivelmente estabelecidas ao longo da seleção genética bidirecional, vinculada à modulação geral dos ambientes imunes intestinais das duas linhagens. Já foi observado que é possível transferir parcialmente a microbiota entre os animais HIII e LIII por meio de amamentação cruzada pelas mães da linhagem oposta, e que esta transferência provoca modulação parcial dos fenótipos de suscetibilidade à artrite. Nestes experimentos foi possível induzir artrite moderada em um camundongo HIII amamentado por uma mãe LIII, algo não observado ao longo dos 20 anos de emprego desta linhagem no modelo de PIA. Os animais LIII, amamentados por mães HIII, por sua vez, apresentaram menor gravidade da doença (JENSEN et al., manuscrito em elaboração). Este não foi, no entanto, o primeiro indício da influência de microbiomas sobre a indução de artrite por pristane. Já havia sido constatado que, em animais livres de patógenos específicos (SPF), a PIA não progride (THOMPSON et al., 1993). Estes mesmos

animais, no entanto, tornavam-se suscetíveis assim que transferidos para ambientes convencionais.

O envolvimento dos alelos do gene *AhR* e dos genes *Arnt* e *Ahrr*, da via de ativação do *AhR*, na progressão de quadros de artrite reumatoide ainda é um campo pouco compreendido e explorado. No entanto, considerando-se a multifatorialidade da doença, as atribuições da via do *AhR* enquanto interface entre microbiota e sistema imunológico, e a aplicabilidade do modelo de artrite induzida por pristane, especialmente em camundongos HIII e LIII - os quais demonstram não somente uma extrema divergência de suscetibilidade à PIA, mas também microbiotas distintas - se faz pertinente investigar a presença de polimorfismos em genes da via de ativação do *AhR* nos animais HIII e LIII, indicando possível relevância desta via nos mecanismos patológicos de desenvolvimento da artrite.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença e distribuição de possíveis polimorfismos dos genes *Arnt* e *Ahrr* em camundongos HIII e LIII, para que se possa estudar a relevância destes polimorfismos na resistência e suscetibilidade à artrite reumatoide.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais biológicos

Os materiais biológicos deste estudo provêm de experimentos conduzidos por Rossato et al. (2019) para determinar a produção peritoneal de quimiocinas e citocinas em animais das linhagens HIII e LIII, e sua correlação com a suscetibilidade à PIA em camundongos, os quais foram realizados após autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAIB – sob os protocolos Nº 655/09 e 1110/13 (cDNA). Também utilizamos material biológico (órgãos - baço e células peritoneais) do estudo relacionado ao protocolo CEUAIB Nº 5563101019.

Resumidamente, o estudo envolveu a injeção intraperitoneal de 0,5 mL do óleo mineral pristane (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO) em camundongos machos e fêmeas das linhagens HIII e LIII com 2 a 4 meses de idade, mantidos sob condições convencionais no biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Foram aplicadas duas doses de pristane nos animais, separadas por intervalo de 60 dias (protocolo Nº 5563101019) ou apenas uma dose (protocolos Nº 655/09 e 1110/13). Os camundongos foram observados por diversos períodos (até 200 dias) após a primeira injeção. Após eutanásia em câmara de CO₂, o peritônio de cada animal foi lavado com 3 mL de meio de cultura RPMI 1640, volume que foi coletado, centrifugado por 5min/4°C e separado do pristane, antes de ser armazenado a -80°C. O RNA total das células peritoneais coletadas foi extraído com o emprego do Illustra™ RNASpin Mini Kit (GE Healthcare Lifesciences, Buckinghamshire, UK). Sua pureza e concentração foram determinadas em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare Lifesciences), e a sua integridade em BioAnalyzer® 2100 (Agilent, EUA) com o kit RNA Nano 6000® (Agilent, Alemanha). O baço removido destes animais foi processado de maneira semelhante às células peritoneais, com exceção de uma fase de ruptura mecânica por agitação com esferas de aço inox em um aparelho Tissue Lyser LT (Qiagen, Alemanha).

3.2 Transcrição Reversa

O RNA extraído foi diluído em água destilada, de modo a se atingir uma concentração padronizada entre todas as amostras (100ng/uL). Em seguida, foi convertido a cDNA com o emprego de oligo dT₁₂₋₁₈ ou dos primers específicos (ARNT-R4 ou AHRR-R3, destacados na Tabela 1 e esquematizados nas Figuras 1 e 2), usando a GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, EUA), num volume total de 20µL, de acordo com as instruções do fabricante. Utilizamos inputs de RNA total entre 1 e 5 ug.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O cDNA obtido foi amplificado por PCR, usando Taq Polimerase (Sinapse, Inc., Brasil) e os primers relacionados na Tabela 1 e esquematizados nas Figuras 1 e 2. A reação foi realizada em um termociclador PTC-200 (MJ Research, EUA), em ciclos

de temperaturas determinados pelas indicações da enzima comercial utilizada, com ajustes empíricos direcionados à especificidade da reação.

As condições da PCR foram as seguintes: Desnaturação inicial: 3 minutos/94°C; 30 a 40 ciclos de desnaturação (94°C/40 segundos; anelamento (entre 52°C e 61°C/35 segundos) e extensão (72°C/entre 60 e 120 segundos), em um volume total de 30µL.

