

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

NAUANA SOMENSI

**ESTUDO DA AÇÃO DA PROTEÍNA HSP70 EXTRACELULAR SOBRE O RECEPTOR
PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM MODELO
CELULAR**

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO DA AÇÃO DA PROTEÍNA HSP70 EXTRACELULAR SOBRE O RECEPTOR
PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM MODELO
CELULAR**

Aluna: Nauana Somensi

Orientador: Professor Dr. Daniel Pens Gelain

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título em Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular

Porto Alegre

2014

NAUANA SOMENSI

**ESTUDO DA AÇÃO DA PROTEÍNA HSP70 EXTRACELULAR SOBRE O RECEPTOR
PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM MODELO
CELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da UFRGS em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título em Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Biotecnologia Molecular

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Guido Lenz
Departamento de Biofísica - UFRGS

Prof. Dr. Rogério Margis
Departamento de Biofísica – UFRGS

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Porto Alegre

2014

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela formação proporcionada durante estes quatro anos, que excedeu as salas de aula.

À minha família, por se fazer sempre presente mesmo longe. Obrigada pelo apoio, amor e dedicação.

Ao meu companheiro Maurilio, pelo carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos, inclusive nos de realização deste trabalho.

Ao meu professor e orientador Daniel, por confiar a mim este projeto. Obrigada pela atenção e auxílio durante todo este período, no qual sempre me proporcionou a liberdade de criar, errar, aprender... Enfim, pesquisar

A todos os colegas do laboratório 32, por me ensinarem que “fazer ciência” vai muito além do trabalho na bancada. Ao Alfeu, por me auxiliar com o silenciamento, e especialmente ao Juciano, por sempre ter tido paciência e me ensinado praticamente todas as técnicas que precisei para a realização deste trabalho.

Às amigas que tive o privilégio de conviver durante estes anos em Porto Alegre, por sempre estarem por perto de alguma forma, fazendo-me reavaliar o conceito de amizade.

Aos que aqui não citei, porém não esqueci, também fica a minha gratidão.

Resumo

A sepse é uma síndrome complexa, disparada pela infecção microbiana causada por um patógeno e é induzida pela ativação progressiva e sistêmica de múltiplas vias de respostas inflamatórias, resultando na disfunção aguda de alguns órgãos e culminando em falência múltipla. Pacientes sépticos apresentam uma alta taxa de ativação de macrófagos na corrente sanguínea que, em resposta aos sinais pró-inflamatórios, passam a produzir citocinas anti-inflamatórias. A resposta inflamatória é essencial para o combate bacteriano, mas em casos extremos, uma reação exacerbada pode levar ao choque séptico. O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana multi-ligante da superfamília das imunoglobulinas; é descrito que durante a sepse ocorre um aumento na concentração plasmática dos ligantes deste receptor. Um dos efeitos principais da ativação de RAGE é a ativação redox-dependente de NF- κ B, a qual leva à produção de TNF- α , sendo este um processo de retroalimentação positiva; tal mecanismo vem sendo sugerido como o eixo principal da intensificação/perpetuação de estados pró-inflamatórios. Esse trabalho visa elucidar a relação causal entre estresse oxidativo e HSP70 extracelular em um modelo celular de sepse, avaliando a modulação de tal mecanismo por via de RAGE. A linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 foi desafiada com HSP70 e agonistas de RAGE, o que resultou na ativação da cascata de sinalização das MAPK. A fim de avaliar o parâmetro tempo/resposta, a proteína HSP70 foi adicionada às células em diferentes momentos, e a imunodeteção de cinases foi realizada. A expressão de RAGE foi validada em nossa linhagem de estudo na presença de LPS por um período de 24h, onde verificamos um aumento significativo nos níveis de RAGE. Com a finalidade de atenuar a expressão deste receptor, utilizou-se siRNA como ferramenta de silenciamento gênico; a eficiência da técnica foi baixa, uma vez que não se verificou diferença estatística nos níveis de expressão de RAGE nas células RAW 264.7.

