

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeitos da modulação das proteínas HSP70 e
HMGB1 na neuroinflamação provocada pela
sepsse em ratos**

João Paulo Almeida dos Santos

Porto Alegre
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeitos da modulação das proteínas HSP70 e
HMGB1 na neuroinflamação provocada pela
sepse em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Mestrando: João Paulo Almeida dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

**Toda geração acredita ser destinada a reformar o mundo.
A tarefa da minha geração, talvez seja maior ainda:
é impedir que o mundo desmorone.**

Albert Camus

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Antonio Alves dos Santos e Celina Almeida dos Santos, pelo carinho e sabedoria ao criar seus filhos. Dando-me o bem mais precioso, que foi minha educação. Herança que nunca será tirada de mim.

As minhas irmãs que sempre fizeram companhia.

Aos meus queridos amigos da Universidade Federal de Sergipe: José Roberto, Cristiane, Dani, Clio, Ariel. Saibam que foi mais divertido ao lado de vocês.

Aos amigos da vida: Tony, Paulo, Raquel, Gabriela, Bruna, Rebeca, Tiago. Afinal, sei onde encontrar cada um de vocês.

Ao Professor Daniel, por permitir realizar o desejo de ser pós-graduado em Bioquímica.

Ao Professor José Claudio.

Ao amigo e colega de laboratório Carlos Eduardo "BOBS".

Ao todos que fizeram e fazem parte do Laboratório 32.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Sumário

PARTE I.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
SIGLAS E ABREVIACÕES.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Sepses.....	5
1.2 Patogêneses da Sepses.....	6
1.3 Citocinas Pró-inflamatórias e Anti-inflamatórias.....	8
1.4 Proteína de Choque Térmico 70 (Hsp70) e Proteína de Alta Mobilidade Caixa 1 (Hmgb1).....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
PARTE II.....	14
CAPÍTULO 1(Artigo Científico).....	15
CAPÍTULO 2 (Resultados Adicionais).....	27
PARTE III.....	46
3. DISCUSSÃO.....	47
4. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	53

PARTE I

Resumo

A sepse é um conjunto complexo de interações moleculares e celulares mediado pela estimulação de receptores celulares envolvidos na inflamação. O controle desta rede de sinalização é compensado pela resposta pró- e antiinflamatória do organismo. Os desequilíbrios inflamatórios induzidos alteram o estado fisiológico de diversos órgãos. No cérebro, observam-se diversas modificações que envolvem desde o aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), morte de células neurais por apoptose ou necrose, redução do fluxo sanguíneo e aumento do estresse oxidativo, resultando no desenvolvimento do *delirium* associado à sepse. O *delirium* associado à sepse é um conjunto de disfunções neurológicas induzidas por uma resposta inflamatória sistêmica. Assim, é possível que diferentes mecanismos compensatórios estejam envolvidos durante a sepse. Este estudo objetivou analisar a influência do modelo de ligação cecal e punção (CLP), na excreção de ligantes do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e as modificações ocasionadas no cérebro pela inflamação sistêmica decorrente da sepse. Nossos resultados demonstraram que os níveis séricos de TNF- α aumentaram após a indução da CLP, confirmando o estado inflamatório dos animais CLP, ocorrendo um aumento nos níveis de proteínas carboniladas, HSP70 e HMGB-1 no soro desses animais, indicando um aumento de estresse oxidativo nesses animais e liberação de proteínas associadas a manutenção e estabilização intracelular. Entretanto, encontramos uma redução no imunoconteúdo de destas proteínas no hipocampo e córtex, possivelmente por aumento nos níveis de necrose/lise celular ou por eliminação durante o período de disrupção da BHE. Assim, concluímos que durante a sepse ocorre um aumento expressivo nos níveis séricos de proteínas associadas a resposta inflamatória crônica, além de alterações nos níveis destas proteínas relacionadas a proteção intracelular no hipocampo e córtex, que pode ter relação com as alterações observadas em pacientes e modelos animais.

Abstract

Sepsis is a complex whole of molecular and cellular interactions mediated stimulation of cellular receptors involved in inflammation. The control of this system is compensated by pro and anti-inflammatory response in organism. The imbalance induced inflammatory alters the physiological state of different organs. In the brain, there are various modifications that involve from the increase in permeability of the blood-brain barrier (BBB), neural cell death by apoptosis or necrosis, reduced blood flow and increased oxidative stress, resulting in the development of sepsis-associated delirium. Sepsis-associated delirium is a whole of neurological dysfunctions induced a systemic inflammatory response. Thus, it is possible that different compensatory mechanisms are involved during sepsis. The aim of the study was to analyze the influence of the model cecal ligation and puncture (CLP), in the excretion of agonists for receptor advanced glycation end products (RAGE) and alterations in the brain caused by systemic inflammation caused by sepsis. Our results showed that serum levels of TNF- α increased after the induction of CLP, confirming the inflammatory status of CLP animals, which results in increased levels of carbonylated proteins, HSP70 and HMGB-1 in the serum of these animals, indicating an increase of stress oxidative these animals and release of proteins associated with maintaining and stabilizing intracellular. However, happened a reduction in immunocentent these proteins in the hippocampus and cortex, possibly by increased levels of necrosis/lysis cell or by removal during the period of disruption of the BBB. Therefore, concluded that during sepsis occurs a significant increase in serum proteins associated with chronic inflammatory response and changes in levels of proteins related to intracellular protection in the hippocampus and cortex, which may be related to the changes observed in patients and models animals.

Siglas e Abreviações

- AGE** – Produtos finais de glicação avançada
- AP-1** – Proteína Ativadora 1
- BHE** – Barreira Hematoencefálica
- CARS** – Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória
- CLP** – Ligação Cecal e Punção
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- ERON** – Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
- DAS** – *Delirium* Associado à Sepsis
- HMGB1**- High-Mobility Group Box 1 (Proteína de Alta Mobilidade Box 1)
- HSF-1** – Fator de Choque Térmico-1
- HSP** – Heat Shock Protein (Proteína de Choque Térmico)
- ICAM** – Molécula de Adesão Intercelular
- IL** – Interleucinas
- INF** – Interferon
- IRF** – Fator Regulador de Interferon
- MAPK** – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
- NF-κB** – Fator Nuclear kappa B
- NO** – Óxido Nítrico
- NOS** – Óxido Nítrico Sintase
- PAF** – Fator Ativador de Plaquetas
- PAMP** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- PRR** - Receptores de Reconhecimento Padrão
- RAGE** – Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada
- SIRS** – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- TLR** – Receptor Toll-like
- TNF-α** – Fator de Necrose Tumoral alfa

1. Introdução

1.1. Sepses

Sepses é uma síndrome decorrente da resposta imunológica iniciada por um processo infeccioso, caracterizado por alterações hemodinâmicas e metabólicas que podem resultar em choque séptico, disfunções múltiplas de órgãos e morte (Araújo et al., 2012). A incidência da sepses ultrapassa os 750.000 casos anuais, nos Estados Unidos, refletindo entre 30-50% de mortes em unidades de terapias intensivas e investimentos superiores a 16,7 bilhões de dólares por ano com tratamentos (Iwashyna et al, 2010; Perl et al., 1995; Quartin et al., 1997; Angus et al., 2001). No Brasil, a mortalidade atinge 46,6% dos casos estudados, variando entre 16,7-65,3% dependendo do grau de severidade da sepses, gerando gastos de 8,5 bilhões de dólares por ano (Sales Jr et al., 2006; Marshall et al., 2005). Entre os pacientes sépticos 8-70% dos casos desenvolvem *delirium* associado à sepses, caracterizada por várias anormalidades neurológicas observadas, como desorientação, confusão, agitação, letargia, e coma (Papadopoulos et al., 2000; Dellinger, 2003).

Embora restritos, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos durante o desenvolvimento da sepses e *delirium* associado à sepses apontam para a geração acentuada de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) e eicosanoides (Salvemini & Cuzzocrea, 2002), podendo ser iniciada por infecções bacterianas, gram-positivas ou gram-negativas, fungos ou por agentes causais não identificados, sugerindo que outros mediadores podem desencadear a encefalopatia nestas condições (Jacob et al., 2011). A inflamação sistêmica resultante da infecção

ou demais causas parece, provavelmente, ser a principal causa do *delirium* associado à sepse (Goris, 1990), iniciando uma cascata de sinalização celular com liberação de mediadores inflamatórios, redução do fluxo sanguíneo cerebral e acesso a oxigênio, disrupção da barreira hematoencefálica (BHE), edema e ativação de células imunocompetentes (Papadopoulos et al., 2000; Jacob et al., 2011).

1.2 Patogêneses da Sepse

A resposta sistêmica iniciada pela infecção presente na sepse é um processo complexo e multifatorial associado à ativação e liberação de mediadores inflamatórios pelos leucócitos, principalmente, macrófagos, com profundos efeitos sinalizadores nas células endoteliais e astrócitos, resultando em danos celulares e disfunções neurais (Papadopoulos et al., 2000).

Durante o processo inflamatório ativa-se a liberação de citocinas pelas células inflamatórias, ocorrendo vasodilatação em resposta a produção de óxido nítrico (NO) (Papathanassoglou et al., 2000). Estas modificações inflamatórias e/ou circulatórias estão ligadas a um aumento significativo no número de células em apoptose no cérebro (Wilson & Young, 2003), assim, a ativação das vias inflamatórias e apoptóticas desencadeiam alterações neurológicas como desorientação, agitação, confusão, sonolência e coma (Papadopoulos et al., 2000). De acordo com Comim et al. (2009), após a sepse ocorre um comprometimento da memória a longo prazo dos sobreviventes, por possíveis alterações no sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico.

Na sepse a ativação das células endoteliais compromete a perfusão tecidual em diferentes regiões do cérebro por alterações na microcirculação, que resultam em alterações osmóticas, permitindo o tráfego de metabolitos tóxicos e células

inflamatórias no cérebro, as quais induzem a ativação das células da micróglia, levando a danos neuronais (Sharshar et al., 2010; Nishioku et al., 2009). Durante as disfunções da BHE diversos mediadores pró-inflamatórios são induzidos, tais como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ e ativação do complemento que, conseqüentemente, reduz a integridade da BHE, resultando em edema e desestruturação das projeções dos astrócitos, aumentando o recrutamento e infiltração local de leucócitos (Papadopoulos et al., 2000; Jacob et al., 2011). Essa progressiva liberação de mediadores inflamatórios na circulação aumenta o deslocamento leucocitário à periferia dos vasos, por intermédio de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular (ICAM), que aumenta a infiltração leucocitária intracerebral e ativa a micróglia (Pytel & Alexander, 2009).

Durante o processo de sinalização, iniciado pela infecção, as diversas citocinas liberadas apresentam um importante papel no desenvolvimento da inflamação aguda e crônica da sepse, por agirem como mediadores inflamatórios estimuladores do sistema imune inato (Dejager et al., 2011). Durante a infecção, componentes bacterianos estimulam a produção de mediadores químicos envolvidos no recrutamento, crescimento e diferenciação dos leucócitos (Vasselon & Detmers, 2002). A liberação sistêmica de diversas interleucinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10) pelos leucócitos apresenta um papel importante no desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e síndrome da resposta antiinflamatória compensatória (CARS). Durante a produção destes mediadores pode ocorrer um desbalanço entre estado hiper e hipoinflamatório, conduzindo o paciente à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte (Koch, 1998; Oberholzer et al., 2000; Netea et al., 2003).

1.3 Citocinas Pró-inflamatórias e Antiinflamatórias

A resposta inflamatória da sepse envolve uma resposta imune bifásica, a SIRS e CARS, ambas caracterizadas pelo aumento de citocinas e quimiocinas, apresentam um desequilíbrio e/ou exacerbação de qualquer resposta durante a sepse, resultando em danos diretos ao hospedeiro por inflamação excessiva ou indiretamente por disfunção imunológica (Buras et al., 2005). Durante a SIRS e a CARS os leucócitos, principalmente macrófagos, liberam consideráveis quantidades de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 que induzem alterações metabólicas graves e disfunções teciduais (SALLES et al., 1999).