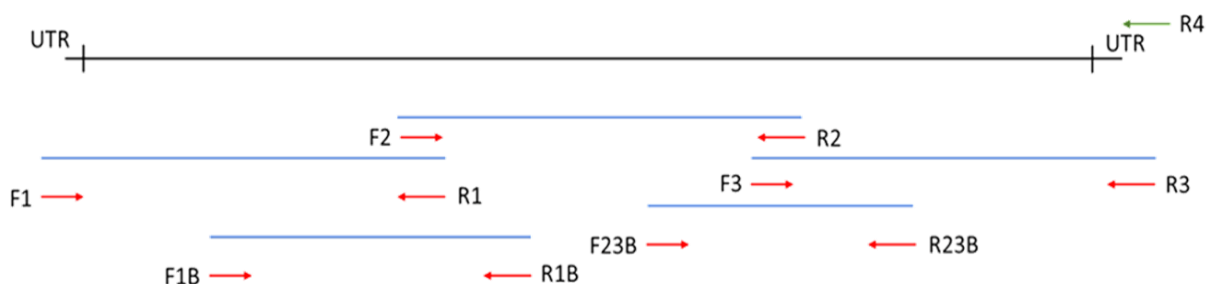
Os genes-alvo do experimento foram o *Arnt* e o *Ahrr*.

Tabela 1 - Sequência dos primers para determinação da expressão gênica relativa no estudo

Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon	Posição no mRNA	RefSeq		
<i>Arnt</i>	Arnt-F1	AATCTGCGGAGTGGCTCTTC	847	56-75	NM_001037737.2		
	Arnt-R1	GAAGACTGCTGGCCTTCCTT		902-883			
	Arnt-F2	GGTTCGGGAGCACACTGTAT	989	758-777			
	Arnt-F1B	GACAAAGAGCGGTTTGCCAG	729	355-374			
	Arnt-R1B	GATGTAGCCTGTGCAGTGGA		1083-1064			
	Arnt-R2	CACAGGCTGGACAGAAACCT		1746-1727			
	Arnt-F23B	CCACAGGAGCTCTTAGGGAAG	739	1264-1284			
	Arnt-R23B	CAGGGTTGGAGTGACGTGAA		2002-1983			
	Arnt-F3	GTCACAGCTAGGTCCGACAG	1036	1590-1609			
	Arnt-R3	TGAGGGAAGGGAAGGGAGAG		2625-2606			
	Arnt-R4	AGGGCATTCTCCTTTCTC	---	2897-2878			
	<i>Ahrr</i>	Ahrr-F1	TCCCAGAGATGAGAGAGCTGA	1200		16-36	NM_009644.3
		Ahrr-R1	TCTCTGTCCCCTGAAGTCCC			1215-1196	
Ahrr-F2		ACAGATAGGAGCCACTGGGC	1198	1112-1131			
Ahrr-R2		GCCTCACCCACTGAGTTCTG		2309-2290			
Ahrr-R3		AGCCTCTGAATTCCTGCTAC	---				
Ahrr-F5		ACCATAGGCACTCCATGCAAC	652	1503-1523			
Ahrr-R5		CTGCTAGGCTACACACAGGG		2154-2135			

Fonte: próprio autor, 2021.

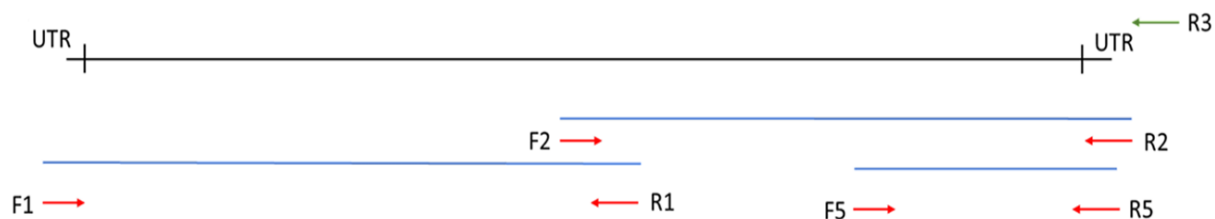
Figura 1 - Visão esquemática das posições dos primers para o sequenciamento da região codificante do gene *Arnt*



Fonte: próprio autor, 2021.

Inicialmente, o gene foi dividido em três fragmentos - *Arnt1*, *Arnt2* e *Arnt3* -, os quais se sobrepõem em suas extremidades. Com o comprometimento de trechos na reação de sequenciamento, foi necessário desenhar primers referentes a duas novas posições - *Arnt1B* e *Arnt23B* - para completar a sequência. O primer R4 foi utilizado para a síntese de cDNA sem a região UTR 3'. O esquema não está em escala.

Figura 2 - Visão esquemática das posições dos primers para o sequenciamento da região codificante do gene *Ahrr*



Fonte: próprio autor, 2021.

Inicialmente o gene foi dividido em dois fragmentos - *Ahrr1* e *Ahrr2*. Com o insucesso na amplificação de ambos, um novo primer foi desenhado, referente à nova posição *Ahrr5*. O primer R3 foi utilizado para a síntese de cDNA sem a região UTR 3'. O esquema não está em escala.