Abstract

Sepsis is a complex syndrome, triggered by microbial infection caused by a pathogen and is induced by progressive and systemic activation of multiple pathways of inflammatory responses, resulting in acute dysfunction of some organs and culminating in multiple death. Septic patients have a high ratio of activation of macrophages in the bloodstream, which in response to proinflammatory signals, start producing antiinflammatory cytokines. The inflammatory response is essential for bacterial decase, but in extreme cases, an enhanced response can lead to septic shock. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a multi-transmembrane binding protein of the immunoglobulin superfamily; it is described that during sepsis there is an increase in the plasma concentration of the ligands of this receptor. One of the main effects of activation of RAGE is the redox-dependent NF- κ B activation, which leads to production of TNF- α , which is a positive feedback process; such mechanism has been suggested as the main axis stepping / perpetuation of proinflammatory states. The purpose of this work is to elucidate the causal relationship between oxidative stress and extracellular HSP70 in a cell model of sepsis, by assessing the modulation of such mechanism via RAGE. The macrophages cell line RAW 264.7 were challenged with HSP70 and agonists of RAGE, resulting in activation of the MAPK signaling cascade. To evaluate time/response parameter, HSP70 protein was added to the cells at different times, immunodetection of kinases was performed. The expression of RAGE was validated in our lineage study in the presence of LPS for a period of 24 hours, where we found a significant increase in the RAGE's level. In order to attenuate the expression of this receptor, we used siRNA gene silencing as a tool; the technique efficiency was low, since there was no statistical difference in the expression levels of RAGE in RAW 264.7 cells.

Keywords: sepsis, RAGE, heat shock protein, macrophage.

Índice de Figuras

Figura 1. Funções efetoras dos macrófagos.....	3
Figura 2. Representação esquemática de RAGE e suas variantes originadas de splicing.....	4
Figura 3. RAGE resultando em inflamação prolongada.....	5
Figura 4. Agonistas de RAGE.....	22
Figura 5. Curva de tempo com tratamento da proteína HSP70.....	22
Figura 6 . HSP70 oxidada.....	24
Figura 7. Imunoconteúdo de RAGE em RAW 264.7.....	25
Figura 8. Silenciamento 1 de RAGE.....	26
Figura 9. Silenciamento 2 de RAGE	27

Dicionário de Termos e Abreviações

AGE: Produtos finais de glicação avançada (Advanced Glycation End-products)

AKT: conhecida também como proteína cinase B (PKB)

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

HMGB1: Proteína B1 do grupo de alta mobilidade (High-mobility group protein B1); anfoterina

HSP70: Proteína de choque térmico de peso molecular 70 kDa (70 kilodalton heat shock proteins)

JNK: Janus cinase (c-Jun N-terminal kinases)

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteína cinase ativadora de mitógenos (mitogen-activated protein kinase)

MHCIII: Complexo principal de histocompatibilidade classe III

NK- κ B: Fator Nuclear de Transcrição Kappa Beta

RAGE: Receptor para produtos finais de glicação avançada

RNA: Ácido Ribonucléido

siRNA: pequena molécula de RNA interferente (small interfering RNA)

sRAGE: RAGE solúvel

srcRNA: RNA embaralhado, do inglês “scrambled RNA”

S100B: Proteína B ligadora de cálcio (S100 calcium binding protein B)

Sumário

1.Introdução.....	1
1.1 Sepsis	1
1.2 Resposta imunológica e macrófagos.....	2
1.3 RAGE.....	3
1.4 Proteínas de Choque Térmico	6
2.Justificativa.....	8
3.Objetivos.....	9
4.Metodologia	10
4.1 Cultura celular.....	10
4.2 Tratamento das células RAW 264.7 com agonistas RAGE.....	10
4.3 Tratamento da curva de tempo de HSP70.....	10
4.4 Ativação dos Macrófagos por LPS	10
4.5 Silenciamento por RNA interferente	11
4.6 Imunodeteção	11
4.7 Análise estatística	12
5.Resultados	13
5.1 A proteína HSP70 como um agonista de RAGE	13
5.2 Curva de tempo do tratamento com HSP70.....	13
5.3 HSP70 oxidada	13
5.4 Silenciamento RAGE.....	14
6.Discussão	15
7.Conclusões e Perspectivas.....	17
8.Referências.....	18
Apêndice	22

1. Introdução

1.1 Sepses

A sepsis é uma síndrome complexa, disparada pela infecção microbiana causada por um organismo infeccioso, podendo ser uma bactéria, um vírus ou um fungo; é induzida pela ativação sistêmica de múltiplas vias de resposta inflamatória, resultando na disfunção aguda de alguns órgãos e culminando em falência múltipla (RINALDI, LANDUCCI e GAUDIO, DE, 2009). Dependendo da graduação da severidade da doença, ela pode ser classificada como sepsis severa ou choque séptico.

Esta síndrome é uma das principais causas de morte em unidades de tratamento intensivo (UTIs) em todo o mundo e sua incidência está aumentando progressivamente (KOTSAKI e GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012). O estudo mundial PROGRESS demonstrou que a taxa de mortalidade causada pela sepsis em todo o Brasil chega até 65%, enquanto que a média mundial situa-se em torno de 30% (BEALE et al., 2009), e que o Brasil lidera o ranking mundial de mortes por sepsis, juntamente com a Malásia.