Na SIRS as citocinas TNF- α e IL-1 β são as principais citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação inicial da resposta inflamatória (Hack et al., 1997), sendo produzidas por diversos tipos celulares em resposta a um estímulo infeccioso. Os monócitos e macrófagos são as principais células produtoras de tais citocinas durante a fase pró-inflamatória da sepse (Parameswaran & Patial S, 2010). O TNF- α possui um papel central na produção da cascata de citocinas pró-inflamatórias, no recrutamento e adesão ao endotélio de células fagocitárias, essencial para a eliminação dos microrganismos. Quando produzido excessivamente causa danos consideráveis ao hospedeiro, sendo considerado um "regulador mestre" na produção de citocina pró-inflamatória (Maini, 1995; Parameswaran & Patial, 2010). O efeito sinalizador do TNF- α na fase inicial da inflamação tem sido associado à indução da ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) na presença de IFN- γ (Wesemann & Benveniste, 2003). O NF- κ B é um fator de transcrição essencial, na resposta de defesa do hospedeiro contra a infecção, ativando a transcrição de genes relacionados à resposta pró-inflamatória, tais como

TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico sintase (NOS), atuando no aumento da transdução de sinal mediada por derivados de fosfolipídios tais como prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (PAF) (Bhattacharyya et al, 2004; Gullo et al., 2005; Cinel & Dillenger, 2007; O'Brien et al., 2007; Vassalli, 1992), apontado como ponto chave no desenvolvimento da cronicidade da sepse.

Durante o desenvolvimento da CARS diversas citocinas são produzidas em resposta a sepse, a principal apontada como responsável pelos efeitos antiinflamatórios é a IL-10. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida por monócitos, macrófagos, células T e células epiteliais, responsável por mediar diversos efeitos observados na CARS, como falha na apresentação do antígeno, redução da mobilidade de macrófagos, redução na proliferação e aumento da apoptose de linfócitos B e T (Oberholzer et al., 2000). A IL-10 funciona como um regulador na rede de citocinas, por suspender a ação do TNF- α , IL-1 e IL-6 (Sikora et al., 2001). Entretanto, sua relação na patogênese da sepse continua controversa; estudos demonstram que a IL-10 possui efeitos conflitantes em amostras de pacientes sépticos e em modelos animais de endotoxemia. De acordo com Remick et al. (1998) a liberação endógena não possui efeito protetor, contrapondo-se a outros resultados que apontam a IL-10 como um agente protetor em modelos de ligação cecal e punção (CLP) (Van der Poll et al. 1995; Marchant et al, 1994).

Entretanto, os mecanismos envolvidos no balanço refinado dos efeitos pro e antiinflamatório das citocinas durante a sepse e a resposta celular decorrente da exposição continua a tais moléculas são complexos e apenas parcialmente compreendidos. Os fatores genéticos são apontados como principais modificadores tanto da intensidade como da natureza da resposta inflamatória individual

(Westendorp et al., 1997). Ainda, alterações genéticas e/ou múltiplos polimorfismos em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, receptores de citocina e os antagonistas que foram identificados (Holmes et al., 2003) são apontados como os principais responsáveis dos efeitos deletérios decorrente do desbalanço observado nos pacientes e nos modelos animais (Schaaf et al., 2003).

1.4 Proteína de Choque Térmico 70 (HSP70) e Proteína de Alta Mobilidade Box 1 (HMGB1)

A cascata inflamatória iniciada em resposta a infecção, ativa o sistema imune inato responsável pelo reconhecimento de substâncias estranhas denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (Schlichting & McCollam, 2007). Os PAMPs são um conjunto diversificado de moléculas exógenas de origem microbiana que apresentam diversas características bioquímicas reconhecíveis (moléculas inteiras, conjuntos ou partes moleculares das membranas) que alertam o hospedeiro de agentes patogênicos invasores. De modo semelhante, proteínas endógenas, como HSP70 e HMGB1, agem de forma equivalente sinalizando o estabelecimento da infecção e início do processo inflamatório (Janeway & Medzhitov, 2002).

As proteínas de choque térmico (HSP) são uma família de proteínas altamente conservadas que agem como chaperonas moleculares, facilitando a segregação, o transporte e a maturação conformacional de proteínas (Andrie et al., 2000). No meio intracelular, desempenham papel importante em diferentes processos fisiopatológicos, como citoprotetor contra múltiplos estressores físicos, químicos ou biológicos, que resultem em lesões e morte (Giffard et al, 2004; Kiang, 2004).

Recentemente, o papel biológico da HSP70 tem sido expandido, incluindo o controle da sinalização celular (Claderwood et al., 2007; Csermely et al., 2007) e modulação da resposta imune (Johnson et al, 2006; Chen et al, 2007).

Na sepse a produção de ERON e a sinalização inflamatória aumentam, consideravelmente, a expressão de HSP70 intracelular em múltiplos grupos celulares, como no sistema nervoso central (neurônios, glia e células endoteliais), além do aumento em diversas doenças (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Todryk et al, 2003; Kiang, 2004; Yenari et al., 1999). O papel da HSP70 nos espaços intracelular e extracelular é controverso, visto que suas funções distinguem-se entre os compartimentos. Durante o estresse oxidativo, a expressão de HSP70, sua ativação e liberação são afetadas e moduladas em vários níveis, por infecção, inflamação, desidratação e fornecimento de oxigênio, não são de estranhar que a liberação de HSP70 é regulada de acordo com o estado oxidante durante a sepse (Gelain et al., 2011).

A Proteína de Alta Mobilidade Box 1 (HMGB1) é uma proteína não-histona de associação ao DNA apresentando diversas funções intracelulares, incluindo a estabilização da estrutura nucleossomal e a facilitação da transcrição de genes (Bustin, 1999). A HMGB1 de acordo com as localizações celulares possui diferentes funções: no meio intracelular, desempenha um importante papel numa série de processos celulares fundamentais, tais como a transcrição, replicação, reparo do DNA, e recombinação; no extracelular, atua como citocina fundamental na mediação da resposta a infecção, lesão e inflamação (Lotze & Tracey, 2005).

Em condições inflamatórias, a HMGB1 é secretada ativamente por diversas células, tais como monócitos e macrófagos, células dendríticas e tumorais que foram estimulados com endotoxina ou citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1) (Dumitriu et al, 2005; Kuniyasu et al., 2005; Ishida et al, 2011). A HMGB1 tem sido associada na patogênese de diversas doenças, como a sepse (Wang et al., 1999), choque hemorrágico (Ombrellino et al., 1999) e artrite reumatoide (Taniguchi et al., 2003).

No meio extracelular, tanto a HSP70 quanto HMGB1 podem interagir com diversos receptores denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs), estes são responsáveis pela resposta inata do hospedeiro. Os receptores tipo *Toll* (TLR) e Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE) são receptores localizados na superfície da membrana plasmática, apresentando diversos ligantes, entre os quais HSP70 e HMGB1. Durante a resposta inata ocorre a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, que incluem moléculas adaptadoras, proteínas cinases, e fatores de transcrição tais como o NF- κ B, proteína ativadora 1 (AP-1) e os fatores reguladores de interferon (IRFs) (Tang & Lotze, 2012). A sinalização desencadeada resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6 (Asea et al., 2000; Wang et al., 2002; Lehner et al., 2004), por meio da translocação do NF- κ B ao núcleo das células.

Considerando os mecanismos envolvidos no processo de neuroinflamação e neurodegeneração desenvolvido pela resposta inflamatória sistêmica, diversos trabalhos têm demonstrado que os mediadores pró-inflamatórios como as citocinas têm um papel chave na sepse (Granja et al., 2004; Rothwell & Luheshi, 2000). Sabe-se que diversas doenças neurodegenerativas apresentam aumento nos níveis de

citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, ativação da microglia (Gemma, 2010; Williamson et al., 2002). Contudo, estudos avaliando a resposta inflamatória decorrente da liberação de proteínas endógenas como HSP70 e HMGB1 e seus papéis como ligantes de TRL e RAGE no processo de desenvolvimento do *delirium* associado à sepse.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visa esclarecer a relação dos ligantes de RAGE com parâmetros de inflamação no SNC e soro em modelo animal de sepse

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar o imunoconteúdo do TNF- α , HSP70 e HMGB1 nas estruturas do SNC por *western blot*, a fim de esclarecer uma possível relação entre a sinalização dependente dos ligantes do RAGE e inflamação no cérebro;
- Determinar os níveis séricos de TNF- α , HSP70 e HMGB1 por ELISA, a fim de esclarecer uma possível relação entre liberação de ligantes de RAGE e inflamação na circulação sistêmica;
- Determinar o nível de proteínas carboniladas no soro, a fim de avaliar o estado de estresse oxidativo no soro;

PARTE II

Capítulo 1

Manuscrito: **Damage-associated molecular patterns are down-regulated in hippocampus of survivor rat sepsis**

A ser submetido ao periódico: Molecular and Cellular Biochemistry

Damage-associated molecular patterns are down-regulated in hippocampus of survivor rat sepsis

João Paulo Almeida dos Santos^a, Carlos Eduardo Schnorr^a, Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali^a, Felipe Dal-Pizzol^b, José Claudio Fonseca Moreira^a, Daniel Pens Gelain^{a1}

^aCenter of Oxidative Stress Research, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^aLaboratory of Experimental Physiopathology and National Institute of Translational Science and Technology in Medicine, Posgraduation Program in Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

¹ Corresponding author. Address:

Daniel Pens Gelain

Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5577;

Fax: +55 51 3308 5535.

E-mail address:

dgelain@yahoo.com.br

Abstract

Sepsis is a complex sequence of pathophysiological changes, responsible for high mortality rates in intensive care units. The mechanisms involved in the progression of sepsis, including the immune system activation induces changes inflammatory systemic. The release of proinflammatory cytokines and the activation of macrophages are major components of this response. These inflammatory mechanisms may have an important role in the protein expressing, but the clinical significance of this response in sepsis is not fully established. The aim of this study is to evaluate the changes in the expression of receptor advanced glycation end products (RAGE) ligands and inflammatory profile of rats submitted cecal ligation and perforation (CLP) model. The animals were divided into group CLP and "sham" group. The serum and hippocampus were immediately isolated, and was utilized for determining heat shock protein 70 (HSP70), high mobility group box 1 (HMGB1) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels. It was observed that animals subjected to CLP presented increase levels serum TNF-alpha, but also carbonyl protein, HSP70 and HMGB1. Septic rats increase immunocontent of TNF-alpha in hippocampus, while HSP70 and HMGB1 levels in the hippocampus decreased. Our results demonstrate that rats that survive sepsis show the increase in HSP70 and HMGB1 in the serum of septic animals, but a decrease in expression of these proteins in the hippocampus.

Keywords: sepsis, inflammation, hippocampus, HSP70, HMGB1

Introduction

Sepsis is defined as clinical evidence of the hosts reaction to infection, with systemic sequelae such as increased respiratory rate, increased heart rate, abnormal body temperature, and inadequate organ perfusion [1, 2]. These complications are the leading causes of mortality in intensive care units accounting for 10–50% of death, accounting for approximately 750,000 cases per year in North America [3, 4].

During sepsis, the inflammatory response resulting from the activation of neutrophils and macrophages generate prodigious amounts of ROS, and in some situations reactive nitrogen species (RNS) [5]. Excessive production of these proinflammatory mediators have the potential neurotoxic effect to the brain is an early after all affected organs during development, sepsis. Although there are conflicting results on the brain levels of specific serum proteins (BSP) in septic patients, or excretion resulting from cell lysis resulting from necrosis [6]. This inappropriate activation of signaling pathways could occur during the acute or chronic sepsis, activating mechanisms of maintenance and defense.