3.4 Eletroforese e purificação de DNA

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em géis de agarose entre 1,5 e 2% (m/v) para a separação dos produtos amplificados e permitir a extração seletiva da banda de interesse. A eletroforese transcorreu por cerca de 2 horas a 120 V, monitorada através de visualização do gel em fotodocumentador ImageMaster VDS (Pharmacia LKB, Suécia). Assim que se obteve uma resolução entre bandas que permitisse a secção específica do fragmento desejado, o gel foi cortado sobre transiluminador e o fragmento purificado com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha) e eluição final em 30µL de água destilada RNase

free. Nas reações de PCR que apresentaram bandas únicas e bem definidas, os amplicons foram purificados com o sistema ExoProStar[®] (Cytiva Biosciences, EUA).

3.5 Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento, adicionamos 200 ng dos amplicons purificados e 1,6 pmol de primer em um volume de 10 uL. O sequenciamento foi realizado num sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) do laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, usando o BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Sequenciamento do gene *Arnt* nas linhagens HIII e LIII

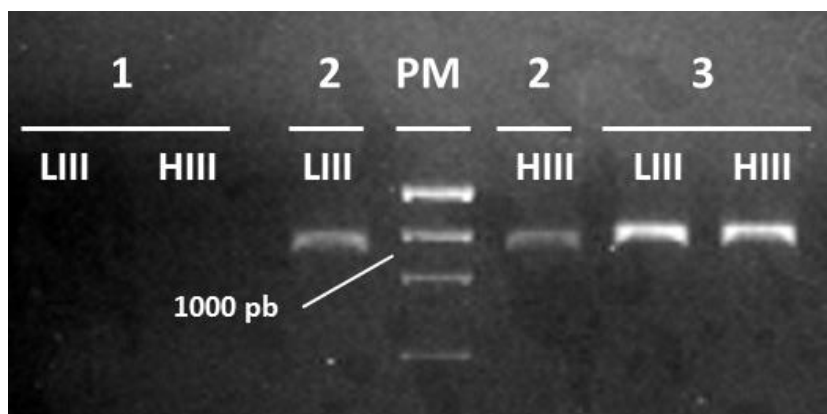
Considerando o tamanho do mRNA do *Arnt*, de mais de 4 mil pares de bases, e a sua composição de éxons, íntrons e regiões não codificantes (UTR - untranslated regions), optou-se pela tentativa de amplificar o gene por fragmentos, com o desenho de uma série de primers específicos a sequências menores do *Arnt*, com sobreposição entre si e que quando combinadas reconstituíssem a sequência codificante completa do gene.

4.1.1 Amplificação de fragmentos do *Arnt* nas linhagens HIII e LIII

A sequência da região codificante do *Arnt* (excluindo as UTRs 5' e 3') foi dividida em três fragmentos, para os quais foram desenhados os pares de primers específicos ARNT-F1/R1, ARNT-F2/R2, e ARNT-F3/R3, empregados na PCR das amostras das linhagens HIII e LIII. Conseguimos amplificar os fragmentos *Arnt2* e *Arnt3* (Figura 3), os quais foram posteriormente purificados com o sistema ExoProStar[®] (Cytiva Biosciences, EUA), e sequenciados.

O fragmento *Arnt1* não foi amplificado com sucesso. Uma das possibilidades é que a síntese do cDNA não atingiu a extremidade 5' do mRNA, devido ao tamanho do transcrito.

Figura 3 - Gel de agarose com produtos de PCR para os primers ARNT-F1/R1, ARNT-F2/R2, e ARNT-F3/R3



Fonte: próprio autor, 2021.

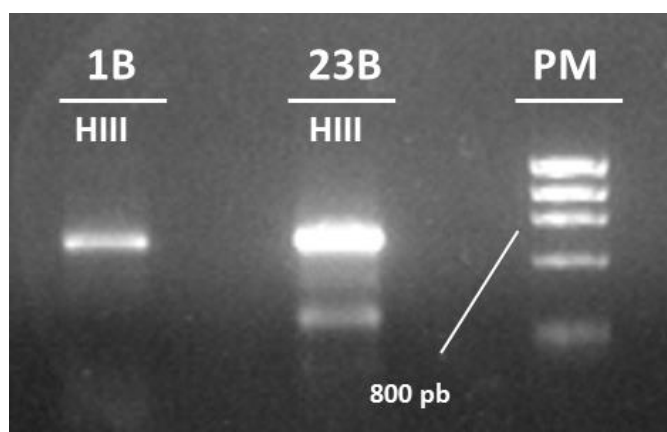
Não houve amplificação do fragmento *Amt1* (1). Os fragmentos *Amt2* (2) e *Amt3* (3) foram amplificados com sucesso tanto nos animais LIII, quanto nos HIII. Marcador de peso molecular empregado: $\Phi X174$ *HaeIII* fragments (Invitrogen, EUA).

Após o sequenciamento gênico, foi feita a avaliação da qualidade das sequências. Usualmente, as extremidades das sequências apresentam menor qualidade e confiabilidade, algo que foi levado em conta no desenho dos primers utilizados, os quais incluíram sobreposição entre os fragmentos. O sequenciamento, no entanto, comprometeu trechos maiores do que o esperado das extremidades dos fragmentos, impedindo a sobreposição confiável dos mesmos e, portanto, a geração de uma sequência contínua do gene *Arnt*. Tendo em vista estas lacunas na sequência, foi necessário desenhar primers intermediários aos fragmentos originais, os quais foram nomeados à seguinte maneira: ARNT-F1B e ARNT-R1B (fragmento parcial na região do fragmento *Arnt1*); ARNT-F23B e ARNT-R23B (fragmento sobreposto aos fragmentos *Arnt2* e *Arnt3*) (Figura 1).