O início da resposta imunológica ocorre de forma neurohumoral, pró-inflamatória generalizada, seguido de uma resposta anti-inflamatória, que leva a a ativação de neutrófilos, monócitos e recrutamento de macrófagos, que interagem com células do endotélio através de receptores de reconhecimento de patógenos (BEUTLER, 2004). Posteriormente, como resultado da ativação celular e rompimento endotelial, ocorre a mobilização de substâncias do plasma, como citocinas (p. ex. TNF- α , interleucinas), enzimas (caspases e proteases), espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico, ácido araquidônico, fatores de ativação de plaquetas. Em um caso mais avançado, aumenta a complexidade de eventos, através da ativação do sistema complemento e eventos de cascatas de coagulação (HAENEY, 1998), que ocorrem principalmente no endotélio vascular. Como consequência desses acontecimentos, pode ocorrer o rompimento endotelial difuso, que é responsável pela disfunção de vários órgãos e pela hipoxia de diversos tecidos, característicos da sepsis severa e do choque séptico.

O soro de pacientes sépticos é capaz de induzir a ativação de macrófagos, que passam a produzir interleucina-10, citocina cuja função é inibir a ativação dos mesmos, mantendo o controle homeostático das reações imunes inatas e celulares. A ativação e o índice fagocitário dos macrófagos estão relacionados com a severidade da doença e com a mortalidade, sugerindo que os mecanismos anti-inflamatórios são predominantes em casos mais severos de sepsis (PECK et al., 2009).

A sepsis está associada com um desequilíbrio redox significativo, resultante de um aumento da produção de espécies oxidantes e uma diminuição das defesas antioxidantes endógenas (RINALDI, LANDUCCI e GAUDIO, DE, 2009). Além de comprometer a função de diversas biomoléculas importantes para a função dos órgãos, acredita-se que o estresse oxidativo é um componente chave na disfunção mitocondrial que está relacionada à falência da função dos órgãos. O combate e minimização do dano oxidativo, assim, tornou-se o foco de

numerosos estudos que visaram à elaboração de uma terapia antioxidante para o combate da sepse.

Estudos clínicos e em modelos animais vêm demonstrando que a patofisiologia da sepse não é dependente de apenas um único e principal mediador pró-inflamatório. Atualmente se considera válida uma abordagem alternativa, focando nos efeitos danosos de diversos mediadores em nível celular e molecular, e em possíveis maneiras de prevenir ou minimizar as consequências desses efeitos. Assim, pode-se dizer que a tendência atual em termos de perspectivas no tratamento da sepse foca nos mecanismos moleculares relacionados à ativação da proteção celular e contra ao dano de biomoléculas.

1.2 Resposta imunológica e macrófagos

A resposta imunológica do organismo ocorre de forma complexa e requer uma combinação de vários elementos de forma coordenada. Perante diferentes estímulos, os mecanismos de resposta atuam em diferentes níveis: célula-específicos, operando a nível celular de forma a regular o seu recrutamento e ativação; sinal-específicos, que inclui os mecanismos responsáveis pela transdução do sinal; gene-específicos, que operam a nível genético.(MEDZHITOV e HORNG, 2009).

Os macrófagos são células fagocitárias presente nos tecidos, derivados dos monócitos do sangue e que desempenham papéis essenciais na imunidade inata e também na adaptativa. Macrófagos são células apresentadoras de antígeno e fazem parte das respostas primárias a um antígeno novo no organismo. Estas células fagocitam microorganismos e, a partir da fusão do fagossomo com o lisossomo, os micróbios são destruídos, principalmente pela síntese aumentada de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico (enzimas fagócito oxidase e óxido nítrico sintase induzida –iNOS), assim como por enzimas lisossômica.

Além disso, os macrófagos ativados estimulam a inflamação aguda por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF e IL-1, quimiocinas, e mediadores lipídicos de vida curta, tais como o fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos. A ação coletiva dessas citocinas e dos mediadores lipídicos é produzir uma inflamação local que é rica em neutrófilos e recrutar mais monócitos, os quais se tornam macrófagos, fagocitam e destroem organismos infecciosos, aumentando assim a imunidade adquirida. Paralelamente, promovem a secreção de fatores de crescimento, a fim de induzir a formação de tecido de reparo (proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, angiogênese) (ABBAS ABUL K., LICHTMAN; e PILLAI, 2011).