Heat shock proteins (HSPs) and high mobility group box 1 (HMGB1) are molecule highly conserved, it plays a role in a number of fundamental cellular processes such as transcription, replication, DNA repair, and recombination [7]. However, the functions of extracellular are immunogenic through of antigenic peptides, stimulate macrophages to elaborate cytokine and induce expression of higher levels de molecules co-stimulatory to intracellular signal transduction and transcription pathways that include the NF- κ B and interferon response factor pathways [8, 9].

Although the underlying mechanisms are still not well understood, sepsis possibly arises from the action of oxidative stress, inflammation, and neuronal apoptosis in the brain. Studies show that intense exposure of neural cells to ROS and cytokines can be neurotoxic, primarily due to an over activation inflammatory, a phenomenon known as neuroinflammation [10, 4, 2]. Therefore, stimulation of neurons and glia by inflammatory mediators such as TNF-alpha, together with HSP70 and HMGB1 has been suggested as a key factor in the pathophysiology of sepsis.

In order to understand the mechanism of neurodegeneration induced by sepsis, we evaluate the changes in serum levels of cytokines and hippocampus and proteins HSP70 and HMGB1 in animals surviving submitted to binding model and cecal puncture, and possible implications.

Materials and methods

Chemicals

Polyclonal antibody to HSP70 and β -actin were obtained from Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA. Polyclonal antibodies to HMGB1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA. TNF- α polyclonal antibody was obtained from Abcam, Cambridge, MA, USA. TNF- α assay kit was obtained from Invitrogen, Grand Island, NY, USA. All other chemicals were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Animals

Thirty adult male Wistar rats (220–340 g; 60 days old) were obtained from our breeding colony. Animals were caged in groups of five with free access to food and water and maintained on a 12 h light–dark cycle (7:00–19:00 h), at a temperature-controlled colony room ($23\pm 1^\circ\text{C}$). These conditions were maintained constant throughout the experiments. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication number 80-23 revised 1996) and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior recommendations for animal care. Our research protocol was approved by the Ethical Committee for animal experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul (#22629).

Cecal Ligation and Perforation Surgery (CLP)

Animals were subjected to CLP as described [11] with adaptations [12]. Under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum with the adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated once with a 14-gauge needle. The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site and then returned to the peritoneal cavity; the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. Animals were resuscitated with normal saline (50 mL/kg subcutaneously) immediately and 12 h after CLP.

In the sham-operated group, the rats were submitted to all surgical procedures but the cecum was neither ligated nor perforated. Then, the rats were divided into six groups: sham (24h, 14, and 30 day) and CLP (24h, 14, and 30 day).

Determination of TNF- α , HSP70 and HMGB1 production

Serum TNF- α level was determined using an ELISA kit specific for rat TNF- α (Invitrogen, San Diego, CA). Indirect ELISA was performed to analyze changes in the content of HSP70 and HMGB1 by utilizing a polyclonal antibody to HSP70 diluted 1:10000 in carbonate buffer 0.5 M pH 9.6. Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in carbonate buffer. Plates were then washed four times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween-20), and the specific antibodies were added to the plates and incubated overnight at 4°C temperature. After washing (four times), a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated (diluted 1:20000) for 2 h at room temperature was carried out. After addition of substrates (hydrogen peroxide and 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine, 1:1, v/v), the samples were read at 450 nm in a plate spectrophotometer. Results are expressed as HSP70 ng/mL.

Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described [13]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% TCA and redissolved in DNPH and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

Western blotting

Proteins (30 μ g) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE) in 10% (w/v) acrylamide, 0.275% (w/v) bisacrylamide gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 2% (w/v) bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated for 12 h with the appropriate primary antibody (anti-HSP70, dilution 1:1000, Cell Signaling[®]; anti-HMGB1, dilution 1:1000, Santa Cruz[®]; anti-TNF- α , dilution 1:1000, Abcam[®]) rinsed with TBS-T, and exposed to horseradish peroxidase-linked anti-IgG for 2 h at

room temperature. Chemiluminescent bands were detected using X-ray films, and densitometry analyses were performed using Image-J® software.

Sample preparation

After the post surgery the rats were killed by decapitation and the brain regions was surgically removed and cleaned with iced saline solution to remove blood. The brain regions were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) pH 7.4, the homogenate was centrifuged at 700 x g to remove debris, and the supernatant was used for assays. The protein content was quantified by Bradford method for data normalization [14].

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) and student's unpaired *t* test was used to evaluate differences between groups. The statistical analysis and graph elaboration were conducted with GraphPad Software Inc.1, San Diego, CA, USA –version 5.00. Significance level considered was $p \leq 0.05$.

RESULTS

First, we evaluated the effect of sepsis in the production of the proinflammatory cytokine TNF- α and also on protein carbonylation in serum. As expected, serum TNF- α levels in the septic rats were higher than in the sham-operated rats 24 h after CLP and this difference declined with time in surviving animals (fig 1A). As an index of oxidative damage we assessed the levels of serum protein carbonylation and observed that carbonyl groups were significantly increased 14 days and 30 days after CLP compared to sham-operated rats (fig 1B). At earlier periods, however, no differences in protein carbonylation between sham and CLP groups were observed.

We next investigated whether serum levels of HSP70 in animals submitted to CLP are related to serum levels of TNF- α and protein carbonylation. We observed that serum HSP70 levels are significantly increased 30 days after CLP, while in earlier periods no statistically significant differences were detected (fig 2A). This profile of HSP70 presence in serum through 30 days after CLP in surviving animals was similar to the profile of protein carbonylation (fig. 1B). Also, the profile of both HSP70 and protein carbonylation in these time points was opposite the profile of TNF- α secretion (fig.1A). Interestingly, HMGB1

levels in serum increased in periods of 14 days and 30 days after the CLP (fig. 2B), suggested an inverse release of TNF- α and an early release compared to HSP70.

Since sepsis has been related to cause different degrees of damage to brain tissue, affecting diverse neurologic functions in both reversible and irreversible manners [15] we next wanted to explore the relationship between total levels of TNF- α and HSP70 in hippocampus. In previous works, oxidative stress markers such as TBARS and carbonyl levels were reported to be increased in the hippocampus in periods less than 24 hours and 10 days after induction of CLP [16, 4, 17]. Here, we performed western blotting analysis to assess whether expression of TNF- α , HSP70 and HMGB-1 might be associated with tissue damage induced by CLP in hippocampus. This brain structure is responsible for cognitive responses, memory and learning and exerts an important role in many of the physiological functions necessary during trauma and critical illnesses in the CNS [2].

The total immunocontent of HSP70 varied at hippocampus according with time after CLP recovery (fig 3). In hippocampus, HSP70 levels were significantly decreased 14 days after CLP compared to sham-operated animals. Similarly, the contents of HMGB1 immunoreactivity decreased at 14 days in the CLP Group. Overall, animals submitted to CLP presented a decreased HSP70 and HMGB1 immunocontent in hippocampus at different time points analyzed, indicating that HSP70 and HMGB1 expression is downregulated at different degrees by sepsis in hippocampus.

According to the values of TNF- α in the hippocampus, an increase in TNF- α immunocontent the CLP group at 24 and 14 days after induction, resembling the values observed in serum. This result suggests that the severity of the model maintains the systemic inflammatory state and hippocampus.

DISCUSSION

A broad spectrum of neurodegenerative diseases is associated with chronic inflammation. However, the chronic neuroinflammatory processes potentially implicated in neuronal damage leading to cognitive impairment are scarcely detailed [18, 19]. Accumulation of evidence suggests that the diverse proinflammatory response in sepsis and the resulting damage to the brain cause encephalopathy-like behavior such as disturbance of consciousness and delirium [20]. However, sepsis-associated delirium has never been

correlated to common markers of cellular stress and cytotoxicity. An extensive body of evidence from experimental and clinical studies indicates that sepsis is associated with increased ROS production, depletion of antioxidants and accumulation of oxidative stress markers [17]. In the present work we observed that sepsis induced by the CLP model produced changes in serum carbonyl levels and increased the presence of HSP70 and HMGB-1 in serum after acute phase of proinflammatory signaling.

HSPs are molecular chaperones essential for cells to cope with environmental stresses, by preventing or reversing abnormal protein folding or aggregation [21]. The presence of HSP70 in extracellular fluids, however, has been recently associated to a signaling role. While some studies showed that HSP70 acts as signal to promote inflammation [19, 22, 23], other studies have suggested that it may play a protective role in response to tissue injury or inflammatory insults [24, 25, 26]. It has been shown the serum HSP70 levels may be considered an important biomarker of systemic stress and inflammatory processes, such as atherosclerosis, sepsis, chronic kidney disease and Duchenne muscular dystrophy [27, 28, 29, 30].

Our results demonstrated an increase in serum levels of HSP70 30 days after the induction of sepsis, in which period there was also an increase in serum carbonyl levels. Interestingly, the levels of both HSP70 and carbonyl groups in serum followed a time-course opposed to the profile of TNF- α secretion along the 30 days of recovery after CLP. This result indicated that the release of HSP70 to the extracellular environment and serum protein carbonylation are events that are related to sepsis but are not associated to the acute phase of inflammation, when systemic levels of proinflammatory cytokines such as TNF- α are elevated. It has been shown by *in vivo* and *in vitro* studies that protein carbonylation as well as HSP70 may be associated with early cognitive impairment in Alzheimer's disease and brain tumors [32, 33].

Previous studies demonstrated that the increase of carbonyl and HSP70 in the serum of septic patients is related to mortality [29] and significantly elevated levels of HSP70 were also found in post-mortem brain of sepsis patients and in resuscitated cardiac arrest patients [34]. Since HSP70 is important for cell homeostasis and tissue repair, several studies have been conducted to assess the role of HSP70 in the maintenance and repair of intracellular and extracellular protein damage. Because oxidative stress and HSP70 expression, activation, and

release are also affected and modulated at several degrees by infection, inflammation, water deprivation, and oxygen supply, it is not surprising that HSP70 release is regulated according to the oxidant status during sepsis [29].

The brain is particularly sensitive to oxidative damage, and presents decreased antioxidant capacity [35, 36]. Our results show changes in hippocampus immunocontent of HSP70, HMGB-1 and the cytokine TNF- α [16], in the rat animal model submitted to CLP, demonstrated that CNS oxidative stress is restricted to earlier times 12 to 96 hours after sepsis induction, differently from other organs involved in septic response, such as lung, liver, heart and kidney for longer times after sepsis induction [37, 16]. On the other hand, it has been shown that a substantial and persistent production of proinflammatory cytokines can significantly increase the risk and extent of brain injury [38]. It is known that cytokines are the main biomarkers of neuroinflammation in neuropathology and neurodegenerative processes in the brain [39, 40, 41].

Our data show a reduction in immunocontent of HSP70 and HMGB-1 in the brains of animals submitted to CLP compared to sham-operated in earlier periods (24 h and 14 days after CLP). HSP70 and other heat-shock proteins may play a role in the protection of the nervous system against cytotoxicity, decreasing the aggregation of soluble α -synuclein and avoiding pleomorphic effects on both innate and adaptive immunity, particularly when induced before severe ischemia [42, 43, 44]. HMGB1 is a ubiquitous nuclear protein that binds and bends DNA and facilitates transcription [45] and its release to the extracellular environment has been associated with cell necrosis/lysis. Necrotic cells in particular can release large amounts of HMGB1 and HSP70 [46, 47] that may result in high systemic levels of HMGB1 in patients with sepsis, ischemia, hemorrhagic shock and other conditions [48, 49, 50].

Extracellular HSP70 and HMGB1 may be passively released during necrosis but are also actively secreted from a variety of cells in response to inflammatory stimuli [51]. These proteins can interact with different receptors, including membrane proteins involved in the detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which nicely illustrates the convergence of the molecular mechanisms that are brought into action by both infection and trauma [51]. These agonists induce the production and secretion of proinflammatory cytokines, contributing to the inflammatory response, by different receptors controlling

common intracellular pathways. HMGB1 or HSP70 are specifically recognized by several cell surface receptors including receptor for advanced glycation end products (RAGE), Toll-like receptors (TLR4, TLR2), triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1), and CD24 [52]. The interaction between HSP70 and HMGB1 with these receptors activates NF- κ B in inflammatory responses and cell damage in neurologic disease [53].