O processamento das amostras e a visualização em gel de agarose mostraram a amplificação dos fragmentos denominados como *Arnt1B* e *Arnt23B* (Figura 4). Ainda assim, a amplificação não se mostrou totalmente específica, visto que seu perfil eletroforético era marcado por arrastes e bandas extras. Ajustamos alguns parâmetros da PCR para aumentar a especificidade da reação. Foram diminuídas as quantidades de cDNA, da polimerase e do cloreto de magnésio adicionados ao mix

para a reação. Além disso, a temperatura de anelamento dos primers também foi aumentada (52 para 56°C). O número de ciclos, por sua vez, foi reduzido de 40 para 30. Com todos os ajustes, foi obtido um produto relativamente mais específico, no entanto ainda de constituição heterogênea, sendo visível mais de uma banda por amostra, quando da visualização de seus respectivos perfis eletroforéticos. Assim, optou-se pela purificação da amostra com a secção da banda de interesse sobre transiluminador, e posterior extração do material genético com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha). O DNA purificado foi preparado e encaminhado para reação de sequenciamento.

Figura 4 - Gel de agarose com produtos de PCR de amostras HIII para os primers ARNT-F1B/R1B, ARNT-F23B/R23B



Fonte: próprio autor, 2021.

Os fragmentos *Amt1B* (1B), *Amt23B* (23B) foram amplificados com sucesso, no entanto as bandas visíveis no gel eram múltiplas ou apresentavam marcas de arraste. Marcador de peso molecular empregado: *ΦX174 HaeIII fragments* (Invitrogen, EUA).

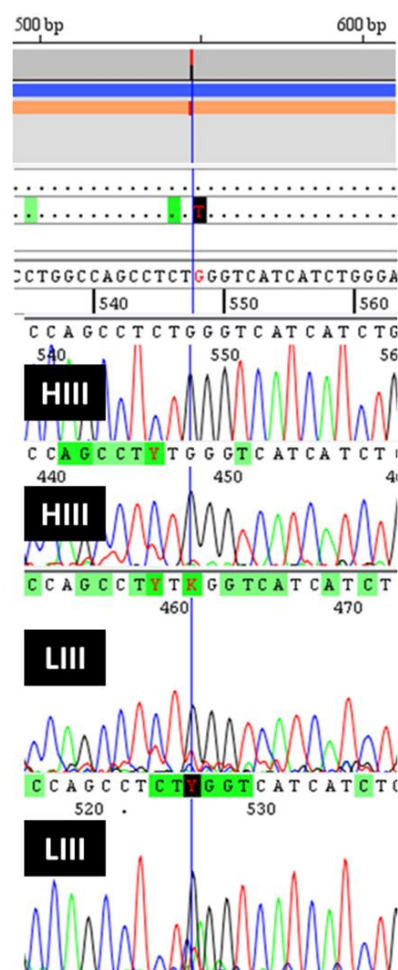
4.1.2 Análise das sequências dos fragmentos do *Amt*

Sequenciados os fragmentos *Amt2* das amostras (Figura 5), foram observadas duas posições, entre os amplicons obtidos para animais HIII e LIII, com bases possivelmente divergentes. No entanto, uma análise mais cuidadosa indicou a provável ausência de polimorfismos na comparação. A primeira base discordante, observada como inconclusiva entre citosina e timina em uma das corridas, era de baixa qualidade. Além disso, a divergência em questão foi dirimida pelo consenso

entre as sequências antiparalelas obtidas para o fragmento. Já a segunda base foi identificada como inconclusiva entre timina e guanina, mesmo após o alinhamento das sequências complementares. No entanto, a análise do cromatograma indica se tratar de uma base de baixa qualidade, sendo possivelmente um artefato do sequenciamento. Além desta porção, as sequências não apresentaram outras divergências.

Para se constatar algum possível polimorfismo, um re-sequenciamento seria necessário.

Figura 5 - Sequenciamento do fragmento *Arnt2* para amostras HIII e LIII

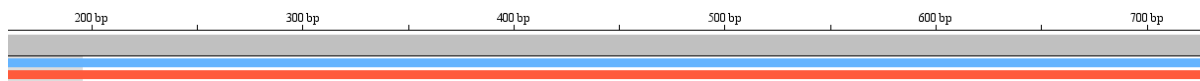


Fonte: próprio autor, 2021.

Duas bases divergem entre as linhagens: A primeira, inconclusiva entre citosina e timina (Y, sequências HIII, posição 546 do consenso), foi identificada como citosina pelo consenso entre sequências antiparalelas; A segunda, indeterminada entre timina e guanina (K, sequências LIII, posição 548 do consenso), foi marcada como sendo de baixa qualidade e, provavelmente, um artefato do sequenciamento.

Já para os fragmentos *Arnt3* das amostras, o sequenciamento não indicou nenhuma divergência entre as linhagens HIII e LIII (Figura 6).

Figura 6 - Sequenciamento do fragmento *Arnt3* para amostras HIII e LIII



Fonte: próprio autor, 2021.