Os macrófagos respondem principalmente aos componentes de paredes celulares de bactérias gram-positivas (peptídeoglicana e ácido lipoteicóico), porém a maior ativação (e maior causa de sepse) é causada por lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (KIMPE, DE et al., 1995). O LPS é reconhecido como um padrão molecular associado a patógeno (PAMP), responsável por causar uma inflamação local através da sinalização mediada por TLR-4 (Toll-like receptor-4) (MILLER, ERNST e BADER, 2005). A resposta inflamatória é essencial para o combate bacteriano, mas em casos extremos, uma reação exacerbada pode levar ao choque séptico (SALOMAO et al., 2012).

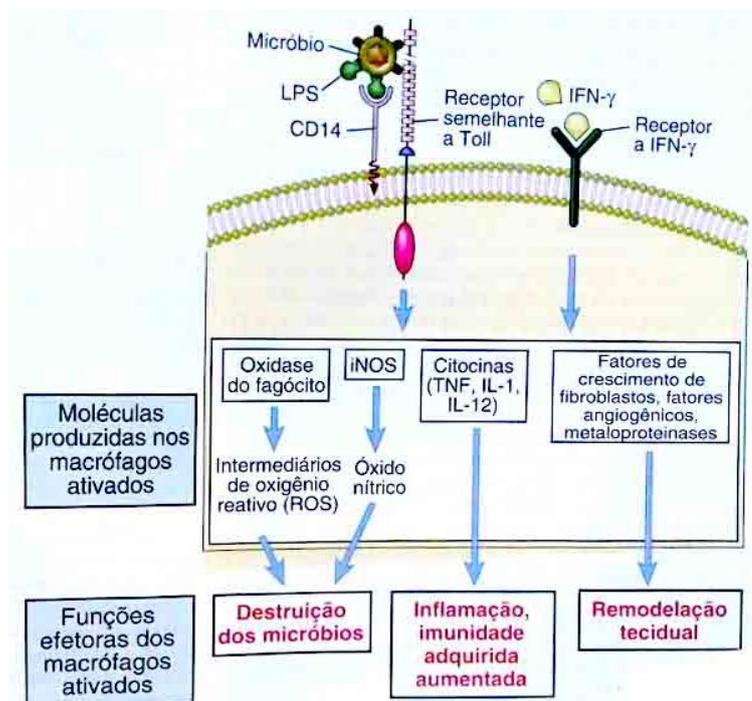


Figura 1. Funções efetoras dos macrófagos. Os macrófagos são ativados por produtos microbianos tal como LPS. O processo de ativação do macrófago leva à ativação de fatores de transcrição, à transcrição de vários genes e a síntese de proteínas que medeiam as funções dessas células. (ABBAS ABUL K., LICHTMAN; e PILLAI, 2011)

1.3 RAGE

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana multi-ligante da superfamília das imunoglobulinas. Em humanos, o gene que codifica esta proteína está localizado do cromossomo 6, próximo ao gene do complexo de histocompatibilidade III (MHC III). O gene possui aproximadamente 1.4kb e a sua tradução resulta em um produto proteico de 404 aminoácidos e massa molecular em torno de 55 kDa. O RAGE é composto por uma região extracelular, um único domínio transmembrana hidrofóbico e uma longa cauda citosólica altamente carregada. (CHUAH et al., 2013).