In agreement with Gelain et al. [29], high levels of HSP70 were found in septic animals, but we also show that the content of HSP70 and HMGB1 in the hippocampus is downregulated, probably by the process of necrosis/lysis that occurs during the early stages of SIRS brain dysfunction, BBB undergoes structural changes which allow the infiltration of leukocytes [4].

The results show that in the hippocampus the reduction in the amount immunocontent may involve a cleaning mechanism CNS. According Yokoo et al. [55], elevated protein levels in cerebrospinal fluid are observed as notable feature of brain damage in patients with sepsis-associated delirium. Hence, we propose that, during sepsis, accelerated mediators inflammatory generation may occur in brains to mediate cerebrovascular endothelial cell injury and thus breakdown of BBB integrity, which could possibly lead to widespread neuronal degeneration, increased serum levels of HSP70 and HMGB1 such mechanism of clearance.

In conclusion, the animals CLP increased levels of TNF- α in serum and immunocontent in the hippocampus during acute phase of sepsis. The levels carbonyl, HSP70, and HMGB1 in the serum increased in the chronic phase of sepsis suggesting a late effect. In the brain early inflammation decrease the levels HSP70 and HMGB1 at 14 day after CLP probably for a downregulation effect dependent necrosis/lysis and secretion of proteins by glia and neurons.

References

1. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. (2000) Pathophysiology of septic encephalopathy: A review. *Crit Care Med*, 28:3019–3024.
2. Streck EL, Comim CM, Barichello T, Quevedo J. (2008) The Septic Brain. *Neurochem Res*. 33(11):2171–2177.
3. Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, Schäfers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT.(2008). Sepsis causes

- neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 5(38):1–10.
4. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufenbach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2011). Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res*. 36(2):304-11.
 5. Bosmann M, & Ward PA. (2012). The inflammatory response in sepsis. *Trends in immunology*, S1471-4906(12)00162-7.
 6. van den Boogaard M, Ramakers BP, van Alfen N, van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, Verbeek MM, Schoonhoven L, van der Hoeven JG, Pickkers P. (2010). Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Crit Care.*, 14(3), R81.
 7. Qin YH, Dai SM, Tang GS, Zhang J, Ren D, Wang ZW, Shen Q. (2009). HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.*, 183(10), 6244–50.
 8. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson K M, Srivastava PK. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*, 12(11), 1539–46.
 9. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS lett*, 581(19), 3689–94.
 10. Zhou J, Chen Y, Huang GQ, Li J, Wu GM, Liu L, Bai YP, Wang J. (2012). Hydrogen-rich saline reverses oxidative stress, cognitive impairment, and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *J Surg Res.*, 178(1), 390–400.
 11. Ritter C, Andrades M, Frota Júnior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klant F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F. (2003). Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.*, 29(10):1782-9
 12. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2010). Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.*, 17(3), 279–86.

13. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186:464-78.
14. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 7(72):248-54.
15. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2005). Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*, 33(1):221-3
16. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2006). Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 34(3):886-9.
17. Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufenbach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. (2011). Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.*, 36(2):304-11.
18. Tansey MG. (2010). Inflammation in neuropsychiatric disease. *Neurobiol Dis*. 37(3):491-2.
19. Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, Gelfo F, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L. (2012). A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *J Neuroinflammation*. 29;9:101.
20. Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, Shimazu T. (2011). Interleukin-1 β causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. 28;187:63-9.
21. Yamashima T. Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death. *J Neurochem*, 2012 Feb;120(4):477-94.
22. Asea A, Mallick R, Lechpammer S, Ara G, Teicher BA, Fiorentino S, Stevenson MA, Calderwood SK. (2001). Cyclooxygenase inhibitors are potent sensitizers of prostate tumours to hyperthermia and radiation. *Int J Hyperthermia*. 17(5):401-14.
23. Vabulas RM, Wagner H, Schild H. (2002). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* ;270:169-84.

24. Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. (2006). Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol.*, 177(10):7184-92.
25. Jo SK, Ko GJ, Boo CS, Cho WY, Kim HK. (2006). Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB mediated inflammation and on tubular cell injury. *J Am Soc Nephrol.* 17(11):3082-92.
26. El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, Nicolls MR. (2007). Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett.* 111(1):36-44.
27. Suzuki K, Peake J, Nosaka K, Okutsu M, Abbiss CR, Surriano R, Bishop D, Quod MJ, Lee H, Martin DT, Laursen PB. (2006) Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman Triathlon race. *Eur J Appl Physiol.* 98(6):525-34.
28. Dulin E, García-Barreno P, Guisasola MC. (2010). Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in a general population. *Cell Stress Chaperones.* 15(6):929-37
29. Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Moreira JC. (2011). Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*, 35(5):466-70.
30. Leberherz-Eichinger D, Ankersmit HJ, Hacker S, Hetz H, Kimberger O, Schmidt EM, Reiter T, Hörl WH, Haas M, Krenn CG, Roth GA. (2012) HSP27 and HSP70 serum and urine levels in patients suffering from chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 413(1-2):282-6.
31. De Paepe B, Creus KK, Martin JJ, De Bleecker JL. (2012). Upregulation of chemokines and their receptors in duchenne muscular dystrophy: potential for attenuation of myofiber necrosis. *Muscle Nerve.* 46(6):914-6.
32. Sultana R, Butterfield DA. (2009). Proteomics identification of carbonylated and HNE-bound brain proteins in Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol.* 566:123-35.
33. Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, Pairojkul C, Wongkham C, Sripa B, Khuntikeo N, Kawanishi S, Murata M. (2012). Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis for cholangiocarcinoma. *Free Radic Biol Med.* 52(8):1465-72.

34. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. (2007). Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett*, 581(19):3723-33.
35. Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. (2013) Caspase-3 Mediates In Part Hippocampal Apoptosis in Sepsis. *Mol Neurobiol*. 47(1):394-8.
36. Floyd RA. (1999) Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med*. 26(9-10):1346-55.
37. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. (2004). Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med*. 32(2):342-9.
38. Kuang G, He Q, Zhang Y, Zhuang R, Xiang A, Jiang Q, Luo Y, Yang J. (2012). Modulation of Preactivation of PPAR- β on Memory and Learning Dysfunction and Inflammatory Response in the Hippocampus in Rats Exposed to Global Cerebral Ischemia/Reperfusion. *PPAR Res*, 2012:209794.
39. Franzen R, Bouhy D, Schoenen J. (2004). Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'. *Neurosci Lett*. 361(1-3):76-8.
40. Cacquevel M, Lebeurrier N, Ch  enne S, Vivien D. (2004). Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*, 5(6):529-34.
41. Win-Shwe TT, Yanagisawa R, Koike E, Nitta H, Takano H. (2012). Expression levels of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after phthalate exposure. *J Appl Toxicol*.
42. Scornavacca G, Gesuete R, Orsini F, Pastorelli R, Fanelli R, de Simoni MG, Airoidi L. (2012). Proteomic analysis of mouse brain cortex identifies metabolic down-regulation as a general feature of ischemic pre-conditioning. *J Neurochem*, 122(6):1219-29.
43. Zhou Y, Gu G, Goodlett DR, Zhang T, Pan C, Montine TJ, Montine KS, Aebersold RH, Zhang J. (2004). Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics. *J Biol Chem*, 279(37):39155-64.
44. Axsen WS, Styer CM, Solnick JV. (2009). Inhibition of heat shock protein expression by *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog*, 47(4):231-6.

45. Hreggvidsdóttir HS, Lundberg AM, Aveberger AC, Klevenvall L, Andersson U, Harris HE. (2012). High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Mol Med.* 18:224-30.
46. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrighoni G, Bianchi ME. (2001). The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 152(6):1197-206.
47. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* , 81(1):15-27.
48. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, Lee DC, Ward MF, Bruchfeld AN, Wang H, Lesser ML, Church AL, Litroff AH, Sama AE, Tracey KJ. (2006). Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock.* 25(6):571-4.
49. van Zoelen MA, Laterre PF, van Veen SQ, van Till JW, Wittebole X, Bresser P, Tanck MW, Dugernier T, Ishizaka A, Boermeester MA, van der Poll T. (2007). Systemic and local high mobility group box 1 concentrations during severe infection. *Crit Care Med.* 35(12):2799-804.
50. Yang R, Harada T, Mollen KP, Prince JM, Levy RM, Englert JA, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Yang H, Tracey KJ, Harbrecht BG, Billiar TR, Fink MP. (2006). Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates gut barrier dysfunction and improves survival after hemorrhagic shock. *Mol Med*, 12(4-6):105-14.
51. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. (2012). PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, 249(1):158-75.
52. Aronowski J, Strong R, Kang HS, Grotta JC. (2000). Selective up-regulation of I kappaB-alpha in ischemic penumbra following focal cerebral ischemia. *Neuroreport*, 11(7):1529-33.

Figure Legends

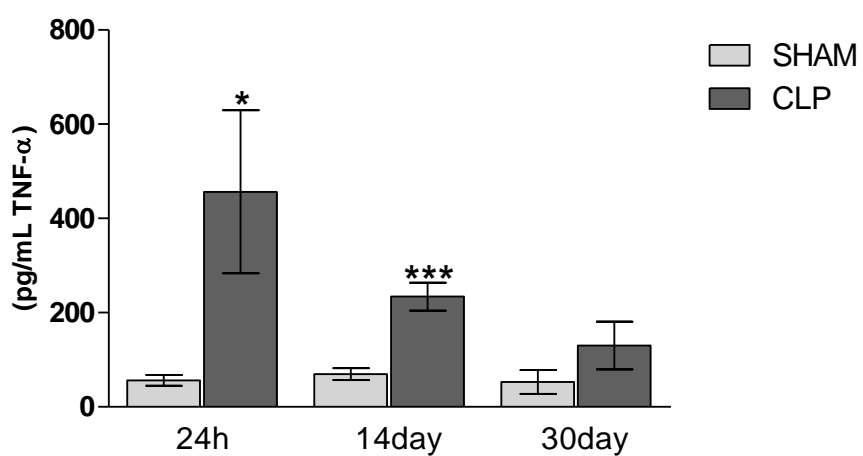
Figure 1: **Serum inflammatory and oxidative parameters.** Serum levels of TNF- α (A) and protein carbonyls (B) in animals submitted to CLP in the model time 24 hours, 14 days and 30 days. The graph shows mean \pm SEM (n=6). *Different from control, $p < 0.05$; **different from control ($p < 0.01$) and from *** different from control ($p < 0.001$).

Figure 2: **Serum levels of Hsp70 and HMGB1.** Serum levels of HSP70 (A) and HMGB1 (B) in animals submitted to CLP in the model time 24 hours, 14 days and 30 days. The graph shows mean \pm SEM (n=6). *Different from control, $p < 0.05$; **different from control ($p < 0.01$) and from *** different from control ($p < 0.001$).

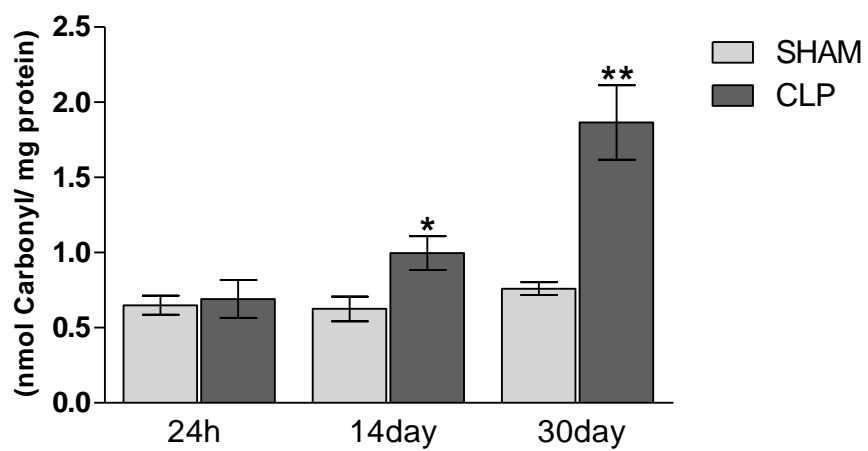
Figure 3: **Representative immunoblots of HSP70, HMGB1 and TNF- α immunocontent of hippocampus.** Heat shock protein 70, HMGB1 and TNF- α gel immunoblot in the period de 24 hour (A), 14 day (B) and 30 day (C) after CLP induction. Bars represent mean \pm SEM (n=6). *Different from control, $p < 0.05$; **different from control $p < 0.01$ and from ***different from control $p < 0.001$.