Nenhuma divergência foi encontrada entre as amostras HIII (azul) e LIII (laranja).

Para os fragmentos *Arnt1B* e *Arnt23B*, as reações de sequenciamento somente foram realizadas em amostras de camundongos HIII, de modo que não se pretendeu fazer uma comparação direta de genótipos com animais LIII, mas sim uma confirmação do funcionamento da reação de PCR. O fragmento *Arnt23B* foi sequenciado com sucesso, completando a lacuna previamente existente entre as sequências amplificadas com os primers ARNT F2/R2 e F3/R3. Já a sequência obtida com os primers ARNT F1B/R1B não pôde ser aproveitada por ser de baixa qualidade.

4.2 Sequenciamento do gene *Ahrr* nas linhagens HIII e LIII

Considerando o tamanho do mRNA do *Ahrr*, de mais de 4 mil pares de bases, e a sua composição de éxons e íntrons, e regiões não codificantes, implementou-se a mesma estratégia de análise aplicada ao *Arnt*. Optou-se pela tentativa de amplificação por fragmentos, com o desenho de uma série de primers específicos para sequências menores do gene, sobrepostas entre si e que, quando combinadas, resultassem na sequência completa da região codificante do seu mRNA.

4.2.1 Amplificação de fragmentos de *Ahrr* nas linhagens HIII e LIII

A região codificante do gene *Ahrr* foi dividida em dois fragmentos, cujos primers específicos, AHRR-F1/R1 e AHRR-F2/R2, foram empregados para a PCR das amostras das linhagens HIII e LIII. Nenhum dos fragmentos foi amplificado com sucesso.

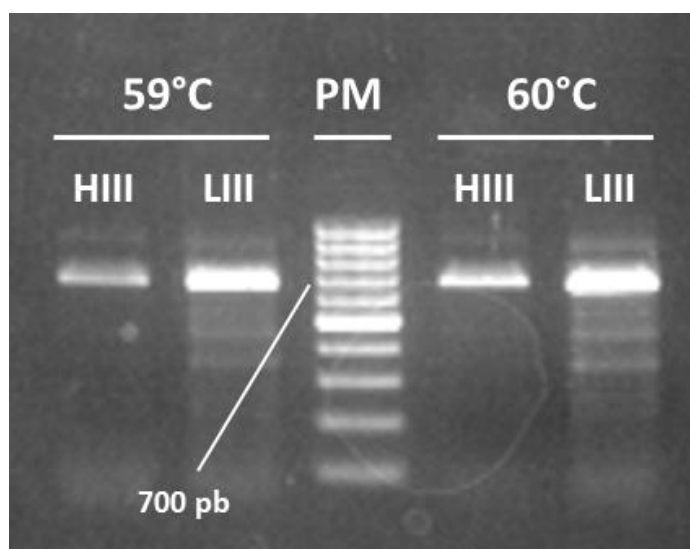
Optou-se então pelo desenho de um novo primer, desta vez específico a um fragmento menor da sequência do *Ahrr*, o qual foi denominado de AHRR5 (Figura 2).

4.2.2 *Ahrr5*

Após discussão com membros do Laboratório de Expressão Gênica de Eucariotos (Daisy Woellner Santos e David Abraham Morales Vicente), observamos que a expressão do gene *Ahrr* é baixa em todos os tecidos estudados até o momento (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11624#gene-expression>). Foi sugerido o aumento do input de RNA total na reação de transcrição reversa.

Após realizarmos a transcrição reversa com um input de cerca de 5 µg de RNA total e oligo dT, conseguimos amplificar um fragmento de cerca de 650 pb com os primers F5/R5 (Figura 7). Procuramos otimizar a reação para obter uma banda única, com sucesso parcial (Figura 8). Em seguida, o fragmento foi purificado do gel de agarose e enviado para sequenciamento.

Figura 7 - Gel de agarose com produtos de PCR em gradiente de temperatura (59°C; 60°C) das amostras de animais HIII e LIII para o primer AHRR-F5/R5

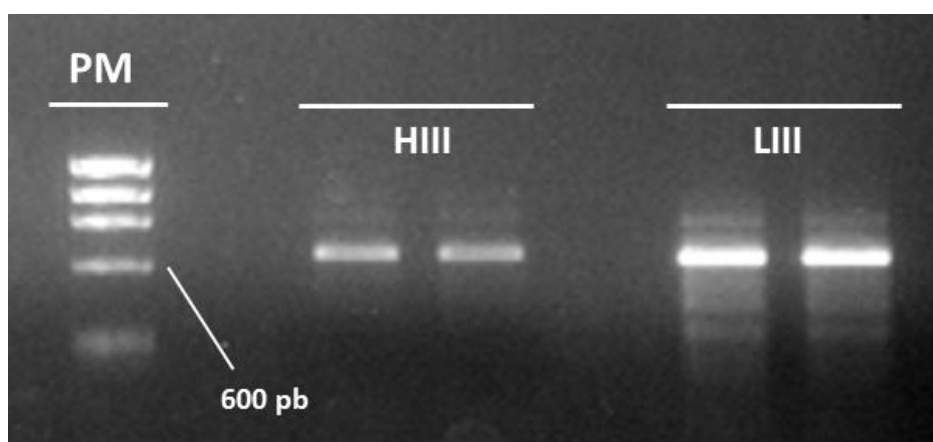


Fonte: próprio autor, 2021.