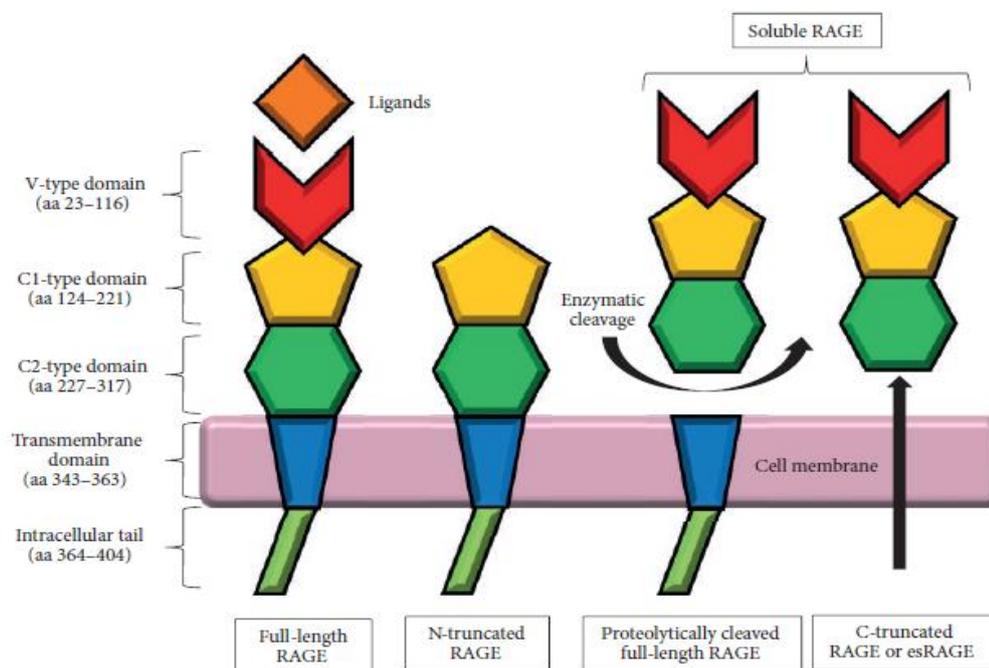


Figura 2 Representação esquemática do RAGE e suas variantes originadas de splicing. RAGE é composto de uma cauda intracelular, um domínio transmembranar, e um domínio extracelular que consiste de três domínios do tipo imunoglobulina, um do tipo V, seguido por dois domínios tipo-C (C1 e C2). O domínio do tipo V é essencial para a ligação do ligante e a exclusão deste domínio resulta em uma forma N-truncada. O C-truncado resulta no RAGE solúvel, corresponde ao domínio extracelular de RAGE sem a cauda intracelular e o domínio transmembranar. Essas isoformas pode derivar através de clivagem proteolítica de RAGE da superfície da célula (cRAGE) ou através de processamento (splicing) alternativo de RNA mensageiro de RAGE. C: constante, V: variável.. (CHUAH et al., 2013)

O RAGE pode ser ativado por produtos finais de glicação avançada (AGE), proteína S100B, anfoterina (HMGB1) e peptídeo β -amilóide ($A\beta$), os quais induzem a ativação de uma cascata de sinalização onde espécies reativas (ER) atuam como segundos-mensageiros em pelo menos uma das etapas (Srikanth *et al.*, 2009). Após a ligação do ligante extracelular no RAGE, inicia-se uma via de sinalização, a fim de que esse sinal seja percebido e gere uma resposta adequada no ambiente celular. As cascatas de MAPK são as vias de transdução de sinal mais bem estudadas e que participam de vários eventos celulares; incluem-se neste grupo as cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK1 / 2), que preferencialmente regulam o crescimento e diferenciação celular, assim como a a cinase c-Jun N-terminal (JNK) e cascatas da MAPK p38, que funcionam principalmente em respostas como inflamação e apoptose (IP e DAVIS, 1998; LEWIS, SHAPIRO e AHN, 1998; ROBINSON e COBB, 1997). Sabe-se que RAGE se liga diretamente a ERK através da sua região citoplasmática (ISHIHARA et al., 2003) e pode participar de transduções de sinais cooperativamente com receptores do tipo Toll-like (CHEN e NUÑEZ, 2010). Através de eventos de fosforilação, desencadeia-se uma resposta celular em resposta a estes sinais, onde ocorre a ativação de genes e fatores de transcrição, como o NF- κ B.

Um dos efeitos principais da ativação de RAGE é a ativação redox-dependente de NF- κ B e a indução de vias pró-inflamatórias controladas por esse fator de transcrição (JANSSEN-HEININGER, POYNTER e BAEUERLE, 2000). O gene RAGE é um elemento responsivo à NF- κ B, uma vez que possui um sítio de ligação funcional ao NF- κ B em seu promotor proximal (LI e SCHMIDT, 1997); assim, a ativação desse receptor é capaz de aumentar sua própria expressão. Tal mecanismo de retroalimentação positiva, bem como a indução da transcrição de RAGE por TNF- α , vem sendo sugerido como o eixo principal da intensificação/perpetuação de estados pró-inflamatórios (LUKIC et al., 2008).