Figures

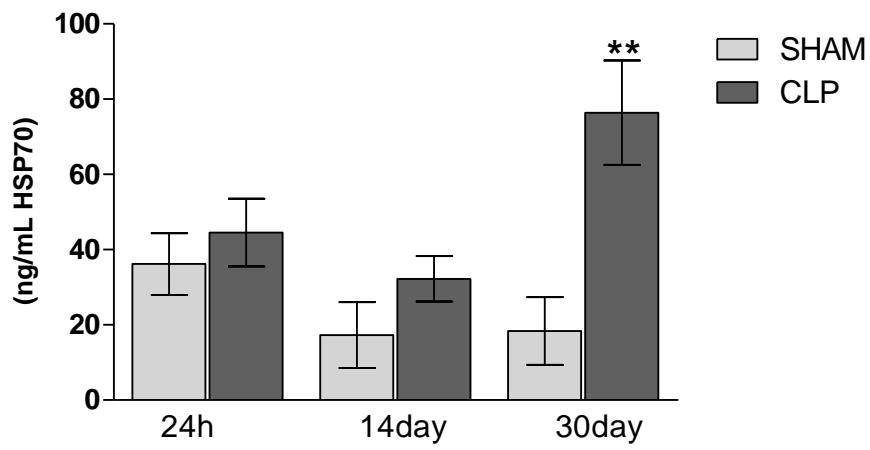
1- a)



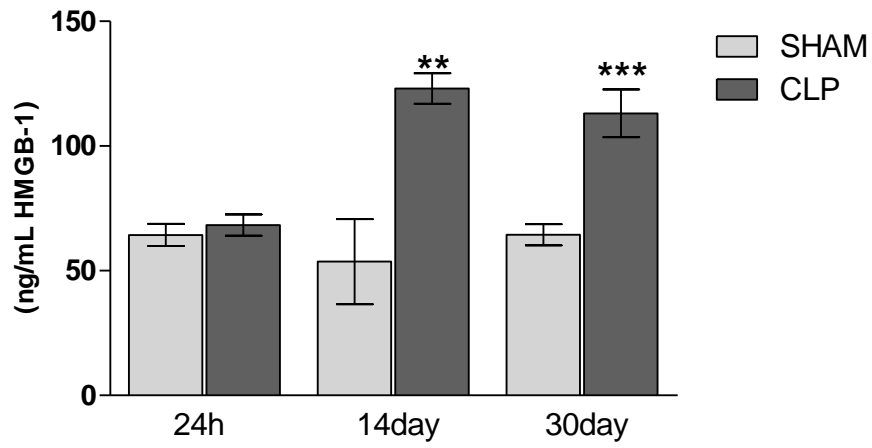
1-b)



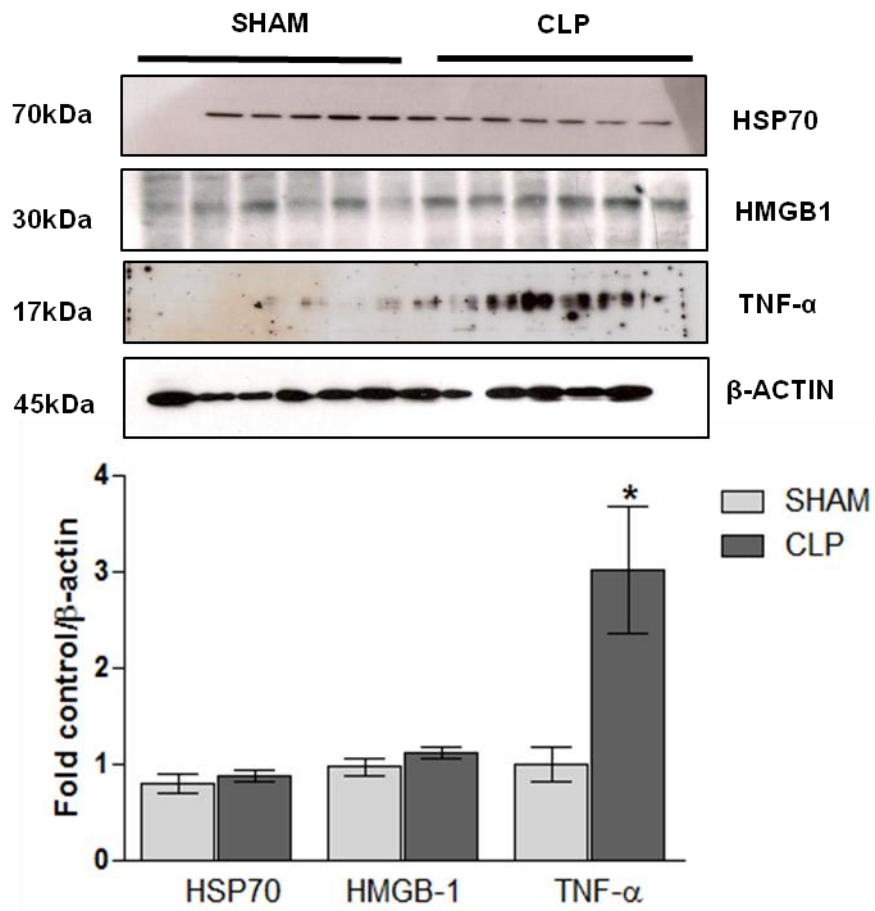
2-a)



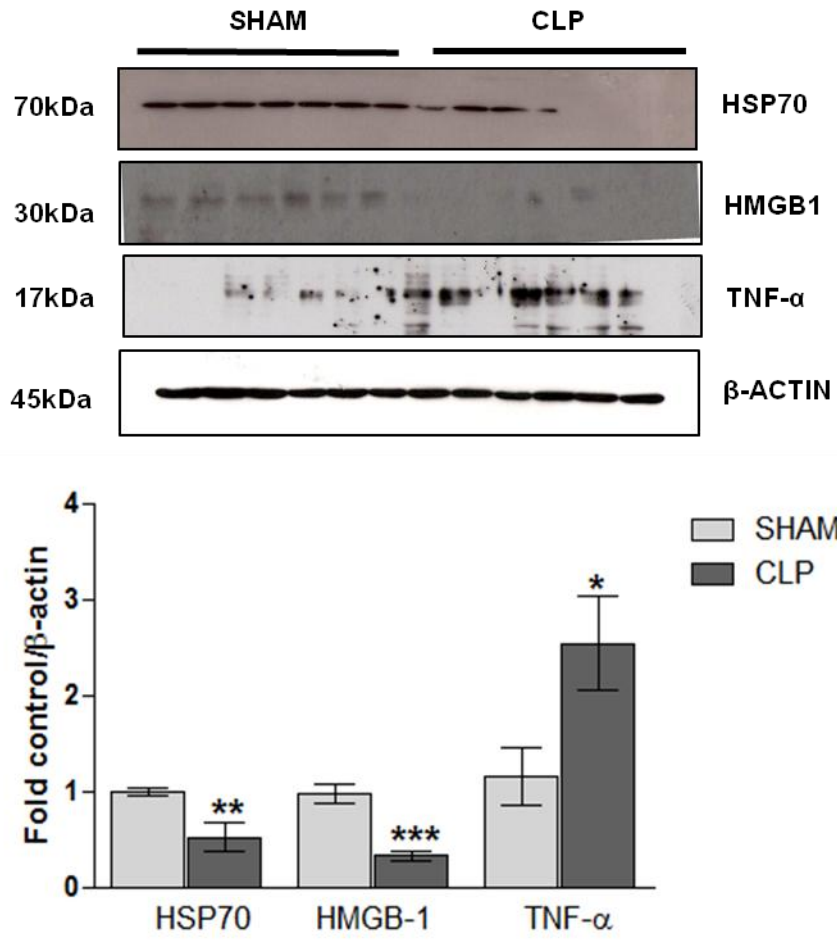
2-b)



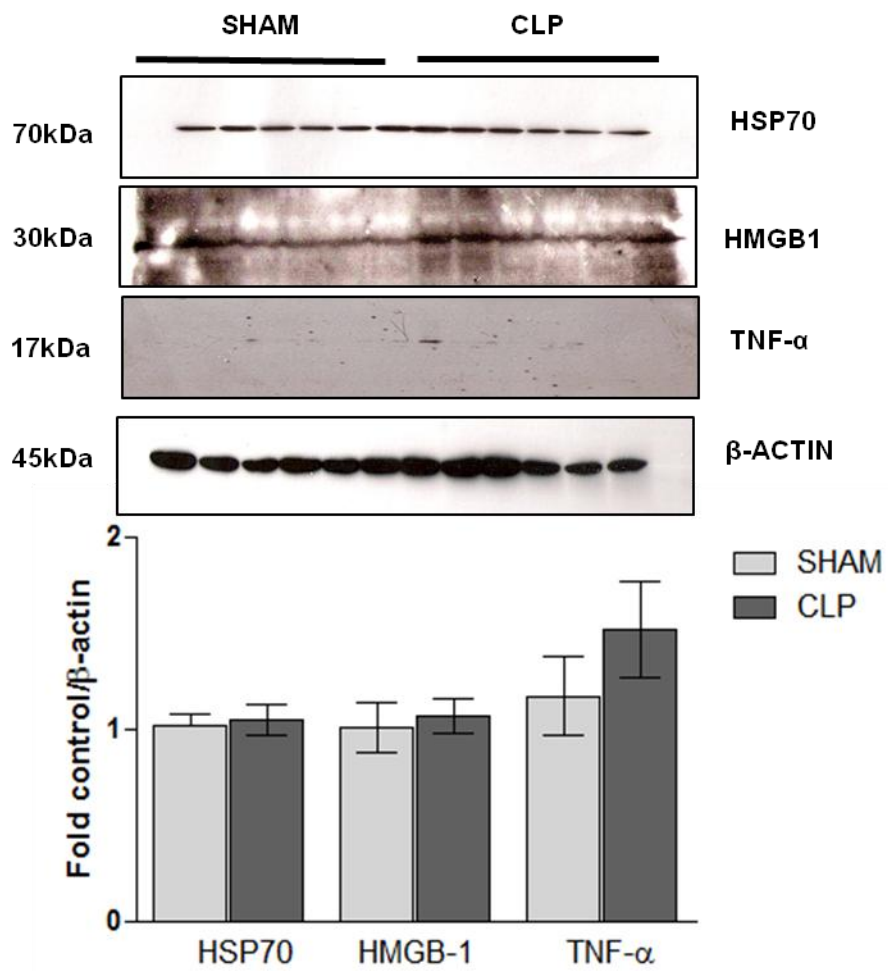
3-a)



3-b)



3-c)



Capítulo 2

Sepse Induz Alterações no Córtex de Ratos sem Modificar os Níveis de 3-Nitrotirosina e Carboximetil-lisina no Soro

Introdução

Como visto no Capítulo 1, a resposta inflamatória induzida pela sepse é um processo multifatorial e complexo. A fisiopatologia da sepse é acompanhada de alterações sistêmicas e locais, que irá afetar de forma distinta diferentes regiões por suas características celulares próprias. Essas alterações sistêmicas são acompanhadas por aumento na produção de espécies reativas, como o óxido nítrico (NO), que pode levar a nitração de proteínas (Beckman, 2001) ou a glicação (Semba et al., 2010), além de alterar o estado redox das proteínas por em suas ligações dissulfeto, que irão favorecer alterações funcionais e conformacionais, prejudicando assim a homeostase celular e tecidual. No sistema nervoso, os prejuízos são persistentes e levam a alterações cognitivas graves, muitas dessas alterações decorrente do aumento de estresse oxidativo e modificação na expressão de proteínas em outras regiões do cérebro.