Amplicons de bandas múltiplas e com marcas de arraste em ambas as temperaturas. Marcador de peso molecular empregado: 100 pb (Thermo Fisher, EUA).

Não tivemos sucesso em amplificar os fragmentos dos primers F1/R1 e F2/R2 com estas preparações de cDNA, mesmo alterando diversos parâmetros da reação de PCR. Por isso, estamos considerando desenhar novos primers para amplificar fragmentos menores ou então clonar os fragmentos de cDNA em plasmídeos para amplificação e posterior sequenciamento.

Figura 8 - Gel de agarose com produtos de PCR das amostras HIII e LIII para o primer AHRR-F5/R5



Fonte: próprio autor, 2021.

Perfil eletroforético otimizado, no entanto ainda de bandas múltiplas e marcas de arraste. Marcador de peso molecular empregado: $\Phi X174$ *HaeIII* fragments (Invitrogen, EUA).

4.2.3 Sequenciamento do fragmento *Ahrr5*

A sequência obtida da amplificação com os primers AHRR F5/R5 não pôde ser considerada, devido à baixa qualidade alcançada pela reação.

5 DISCUSSÃO

Este estudo considerou a diversidade de componentes na etiologia da artrite reumatoide, com foco em dois genes da via de ativação do *AhR*. Tanto no que diz respeito às interações com a microbiota, o componente imunológico, ou ainda a localização dos genes *Ahrr* e *Arnt*, contidos em *loci* reguladores de fenótipos

quantitativos da artrite (JENSEN et al., 2006, e dados não publicados), os elementos divergentes entre as linhagens HIII e LIII justificam a avaliação de uma possível relação entre doença e a presença de polimorfismos nestes genes. Para tal, buscamos identificar polimorfismos dos genes *Ahrr* e *Arnt* fixados nas linhagens, e que pudessem ser associados ao desenvolvimento de artrite.

Polimorfismos de genes da via do receptor de aril-hidrocarbonetos (AhR) já foram associados a condições como endometriose e infertilidade feminina (MÉAR et al., 2020), infertilidade masculina (WATANABE et al., 2004), neoplasias (BROKKEN et al., 2013) e distúrbios de desenvolvimento embriológico, tais como fenda labial (KAYANO et al., 2004). Contudo, somente mais recentemente passaram, também, a ser implicados em mecanismos de desenvolvimento de doenças autoimunes: Schurman et al. (2020) destacaram a trans-eticidade com que polimorfismos do *Arnt* estão presentes em pacientes portadores de distúrbios autoimunes. O estudo de coorte realizado observou as relações entre polimorfismos do gene e doenças autoimunes nos grupos étnicos afro-americano, caucasiano e hispânico, indicando um amplo papel do *Arnt* e suas variantes no estabelecimento de tais enfermidades. Jazi et al. (2021) observaram que uma variante do gene *Ahrr* acentua a suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e também sua gravidade em fumantes. Em relação à artrite reumatoide, Cheng et al. (2017) constataram a associação entre polimorfismos do gene *Ahrr* e a maior suscetibilidade genética à doença na etnia Han. Ainda assim, no entanto, o vínculo entre a via de ativação do *AhR* com o sistema imunológico permanece pouco explorado, especialmente no que diz respeito à autoimunidade.

Em nossa experimentação, nos deparamos com algumas limitações na tentativa de avaliar a presença de polimorfismos entre os animais HIII e LIII, algumas delas intrínsecas aos genes em si: a baixa taxa de expressão do *Ahrr* comprometeu os ensaios até que fosse feita a opção pelo aumento do input do RNA total a ser usado na síntese de cDNA; Além disso, tanto *Ahrr*, quanto *Arnt* contêm extensas regiões não codificantes nas UTRs 3' dos seus mRNAs, o que se mostrou um desafio à etapa de amplificação dos transcritos obtidos das amostras dos animais. A estratégia praticada de amplificação fragmentada da região codificante para posterior sobreposição de tais fragmentos, ainda que não tenha sido totalmente

bem-sucedida no caso do gene *Ahrr*, funcionou relativamente bem para o *Arnt*. Três dos cinco fragmentos demarcados foram amplificados e sequenciados, cobrindo grande parte de sua sequência. Já para o *Ahrr*, nenhum dos fragmentos foi processado com êxito, no entanto o sucesso obtido na amplificação de um fragmento após o aumento do input para a síntese de cDNA sugere um caminho a ser seguido com desenho de novos primers para fragmentos gênicos menores a serem amplificados. Outro entrave encontrado, desta vez de natureza técnica, diz respeito à perda de sequências das extremidades dos fragmentos amplificados - maior que o esperado - tornando necessário desenhar novos primers para preencher a lacuna resultante. As sequências analisadas até o momento não mostraram divergência conclusiva entre as linhagens HIII e LIII para o gene *Arnt*. No entanto, apenas quando a região codificante for totalmente sequenciada poderemos concluir sobre esta questão. Em relação ao gene *Ahrr*, avançamos pouco no processo em direção ao sequenciamento, o que foi inesperado e nos tomou um longo tempo até que um primeiro resultado fosse obtido.