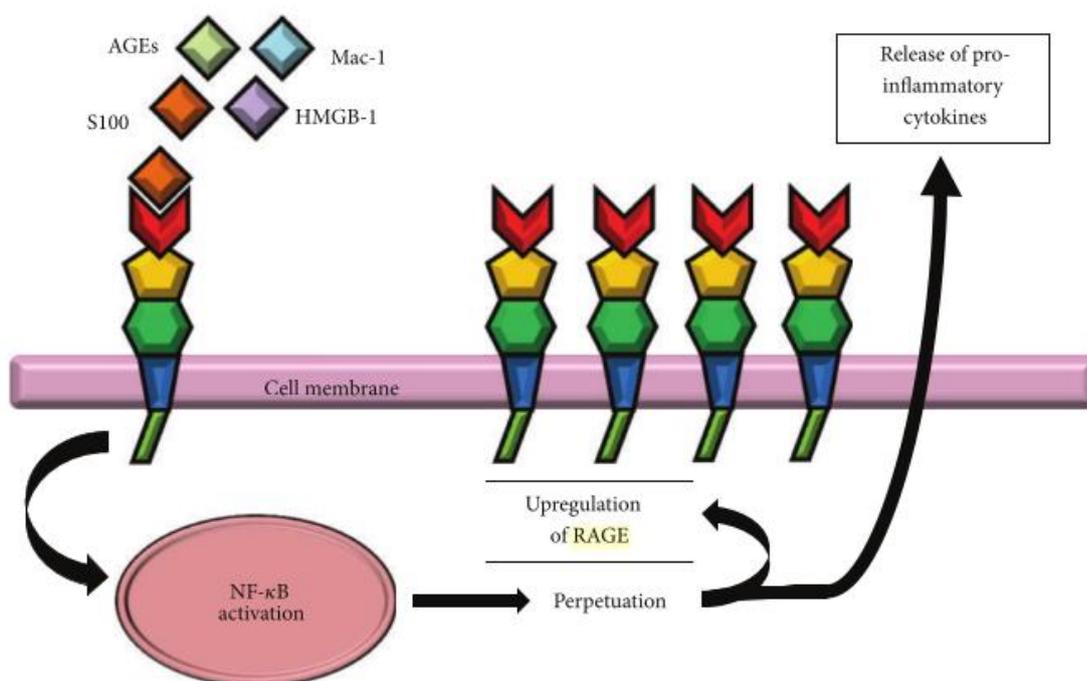


Figura 3. RAGE resultando em inflamação prolongada. Interação de RAGE com vários ligantes, incluindo AGEs, HMGB1, proteínas S100, e β 2-integrina Mac-1, levando a uma cascata de sinalização intracelular que resulta em ativação perpétua do fator de transcrição NF κ B. A região promotora de RAGE contém dois elementos responsivos a NF κ B; RAGE é regulado onde há presença dos seus ligantes, associado a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, promovendo o recrutamento de células inflamatórias. (CHUAH et al., 2013)

Ao contrário da expressão constitutiva de RAGE durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de RAGE é regulada na vida adulta, o que representa sua expressão em situações onde há acúmulo de seus ligantes e mediadores inflamatórios (SCHMIDT et al., 2001). A expressão de RAGE encontra-se aumentada em diversas patologias relacionadas a um estado pró-inflamatório crônico, como artrite reumatoide, Doença de Alzheimer, arteriosclerose, doença renal crônica e alguns tipos de câncer (MACZUREK, SHANMUGAM e MÜNCH, 2008). Entretanto, identificou-se que o pulmão e pele possuem expressão constitutiva de RAGE em níveis elevados durante a idade dos mesmos (BRETT et al., 1993). No entanto, o papel exato ou função desta expressão elevada na fisiologia destas células não está bem definida.

Foi demonstrado que a deleção de RAGE em modelos animais exerce um pronunciado efeito de proteção contra a mortalidade induzida pela sepse, sendo este efeito também observado pela injeção da forma solúvel de RAGE (sRAGE), a qual atua como um sequestrador de ligantes de RAGE na circulação, impedindo a ativação do receptor em células (LILIENSIEK et al., 2004). Além disso, na sepse ocorre um aumento na concentração plasmática desses ligantes, tanto pela formação de AGE derivada de estresse oxidativo como pela liberação citolítica e secretória de HMGB1, a qual é reconhecida como um dos principais mediadores inflamatórios de endotoxemia letal e da sepse (LOTZE e TRACEY, 2005).

1.4 Proteínas de Choque Térmico

A família de proteínas de choque térmico (HSP) atuam principalmente como chaperonas em resposta a diversos estímulos de estresse, tais como radiação UV, estresse oxidativo e infecção, além do próprio choque térmico. Assim, a expressão aumentada de HSP70 está relacionada com um ambiente celular mais oxidado do que reduzido do citosol (CALLAHAN et al., 2002). Durante condições não estressantes, as proteínas de choque térmico participam do empacotamento de polipeptídeos nascentes e estabilizam receptores e moléculas transdutoras de sinal. (MAIO, DE, 1999). As HSPs são conservadas de bactérias a humanos e variam em tamanho, de 7 a 110 kDa, e podem ser encontradas em quaisquer compartimento celular, incluindo núcleo, citoplasma e mitocôndrias. As nomenclaturas mais comuns para as proteínas de choque térmico fazem uso do seu peso molecular, como por exemplo em HSP70, na qual 70 corresponde ao peso molecular em kDa.