Na tentativa de entender este questionamento, analisamos no soro dos animais sépticos a presença da 3-nitrotirosina e a carboximetil-lisina (CML), ambos marcadores de danos a biomoléculas, principalmente proteínas. Como mostrado no capítulo 1, no soro dos animais sépticos observamos uma alteração nos níveis de carbonilação proteica, que sinaliza alterações em sua estrutura química. Assim, na tentativa de verificar o estado redox do soro analisamos o conteúdo de grupamentos sulfidrilas. Sabe-se que animais submetidos ao modelo de CLP apresentam redução nos níveis de aprendizado e memória, funções cerebrais que envolvem diversas

regiões do cérebro, como hipocampo e córtex. Desse modo, alterações no imunoconteúdo das proteínas HSP70 e HMGB1 sugere uma relação entre as regiões e as perdas cognitivas observada em outros trabalhos (Barrichelo et al., 2005).

Material e Métodos

Conteúdo Total de Tióis

Analizamos os soros dos animais para verificamos o conteúdo de tióis, como uma estimativa de alterações oxidativa em proteínas. De acordo com Ellman (1959), uma alíquota de da amostra de soro foi diluída em PBS. Então, 0,01 M 5,5´ditiobis (2 ácido nitro-benzóico) (DTNB) em etanol foi adicionado, gerando um derivado de coloração amarela e lido espectrofotometricamente a 412 nm após 60min.

Dosagem da 3-nitrotirosina e a carboximetil-lisina séricos

Para analisarmos as alterações proteicas do soro, realizamos a técnica de ELISA indireta. O ELISA indireto foi realizado utilizando anticorpos policlonal para 3-nitrotirosina (1:3000) Abcam[®] e carboximetil-lisina (1:2500) (2G11) em tampão carbonato 0,5M pH 9,6. Depois da adição do substrato, as amostras foram lidas em 450nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

Imunocconteúdo de HSP70 e HMGB1 no córtex por western blotting

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e eletrotransferida para membrana de nitrocelulose. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo

primário (anti-HSP70 1:1000, Cell Signaling®; anti-HMGB1 1:1000, Santa Cruz®). As bandas quimioluminescentes foram detectadas usando filmes de raios-X.

Análise Estatística

Os resultados serão apresentados como média \pm erro-padrão e teste t para avaliar as diferenças entre os grupos.

Resultados e Discussão

Danos a proteínas são responsáveis por diversas alterações fisiológicas, reduzindo e/ou eliminando sua funcionalidade. Observamos um aumento nos níveis séricos de proteínas carboniladas no capítulo 1, sugerindo efeitos deletérios por esse aumento (Zeng & Davies, 2006). Ao analisamos o níveis de grupamentos sulfidrilas no soro dos animais, não observamos alterações entre os animais controle e os sépticos os diferentes tempos (figura 1), sugerido que as alterações induzidas pelo modelo de CLP não afeta os níveis de sulfidrilas livres. Os grupamentos sulfidrilas são marcadores redox que refletem o estado oxidativo de proteínas.

Além das alterações estruturais decorrente da oxidação de grupamentos sulfidrilas nas proteínas, podem ocorrer modificações como a glicação, resultante da auto-oxidação da glicose, e/ou nitração de resíduos de tirosinas, resultante do aumento de NO durante a inflamação, desencadeando o aumento de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e proteínas nitradas (Baynes, 1991). Nas amostras de soro analisadas não detectamos diferenças entre os grupos analisados (figura 2), para 3-nitrotirosina e carboximetil-lisina. Durante a sepse e doenças inflamatórias crônicas como o diabetes, apresentam aumento na produção de NO, que é responsável pelos efeitos vasodilatadores observados durante a inflamação. E o

produto derivado das interações entre NO e anion superóxido responsável pelas alterações em diversas proteínas.

Durante a sepse diferentes mecanismos são ativados como forma de controlar o processo infeccioso e favorecer o processo de cura. Entretanto, a ativação excessiva e descontrolada induz o aumento de danos teciduais e sistêmicos. Durante as alterações iniciais induzidas pela sepse o cérebro sofre diversas modificações redox e morfológicas, tais mudanças aumentam os danos celulares que resultam em perda de função. Analisamos no córtex as diferenças no imunoconteúdo de HSP70 e HMGB1, proteínas responsáveis pela manutenção estrutural de outras proteínas e estabilidade do DNA celular. Ao analisarmos o imunoconteúdo de HSP70 e HMGB1, encontramos uma redução em ambas as proteínas no décimo quarto dia no grupo CLP (figura 3), perfil semelhante ao do hipocampo, como demonstrado no capítulo 1.

Referências

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med.* v.33, n.7, p.1671, 2005.

Beckman JS. -OONO: rebounding from nitric oxide. *Circ Res.* v.89, n.4, p.295-7, 2001.

Ellman GL, Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, v.82, p.70-77, 1959.

Semba RD, Beck J, Sun K, Egan JM, Carlson OD, Varadhan R, Ferrucci L. Relationship of a dominant advanced glycation end product, serum carboxymethyllysine, and abnormal glucose metabolism in adults: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Nutr Health Aging.* v.14, n.7, p.507-13, 2010.

Zeng J, Davies MJ. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem Res Toxicol.* v.19, n.12, p.1668-76, 2006.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* v.40, n.4, p.405-12 1991.

Legenda das Figuras

Figura 1. Determinação do conteúdo de sulfidrilas no soro dos animais CLP e sham.

Os dados representam média \pm desvio padrão.

Figura 2. Determinação do conteúdo de 3-nitrotirosina (A) e carboximetil-lisa (B) no soro dos animais CLP e sham. Os dados foram expressos em porcentagem do controle.

Figura 3. Imunoconteúdo representativo de HSP70 e HMGB1 no córtex de animais CLP e sham em 24 horas (A), 14 dias (B) e 30 dias (C). Os dados ponderados por β -actina, representando média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$).

Figuras

Figura 1)

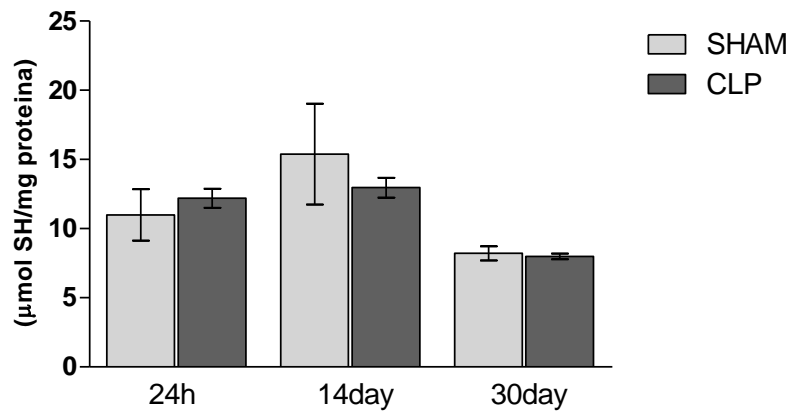


Figura 2-A)

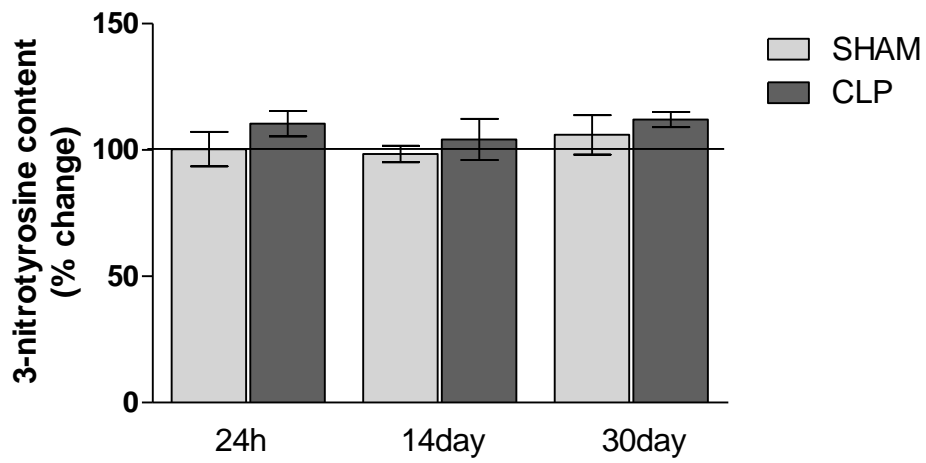


Figura 2-B)

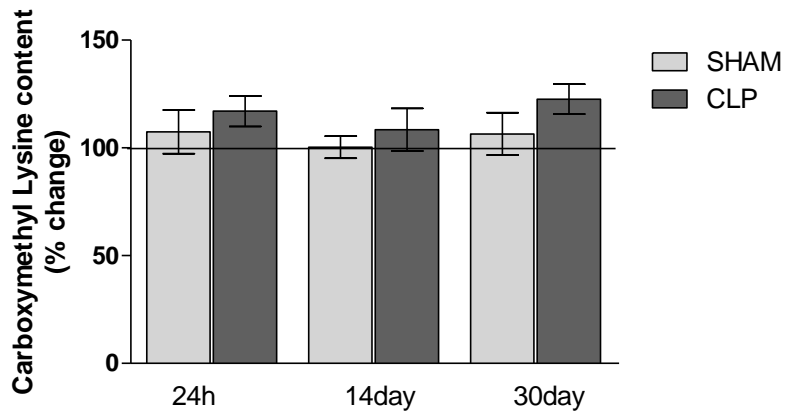


Figura 3-A)

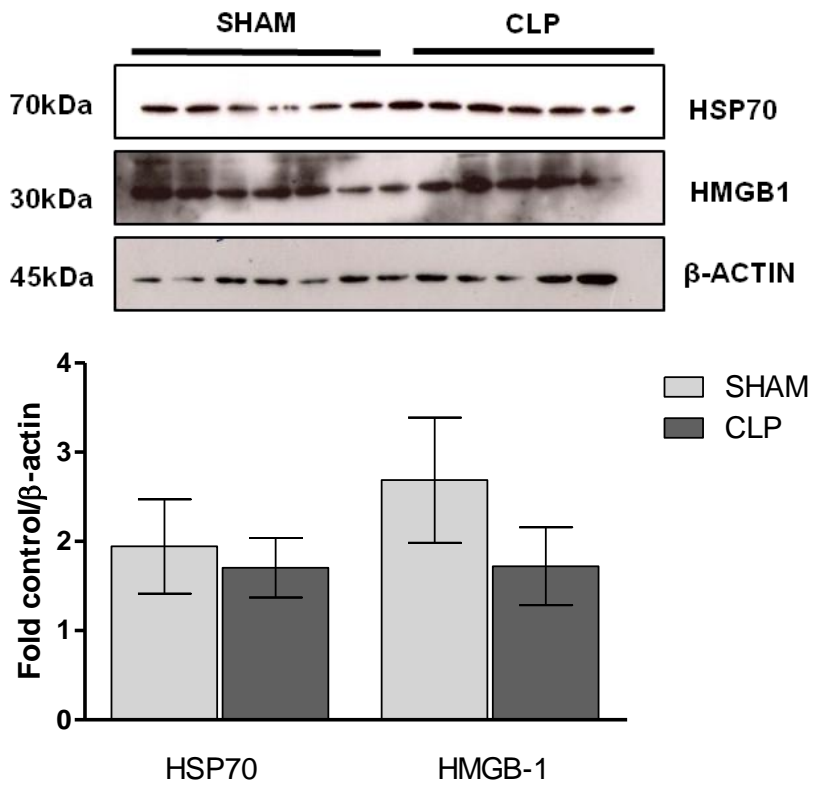


Figura 3-B)