6 CONCLUSÕES

Apesar dos contratempos enfrentados, conseguimos avançar no sequenciamento de um dos genes-alvo do estudo, o *Arnt*, assim como identificamos um possível caminho para obter a sequência do *Ahrr*. Estratégias a serem implementadas, como otimizar a amplificação dos genes — especialmente o *Ahrr* — através de maior fragmentação da sequência a ser amplificada, ou ainda por meio da clonagem de fragmentos do gene em plasmídeos para posterior sequenciamento, poderiam superar os obstáculos encontrados no decorrer deste estudo, e indicam os próximos passos a serem seguidos na continuidade da avaliação da influência destes genes da via do *AhR* sobre suscetibilidade à PIA. Outros cenários de otimização técnica da busca por polimorfismos passam também pelo desenho de primers específicos que se liguem aos fragmentos de cDNA 30 bases antes da região onde se pretende ter bom sequenciamento, e que seja contabilizado que o mesmo continuará com qualidade por cerca de 400 a 500 bases após este ponto, contornando as perdas de qualidade nas extremidades dos fragmentos; e pela re-amplificação, por nested-PCR, dos produtos de PCR, empregando-se os mesmos primers ou primers internos

ao amplicon. Essa estratégia buscaria eliminar bandas espúrias e, possivelmente, gerar bandas em situações em que não se observa amplificação a olho nu no gel de eletroforese da PCR original por baixa eficiência de produção de amplicons.

Verificar a extensão do componente genético da artrite reumatoide é imprescindível para a melhor compreensão da doença, racionalização e antecipação de seu diagnóstico, e direcionamento de seu tratamento. Do mesmo modo, a plasticidade da regulação da resposta imune por componentes endógenos, da dieta ou do metabolismo microbiano, como demonstrado para o AhR, evidencia a complexidade das interações que podem resultar em doenças autoimunes. Portanto, a conclusão deste estudo, em conjunto com a análise do efeito da microbiota nas linhagens HIII e LIII, pode contribuir com o entendimento de algumas destas interações. Neste sentido, a via do *AhR* se mostra um campo promissor ainda a ser explorado.

REFERÊNCIAS¹

- ALMUTAIRI, K. et al. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. **Rheumatology international**, v. 41, n. 5, p. 863–877, 2021.
- BELKAID, Y.; HAND T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**. 2014;157:121–41
- BROKKEN, L. J. S. et al. Association between polymorphisms in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene and disseminated testicular germ cell cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 4, 2013.
- BROWN, J.; ROBUSTO, B.; MOREL, L. Intestinal Dysbiosis and Tryptophan Metabolism in Autoimmunity. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1741, 2020.
- CHENG, L. et al. Genetic association of aromatic hydrocarbon receptor and its repressor gene polymorphisms with risk of rheumatoid arthritis in Han Chinese populations. **Medicine**, v. 96, n. 15, p. e6392, 2017.
- CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 43, 2016.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & translational immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, 2016.
- DAFT, J. G. et al. Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. **Microbiome**, v. 3, p. 17, 2015.
- DA SILVA SANTOS, A. C. et al. Gut dysbiosis in mice genetically selected for low antibody production. **Gut pathogens**, v. 9, p. 43, 2017.
- DONATE, P. B. et al. Cigarette smoke induces in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 1, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2017120118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2017120118>.
- FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356–361, 2003.
- GUYOT, E. et al. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmacotoxicological implications. **Drug discovery today**, v. 18, n. 9-10, p. 479–486, 2013.
- HUBBARD, T. D.; MURRAY, I. A.; PERDEW, G. H. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 43, n. 10, p. 1522–1535, 2015.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

HUI, W. et al. Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. **International immunopharmacology**, v. 68, p. 226–233, 2019.

JAZI, M. S. et al. Genetic variation in CYP1A1 and AHRR genes increase the risk of systemic lupus erythematosus and exacerbate disease severity in smoker patients. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 35, n. 12, p. e22916, 2021.

JENSEN, J. R. et al. Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes and immunity**, v. 7, n. 1, p. 44–50, 2006.

KAYANO, S. et al. Significant association between nonsyndromic oral clefts and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). **American journal of medical genetics. Part A**, v. 130A, n. 1, p. 40–44, 2004.

MATHIS, D. **A gut feeling about arthritis**Life, 2013.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.

MÉAR, L. et al. Polymorphisms and endometriosis: a systematic review and meta-analyses. **Human reproduction update**, v. 26, n. 1, p. 73–102, 2020.

MORGAN, R. et al. Immune reactivity to connective tissue antigens in pristane induced arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 8, p. 1497–1505, 2004.

PATTEN, C. et al. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. **Arthritis and rheumatism**, v. 50, n. 10, p. 3334–3345, 2004.

PIPER, C. J. M. et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. **Cell reports**, v. 29, n. 7, p. 1878–1892.e7, 2019.

POTTER, M.; WAX, J. S. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. **Journal of immunology**, v. 127, n. 4, p. 1591–1595, 1981.

QUINTANA, F. J. et al. **Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor**Nature, 2008. DOI: 10.1038/nature06880. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06880>.

ROSSATO, C. et al. Early Peritoneal CC Chemokine Production Correlates with Divergent Inflammatory Phenotypes and Susceptibility to Experimental Arthritis in Mice. **Journal of immunology research**, v. 2019, p. 2641098, 2019.