As HSP70 constituem uma subfamília das HSP e exercem uma gama de funções intracelulares de proteção a proteínas, e recentemente o seu papel no meio extracelular vem sendo considerado também relevante. Exercendo papel citoprotetor em situações adversas, a modulação dos níveis de HSP70 por estímulos exógenos é amplamente considerada como um parâmetro de estresse celular. Fisiologicamente, sabe-se que a lise celular de células necróticas libera HSPs para meio extracelular, ativando e influenciando a sobrevivência de células apresentadoras de antígeno (APCs) do sistema imunológico, principalmente de macrófagos, atuando sobre a via altamente conservada NF κ B (ANAND et al., 2010; BASU et al., 2000). Uma vez no espaço extracelular, acredita-se que as proteínas HSP70 se ligam em receptores do tipo Toll-like 2 e 4 e atua como citocina para estimular monócitos humanos através de cascatas próinflamatórias de transdução de sinal, que resulta no aumento da expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (ASEA et al., 2000)

Entre os diversos moduladores da resposta inflamatória mediada por RAGE, as HSP70 aparecem como potenciais reguladores em múltiplos níveis. Poucos trabalhos investigaram a relação entre HSP70 e a sinalização RAGE-dependente; no entanto, sabe-se que HSP70 é capaz de interagir com HMGB1, impedindo a sua secreção por macrófagos durante processos inflamatórios (TANG et al., 2007), e também que a indução de HSP70 como resposta ao estresse celular é capaz de inibir a ativação de NF- κ B, diminuindo a resposta inflamatória em sepse (MALHOTRA e WONG, 2002).

Recentemente, através de um estudo que utilizou amostras de soro de pacientes de sepse e quantificou os níveis de HSP70 extracelular e marcadores de estresse oxidativo, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os níveis séricos de HSP70 nesses pacientes são modulados de acordo com o estado redox do soro, o qual varia entre estados anti e pró-oxidantes nos diferentes pacientes (GELAIN et al., 2011). Além disso, e mais importante, observou-se que houve uma taxa de mortalidade significativamente maior nos pacientes que apresentaram soro pró-oxidante e altos níveis de HSP70. A significância dessa observação é a de que a variação de certos parâmetros moleculares em pacientes de sepse pode indicar a existência de subgrupos de pacientes mais predispostos à mortalidade ou não dependendo de uma combinação específica de fatores. Além disso, outro grupo também analisando o soro de pacientes sépticos, visualizou que macrófagos tratados com estes soros são ativados, e que passam a produzir interleucina-10, citocina cuja função é inibir a ativação dos mesmos, mantendo o controle homeostático das reações imunes inatas e celulares (PECK et al., 2009). Esta ativação e o índice fagocitário dos macrófagos estão relacionados com a severidade da doença e com a mortalidade, sugerindo que os mecanismos anti-inflamatórios são predominantes em casos mais severos de sepse.

2. Justificativa

Estudos recentes relatam um aumento representativo da expressão de RAGE em doenças inflamatórias agudas e crônicas, sugerindo sua participação e, por consequência, de suas vias de sinalização, na perpetuação de respostas imunológicas e inflamatórias (BIERHAUS, STERN e NAWROTH, 2006; CLYNES et al., 2007). Visto que o RAGE é uma proteína da família das imunoglobulinas e que possui vários ligantes, este trabalho visa estabelecer a relação do receptor com a proteína HSP70, de forma a elucidar a relação causal entre estresse oxidativo e HSP70 extracelular. Por tais razões, esta pesquisa acerca dos aspectos moleculares, celulares e funcionais desponta como estratégica ao desenvolvimento de tratamentos eficazes e específicos para a sepse.

3. Objetivos

Sabendo que RAGE é um receptor promíscuo de reconhecimento de padrões pró-inflamatórios extracelulares, o presente projeto apresenta como objetivo elucidar o mecanismo de ação da HSP70 extracelular em um modelo de resposta inflamatória celular, e avaliar a modulação de tal mecanismo via RAGE. Para atingir este objetivo, traçamos as seguintes metas:

- 3.1) Determinar o mecanismo de ação da HSP70;
- 3.2) Determinar o papel do RAGE como o receptor indutor ou co-modulador dos efeitos induzidos pela HSP70 extracelular;
- 3.3) Determinar a influência do estresse oxidativo em tais processos, bem como em rotas de sinalização que modulam esses processos;

4. Metodologia

4.1 Cultura celular

Células da linhagem de macrófago RAW 264.7 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 0.28 µg/µL de gentamicina e 250 µg de Anfotericina B em incubadora com 5% de CO₂ e a 37°C.