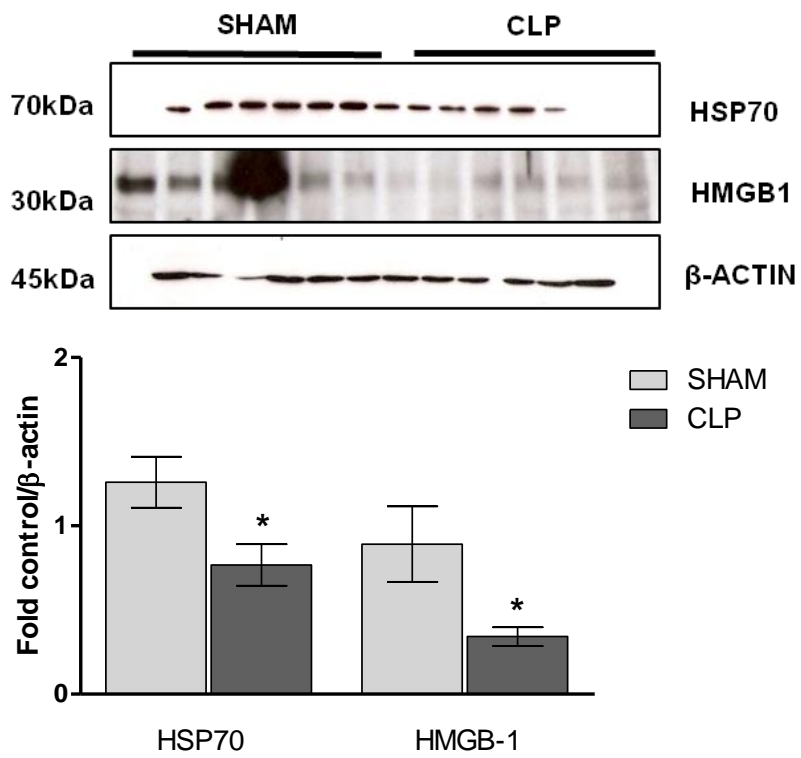
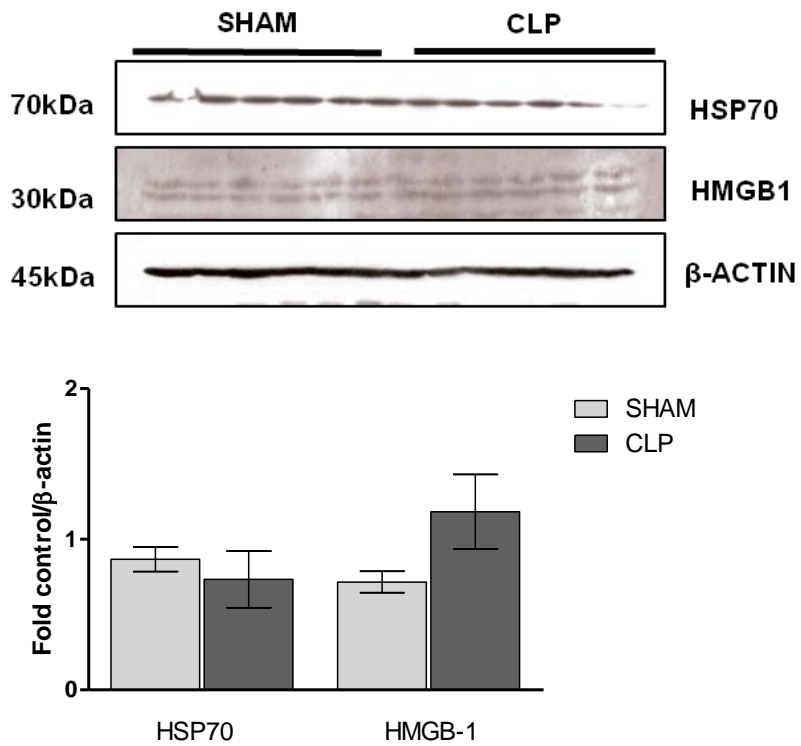


Figura - 3C)



PARTE III

Discussão

Os resultados demonstrados neste trabalho referiram-se as alterações inflamatórias no cérebro provocado pela indução do modelo de CLP em ratos Wistar. Observamos que o processo inflamatório induzido pelo modelo alterou os níveis séricos e teciduais de TNF- α , HSP70 e HMGB1. Deste modo, consideramos que as alterações nestas proteínas revelam um possível direcionamento em relação ao desfecho da sepse e do *delirium* associado à sepse.

Durante a sepse, um conjunto complexo de eventos envolvendo a sinalização iniciado pelo agente infeccioso e posterior ação dos mediadores inflamatórios, aumentam a produção de diversos marcadores inflamatórios. Assim, quantificamos a produção de TNF- α no soro, um mediador inicial do sistema imune, pelos efeitos sinalizadores durante a ativação, migração e diferenciação de leucócitos (Novotny et al., 2012). Neste processo, a produção excessiva de mediadores inflamatórios e químicos leva a modificações locais e sistêmicas decorrente da vasodilatação excessiva, infiltração celular e produção acentuada de ERON por macrófagos, podendo levar a perda da função e até a morte (Papadopoulos et al., 2000). No SNC a sinalização inflamatória ocasiona a disrupção da BHE, permitindo a infiltração de leucócitos e o aumento dos níveis de mediadores tóxicos ao cérebro, resultando em lesão e morte neural (Comim et al, 2011). Estudos anteriores têm mostrado a influência do estresse oxidativo e a redução na função mitocondrial como fatores cruciais para alterações neurológicas e cognitivas observadas na clinica e em modelos animais (Barichello et al., 2006; Comim et al., 2011). Ainda, níveis alterados

de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteínas carboniladas, foram observado em amostras de soro de pacientes sépticos (Gelain et al., 2011).

Diversas proteínas têm sido descritas por sua parcial ou completa inativação pela ação de ERON durante a sepse, sugerindo que o dano oxidativo em proteínas possui um papel importante durante essa condição (Wood et al., 2005; Vogt, 1995). A resposta ao estresse e alterações estruturais em proteínas envolve a indução de HSPs, uma família de proteínas que agem como chaperonas moleculares, ajudando no dobramento, transporte e estabilização proteica (Khalil et al., 2011; Sarkar et al., 2012). Tanto a HSP70 como a HMGB1 exibem uma possível importância na patogênese da sepse, já que podem ser liberadas no meio extracelular, mediando o processo inflamatório decorrente (Gupta et al., 2012; Hreggvidsdóttir et al., 2012). Embora, modelos *in vivo* e *in vitro* apontem a existência de uma relação entre a HSP70 e a sepse, nenhuma observação clínica estabeleceu uma correlação direta entre a modulação HSP70 e proteção contra choque séptico (Gelain et al., 2011; Bruemmer-Smith et al., 2001). Em nossos resultados encontramos um aumento de HSP70 no soro 30 dias após a indução da CLP, correspondendo ao período com aumento dos níveis de proteínas oxidadas (14 e 30 dias), segundo Gelain et al., (2011) os níveis séricos de HSP70 são modulados de acordo com o estado oxidante do soro, e os resultados presentes estão de acordo com essa observação.

Semelhante a HSP70, a liberação de HMGB1 ocorre durante a sepse, sendo encontrada em altos níveis em amostras de pacientes não sobreviventes (Wang et al., 1999). Sua liberação ocorre por meio de secreção ativa ou extravazamento de células danificadas, podendo ser liberada por diversas células imunocompetentes (Hreggvidsdóttir et al., 2012). Em nosso estudo, observamos um aumento nos níveis

séricos da HMGB1 a partir do 14º dia após a CLP, sugerindo uma liberação tardia comparada ao TNF- α , entretanto a HMGB1 comporta-se como uma citocina, estimulando e liberando numerosas citocinas pró-inflamatórias por monócitos, embora esta propriedade tenha recentemente sido questionada (Adib-Conquy & Cavaillon, 2007). Recentemente, evidências sugerem que a capacidade de estimulação de citocinas pela HMGB1 é dependente do estado redox do meio, explicando assim os efeitos variáveis observados (Antoine et al., 2010; Kazama et al., 2008), apoiando o aumento observado nos níveis séricos dos animais sépticos.

Estudos clínicos e experimentais têm descrito diversas alterações observadas durante a sepse, que inclui geração de citocinas pró-inflamatórias, danos a microcirculação cerebral, desbalanço de neurotransmissores e produção de ERON que resultam em disfunção em órgãos periféricos e o desenvolvimento do *delirium* associado à sepse (Semmler et al., 2008). Segundo Papadopoulos et al. (2000), o *delirium* associado à sepse surge da ação de mediadores inflamatórios no cérebro, ou de sua ação citotóxica a células do SNC, já que o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados pela sepse, como observado em humanos e modelos animais (Freedman et al., 2001; Barichello et al., 2006). No intuito de avaliar as alterações induzidas pela sepse, analisamos a expressão de HSP70, HMGB1 e TNF- α no cérebro, pelas alterações observadas envolvendo a aprendizagem, cognição e memória (Chen et al., 2008). Observamos que ambas as proteínas HSP70 e HMGB1 tiveram redução significativa do imunoconteúdo no período de 14 dias após a indução da CLP, resultado controverso, visto que durante a inflamação sistêmica a indução da HSP70 protege as células da citotoxicidade do TNF- α (Schroeder et al., 1999).

Entretanto, evidências apontam em uma regulação negativa da expressão de HSP70 durante o estresse e processos inflamatórios crônicos. Recentemente, estudos demonstraram que durante as infecções por *Helicobacter pylori* ocorre uma redução na síntese de HSP70 nas células epiteliais gástricas, efeito decorrente da inativação do fator de choque térmico-1 (HSF-1) (Liu et al., 2011). Do mesmo modo, durante o estresse crônico a expressão de HSP70 é diminuída em resposta a repressão da transcrição do gene choque térmico (Shi et al., 1998).

Assim, nossos resultados demonstram que os animais CLP tiveram uma redução significativa em seus mecanismos de manutenção de celular dependente de HSP70, sugerindo uma provável relação entre a redução de HSP70 e as alterações cognitivas observadas em humanos e modelos animais de sepse. De acordo com Comim et al., (2012), na sepse ocorre um aumento de apoptose no giro dentado do hipocampo, visto que a HSP70 interage diretamente com diferentes proteínas que regulam o maquinário de morte programada, assim bloqueando o processo de apoptose em diferentes alvos (Li et al., 2011) e justificando o aumento significativo de apoptose no giro dentado do hipocampo e redução do imunoconteúdo de HSP70.

Igualmente, a HMGB1 em condições fisiológicas possui diversas funções intracelulares, que incluem a estabilização da estrutura nucleosomal e a facilitação da transcrição gênica (Bustin, 1999). Em condições patológicas é ativamente secretada por células mononucleares ou liberada por células necróticas no meio extracelular, podendo ativar uma resposta inflamatório, servindo como mediador tardio de inflamações sistêmicas (Kim et al., 2006; Yang et al., 2005).

No meio extracelular, a HMGB1 pode interagir com o RAGE ativando várias rotas de sinalização intracelular, incluindo o fator de transcrição NF- κ B, proteínas da família de cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e moléculas de adesão (Sparvero et al., 2009). Recentemente, a ativação do NF- κ B tem sido apontada como um fator chave na resposta celular em lesões neurais *in vitro* e *in vivo*, e tem-se sugerido que uma inibição na expressão da HMGB1 induzida pela ativação do NF- κ B aumentaria o efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral (Wang et al., 2010).

No processo inflamatório a produção excessiva de ERONs desencadeia diversas reações não enzimáticas que levam a modificações a proteínas, reduzindo as propriedades funcionais das proteínas. As carbonilações aumentadas de proteínas resultam, subsequentemente, no aumento de AGEs, cujos efeitos deletérios já foram demonstrados (Miyata & Kurokawa, 1999). A ativação dos neutrófilos, monócitos e macrófagos durante a sepse pelo estímulo inflamatório, aumentam a produção de mieloperoxidases e NADPH oxidase, favorecendo a formação de AGEs por meio da oxidação de aminoácidos (Huebschmann et al., 2006).