ROSSER, E. C. et al. Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. **Cell metabolism**, v. 31, n. 4, p. 837–851.e10, 2020.

SAKURAI, S.; SHIMIZU, T.; OHTO, U. The crystal structure of the AhRR-ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated

transcription. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 43, p. 17609–17616, 2017.

SANT'ANNA, O. A. et al. Genetic control of innate and acquired immunity. **Ciência e Cultura.**, 46(5/6): 363-7. 1994

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, v. 2, p. e01202, 2013.

SCHURMAN, S. H. et al. Transethnic associations among immune-mediated diseases and single-nucleotide polymorphisms of the aryl hydrocarbon response gene *ARNT* and the *PTPN22* immune regulatory gene. **Journal of autoimmunity**, v. 107, p. 102363, 2020.

SIQUEIRA, M. et al. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **European journal of immunology**, v. 6, n. 4, p. 241–249, 1976.

STASIUK, L. M. et al. Pristane-induced arthritis is CD4+ T-cell dependent. **Immunology**, v. 90, n. 1, p. 81–86, 1997.

SYMMONS, D.; MATHERS, C.; PFLEGER, B. The global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000. **Geneva: World Health Organization**; 2003.

TAKEUCHI, Y.; HIROTA, K.; SAKAGUCHI, S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. **Immunological reviews**, v. 294, n. 1, p. 164–176, 2020.

THOMPSON, S. J.; ELSON, C. J. Susceptibility to pristane-induced arthritis is altered with changes in bowel flora. **Immunology letters**, v. 36, n. 2, p. 227–231, 1993.

THOMPSON, S. J. et al. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **European journal of immunology**, v. 20, n. 11, p. 2479–2484, 1990.

VIGAR, N. D. et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **European journal of immunology**, v. 30, n. 2, p. 431–437, 2000.

WATANABE, M. et al. Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins. **Fertility and sterility**, v. 82 Suppl 3, p. 1067–1071, 2004.

WOOLEY, P. H. et al. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis and rheumatism**, v. 32, n. 8, p. 1022–1030, 1989.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature medicine**, v. 21, n. 8, p. 895–905, 2015.

APÊNDICE

Ao longo do período envolvido no grupo de trabalho no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, também participei da realização dos experimentos de um estudo de expressão gênica em camundongos HIII e LIII submetidos a modelo de PIA. Estes experimentos fazem parte do projeto da aluna Alanis Tiozzo Souza, bolsista de iniciação científica FAPESP sob orientação do Dr. José Ricardo Jensen. O estudo busca avaliar se a suscetibilidade ao desenvolvimento da artrite tem relação com parâmetros de ativação do *AhR* em animais das linhagens HIII e LIII submetidos ao protocolo de amamentação cruzada logo após o nascimento. Para isto, investigamos a expressão gênica do *AhR* e de genes relacionados à sua via de ativação, e como esta reflete a linhagem parental e/ou adotiva dos camundongos.

Me inseri neste trabalho atuando nas metodologias de bancada, auxiliando nos procedimentos de extração de RNA de amostras de baço e células peritoneais dos camundongos, e de determinação de suas concentrações, pureza e níveis de integridade: Os materiais biológicos coletados dos animais foram processados com o kit de extração Illustra™ RNAspin mini (GE Life Sciences, EUA) para a obtenção do RNA a ser estudado, o qual foi posteriormente quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoVue (GE, EUA). O equipamento também analisa a pureza do material obtido. Outra análise realizada foi de integridade, efetuada no aparelho BioAnalyzer 2100 (Agilent, EUA) com o kit RNA Nano 6000 (Agilent, Alemanha). Posteriormente, efetuamos a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído por transcrição reversa. O kit utilizado foi o GoScript Reverse Transcriptase (Promega, EUA), empregado de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez sintetizado o cDNA, procedemos com qRT-PCR no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA), para investigar a expressão dos seguintes genes: *Ahr*, *Arnt*, *Ahrr*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Il6*, *Il10* e *Ido1*. Para tal, as amostras foram dispostas em placas, em triplicata, e adicionadas de mix FAST SyberGreen Mastermix (Applied Biosystems, EUA) e primers específicos aos genes-alvo.

A análise estatística mostrou que a expressão do gene *AhR* foi modulada negativamente pela amamentação cruzada nos animais LIII amamentados por mães

HIII (transferidos). Já a expressão do gene *Arnt* aumentou nos animais HIII transferidos em relação aos animais HIII amamentados pelas mães biológicas (não transferidos). A expressão do gene *Il6*, por sua vez, foi aumentada no grupo HIII transferido, diferindo em relação aos animais HIII não transferidos e LIII transferidos. E, para o *Il10*, o grupo HIII transferido apresentou taxa de expressão que não diferia dos animais LIII transferidos, apesar de haver uma diferença basal da expressão entre animais HIII e LIII. A expressão dos genes *Cyp1a1* e *Cyp1b1* não diferiu entre os grupos, e os resultados para expressão dos genes *Ahrr* e *Ido1* não foram consistentes, de modo que não puderam ser analisados.

Outro aspecto da atuação desenvolvida no laboratório foi o da manutenção dos camundongos utilizados nos experimentos. Me inseri nesta rotina participando dos procedimentos de separação de crias, sexagem e formação de casais de animais para perpetuação das linhagens.