Dados experimentais e clínicos têm associado à sepse ao aumento na produção de ROS, decorrente de uma disfunção mitocondrial pela redução da cadeia respiratória mitocondrial (Comim et al., 2008). A disfunção aumenta a produção do ânion superóxido que combinado com o óxido nítrico formado durante a resposta inflamatória da sepse produz o ânion peroxinitrito (Seija et al., 2012). Embora nossos resultados no soro não tenham demonstrado alterações nos níveis séricos desses marcadores, o aumento na quantidade de proteínas carboniladas poderia sugerir que o aumento nos níveis de HSP70 extracelular seria parte da

resposta de chaperona dessa proteína ao dano oxidativo de proteínas no soro, sendo a sinalização pró-inflamatória uma decorrência da exacerbação dessa resposta.

Conclusões

Nossos resultados indicam que o modelo de ligação cecal e punção induz mudanças claras no perfil inflamatório dos animais submetidos ao modelo, aumentando os níveis de TNF- α e níveis de proteínas carboniladas. Ainda, observamos um aumento nos níveis séricos de HSP70 e HMGB1, possivelmente responsável pelos efeitos inflamatórios em longo prazo. Entretanto, no cérebro a expressão dessas proteínas mostrou-se diminuída, um perfil diferente do observado no soro.

Referências

Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett.* v.581, n.19, p.3723-33, 2007.

Adrie C, Richter C, Bachelet M, Banzet N, François D, Dinh-Xuan AT, Dhainaut JF, Polla BS, Richard MJ. Contrasting effects of NO and peroxynitrites on HSP70 expression and apoptosis in human monocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* v.279, n.2, p452-60, 2000.

Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* v.29, n.7, p.S109-16, 2001.

Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Laverty H, Park BK. Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. *Mol Med.* v.16, n.11-12, p.479-90, 2010.

Araújo CV, Estado V, Tibiriçá E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res.* v.84, n.2, p.218-21, 2012.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* v.6, n.4, p.435-42, 2000.

Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* v.34, n.3, p.886-9, 2006.

Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr Med Chem.* v.11, n.3, p.359-68, 2004.

Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* v.27, n.12, p.1835-41, 2001.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* v.4, n.10, p.854-65, 2005.

Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* v.19, n.8, p.5237-46, 1999.

Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* v.1113, p.28-39, 2007.

Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun.* v.22, n.3, p.301-11, 2008.

Chen Y, Voegeli TS, Liu PP, Noble EG, Currie RW. Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets.* v.6. n.2, p.91-100, 2007.

Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* v.20, n.4, p.345-52, 2007.

Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, Ritter C, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion.* v.8, n.4, p.313-8, 2008.

Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Petronilho F, Souza B, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in the septic brain. *Curr Neurovasc Res.* v.6, p.194–203, 2009.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufenbach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* v.36, n.2, p.304-11, 2011.

Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, da Rocha JL, Teixeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* v.37, n.4, p.711-8, 2011.

Comim CM, Barichello T, Grandgirard D, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Leib SL. Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. *Mol Neurobiol.* v.47, n.1, p.394-8, 2013.

Csermely P, Söti C, Blatch GL. Chaperones as parts of cellular networks. *Adv Exp Med Biol.* v.594, p.55-63, 2007.

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* v.19, n.4, p.198-208, 2011.

Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis.* v.36, n.10, p.1259-65, 2003.

Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* v.174, n.12, p.7506-15, 2005.

Freedman NS, Gazendam J, Levan L, Pack AI, Schwab RJ. Abnormal sleep/wake cycles and the effect of environmental noise on sleep disruption in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med.* v.163, n.2, p.451-7, 2001.

Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, M Comim C, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock.* v.35, n.5, p.466-70, 2011.

Gemma C. Neuroimmunomodulation and Aging. *Aging Dis.* v.1. n.3, p.169-172, 2010.

Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, Sapolsky R, Steinberg G, Hu B, Yenari MA. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol.* v.207, n.18, p.3213-20, 2004 .

Goris RJ. Mediators of multiple organ failure. *Intensive Care Med.* v.16, n. Suppl 3, p.S192-6, 1990.

Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit. Care Med.* v.8, p.91–98, 2004.

Gullo A, Iscra F, Di Capua G, Berlot G, Lucangelo U, Chierigo ML, Ristagno G, Peratoner A, Fasiolo S, Consales C, De Martino G, Tufano R. Sepsis and organ dysfunction: an ongoing challenge. *Minerva Anesthesiol.* v.71, n.11, p.671-99, 2005.

Gupta A, Cooper ZA, Tulapurkar ME, Potla R, Maity T, Hasday JD, Singh IS. Toll-like Receptor Agonists and Febrile Range Hyperthermia Synergize to Induce Heat Shock Protein 70 Expression and Extracellular Release. *J Biol Chem.* v.288, n.4, p.2756-66, 2013.

Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol.* v.66, p.101-95, 1997.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* v.295, n.5561, p.1852-8, 2002.

Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest*. v.124, n.3, p.1103-15, 2003.

Hreggvidsdóttir HS, Lundberg AM, Aveberger AC, Klevenvall L, Andersson U, Harris HE. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Mol Med*. v.27, v.18, p.224-30, 2012 .

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. v.29, n.6, p.1420-32, 2006.

Ishida A, Ohno K, Fukushima K, Nakashima K, Takahashi M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. *J Vet Med Sci*. v.73, n.9, p.1127-32, 2011.

Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. v.304, n.16, p.1787-94, 2010.

Jacob A, Brorson JR, Alexander JJ. Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochem Int*. v.58, n.4, p.472-6, 2011.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. v.20, p.197-216, 2002.

Sales Jr JAL, David CM, Hatum R, Souza PCS P, Japiassú A, Pinheiro CTS, Friedman G, Silva OB, Dias MD, Koterba E, Dias FS, Piras C, Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB, Luiz RR. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *RBTI*. v.18, p.9-17, 2006.

Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*. v.79, n.3, p.425-34, 2006.

Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*. v.29, n.1, p.21-32, 2008.

Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta*. v.2, p.89-104, 2011.

Kiang JG. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res*. v.14, n.6, p.450-9, 2004.

- Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, Lee JK. HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci.* v.26, n.24, p.6413-21, 2006.
- Koch T. Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *Kidney Int Suppl.* v.64, p.S66-9, 1998.
- Kuniyasu H, Yano S, Sasaki T, Sasahira T, Sone S, Ohmori H. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphoterin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am J Pathol.* v.166, n.3, p.751-60, 2005.
- Lehner T, Wang Y, Whittall T, McGowan E, Kelly CG, Singh M. Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem Soc Trans.* v.32, n. 4, p.629-32, 2004.
- Li Y, Kang X, Wang Q. HSP70 decreases receptor-dependent phosphorylation of Smad2 and blocks TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *J Genet Genomics.* v.38, n.3, p111-6, 2011.
- Liu W, Chen Y, Lu G, Sun L, Si J. Down-regulation of HSP70 sensitizes gastric epithelial cells to apoptosis and growth retardation triggered by *H. pylori*. *BMC Gastroenterol.* v.11, p.146, 2011.
- Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* v.5, n.4, p.331-42, 2005.
- Maini RN. A perspective on anti-cytokine and anti-T cell-directed therapies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* v.13, n. Suppl 12, p.S35-40, 1995.
- Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gérard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol.* v. 24, n.5, p.1167-71, 1994.
- Marshall JC, Deitch C, Moldawer LL, Opal S, Redl H, Van der Poll T: Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock.* v.24, n.1, p.6, 2005.
- Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of proteins by autoxidation products of carbohydrates and lipids in uremia. *Int J Artif Organs.* v.22, n.4, p.195-8, 1999.
- Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Sepsis-theory and therapies. *N Engl J Med.* v.348, n.16, p.1600-2, 2003.

- Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, Holzmann B. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*. v.217, n.6, p.616-21, 2012
- Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma*. v.48, n.5, p.932-7, 2000.
- O'Brien JM Jr, Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. *Am J Med*. v.120, n.12, p.1012-22, 2007.
- Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet*. v.354, n.9188, p.1446-7, 1999.
- Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. v.28, n.8, p.3019-24, 2000.
- Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med*. v.28, n.2, p.537-49, 2000.
- Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. v.20, n.2, p.87-103, 2010.
- Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA*. v.274, n.4, p.338-45, 1995.
- Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. v.22, n.3, p.283-7, 2009.
- Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA*. v.277n.13, p.1058-63, 1997.
- Remick DG, Garg SJ, Newcomb DE, Wollenberg G, Huie TK, Bolgos GL. Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit Care Med*. v.26, n.5, p.895-904, 1998.
- Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*. v.23, n.12, p.618-25, 2000.
- Salles MJ, Sprovieri SR, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto SL, Azevedo PR, Silva TM, Golin V. Systemic inflammatory response syndrome/sepsis--review and

terminology and physiopathology study. *Rev Assoc Med Bras.* v.45, n.1, p.86-92, 1999.

Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med.* v.33, n.9, p.1173-85, 2002.

Sarkar R, Mukherjee S, Biswas J, Roy M. Sulphoraphane, a naturally occurring isothiocyanate induces apoptosis in breast cancer cells by targeting heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* v.427, n.1, p.80-5, 2012.

Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med.* v.168, n.4, p.476-80, 2003.

Schlichting D, McCollam JS. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat. *South Med J.* v.100, n.6, p.594-600, 2007.

Schroeder S, Lindemann C, Hoefft A, Putensen C, Decker D, von Ruecker AA, Stüber F. Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* v.27, n.6, p.1080-4, 1999.

Seija M, Baccino C, Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Granados R, Ferruelo A, Martínez-Caro L, Ruíz-Cabello J, de Paula M, Noboa O, Esteban A, Lorente JA. Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock.* v.38, n.4, p.403-10, 2012.

Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, Schäfers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation.* v.5, n.38, 2008.

Sharshar T, Polito A, Checinski A, Stevens RD. Septic-associated encephalopathy--everything starts at a microlevel. *Crit Care.* v.14, n.5, p.199, 2010.

Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* v.12, n.5, p.654-66, 1998.

Sikora JP, Chlebna-Sokół D, Krzyżańska-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* v.49, n.5, p.399-404, 2001.

Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation

Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med.* v.7, n.17, 2009.

Tang D, Lotze MT. Tumor immunity times out: TIM-3 and HMGB1. *Nat Immunol.* v.13, n.9, p.808-10, 2012.

Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* v.48, n.4, p.971-81, 2003.

Todryk SM, Gough MJ, Pockley AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology.* v.110, n.1, p.1-9, 2003.

van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL, Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol.* v.155, n.11, p.5397-401, 1995.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* v.10, p.411-52, 1992.

Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun.* v.70, n.3, p.1033-41, 2002.

Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* v.18, n.1, p.93-105, 1995.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* v.285, n.5425, p.248-51, 1999.

Wang L, Zhang X, Liu L, Yang R, Cui L, Li M. Atorvastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors (RAGE and TLR4), NF-kappaB expression. *Neurosci Lett.* v.471, n.3, p.152-6, 2010.

Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J Immunol.* v.169, n.5, p.2422-9, 2002.

Wesemann DR, Benveniste EN. STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex. *J Immunol.* v.171, n.10, p.5313-9, 2003.

Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet*. v.349, n.9069, p.1912-3, 1997.

Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Kellie S, Bird IN, Varndell IM, Sheppard PW, Everall I, Anderton BH. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J. Neurosci*. v.22, p.10-20, 2002.

Wilson JX, Young GB. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci*. v.30, n.2, p.98–105, 2003.

Wood MJ, Helena Prieto J, Komives EA. Structural and functional consequences of methionine oxidation in thrombomodulin. *Biochim Biophys Acta*. v.1703, n.2, p.141-7, 2005.

Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today*. v.5, n.12, p.525-31, 1999.