4.2 Tratamento das células RAW 264.7 com agonistas RAGE

As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de seis poços em meio DMEM 10% SFB em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/poço. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio DMEM 1% SFB, a fim de descartar qualquer possibilidade de interferência da troca de meio nos eventos celulares que se pretende analisar. Decorrido uma hora e trinta minutos, adicionou-se as proteínas HSP70 bovina, HMGB1, AGE, S100B e LPS. Após 20 minutos, o meio foi retirado e adicionaram-se 400 µL tampão Laemli 2x (62,5mM Tis-HCl, 1% (peso/volume) SDS, 10% (v/v) glicerol, 1% IPGAL) com 10% de agente redutor β-mercaptoetanol, onde as células foram raspadas. Realizou-se a imunodeteção das cinases através de western blot, utilizando 30 µL de cada amostra (aproximadamente 30µg de proteína).

4.3 Tratamento da curva de tempo de HSP70

As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de seis poços em meio DMEM 10% SFB em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/poço. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio DMEM 1% SFB, a fim de descartar qualquer possibilidade de interferência da troca de meio nos eventos celulares que se pretende analisar. Decorrido uma hora e trinta minutos, adicionou-se proteína HSP70 bovina em diferentes tempos: 60, 45, 30, 20, 15, 10 e 5 minutos. Posteriormente, o meio foi descartado e adicionaram-se 400 µL de tampão Laemli 2x (62,5mM Tis-HCl, 1% (peso/volume) SDS, 10% (v/v) glicerol, 1% IPGAL)) com 10% de agente redutor β-mercaptoetanol por poço, onde as células foram raspadas. Realizou-se a imunodeteção das cinases através de western blot, utilizando 30 µL de cada amostra (aproximadamente 30µg de proteína).

4.4 Ativação dos Macrófagos por LPS

As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de seis poços em meio DMEM 10% SFB em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/poço. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio DMEM 1% SFB com LPS $1\mu\text{g}/\text{mL}$. Decorridas 24 horas com o tratamento, as células foram analisadas no microscópio; posteriormente, descartou-se o meio e foi adicionado tampão RIPA (20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio) às células, onde as mesmas foram raspadas, centrifugadas a 10000g por 5 minutos a 4°C. A lise celular foi dirigida através de sonicação (três vezes) seguido de congelamento/descongelamento (três vezes). As proteínas foram dosadas por método de Bradford e ponderadas em tampão Laemli. Utilizando 30 μg de proteína, o imunoconteúdo de RAGE e β -actina foi mensurado através de imunodeteção por western blot.

4.5 Silenciamento por RNA interferente

O envolvimento de RAGE na sinalização celular foi confirmado utilizando células com RAGE silenciado por ensaio de siRNA. A expressão de RAGE nas células RAW 264.7 foi inibida através do ensaio de “silenciamento” de RNA mensageiro (mRNA) por RNA interferente (ZANOTTO-FILHO et al., 2011). As células foram incubadas em meio OPTI-MEM com uma solução de agente transfectante siPORT™ NeoFX™ Agent (Invitrogen - Life Technologies) formulado à base de lipídeos, e oligonucleotídeos de RNA resistentes à degradação por nucleases (Silencer Select Pre-designed siRNA) contendo a sequência de nucleotídeos (senso (5'→3'): GGUCCACUGGAUAAAGGAUtt e anti-senso: AUCCUUUAUCCAGUGGACctg) complementar à sequência de mRNA codificadora de RAGE.

O tempo de incubação, concentração de siRNA e quantidade de agente transfectante a serem utilizados foram determinados por curvas de concentração e tempo de forma a obter a maior eficiência de silenciamento, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado, as células foram raspadas em tampão fosfato salino (PBS), centrifugadas (10000g por 5 minutos a 4°C) a fim de precipitar as células, e ressuscendidas em tampão RIPA. Após a lise celular, as proteínas foram dosadas por coloração de Bradford, ponderadas em tampão Laemli. Para a realização da técnica de western blot, 30 μg de proteína foi utilizado. A eficiência do silenciamento foi determinada pela imunodeteção de RAGE.

4.6 Imunodeteção

As células lisadas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% e eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose. A presença de proteínas e a eficiência da eletroforese foi verificada através da coloração com Ponceau S, e a membrana foi bloqueada com tampão salino Tween-Tris (TTBS: 100mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5,) contendo 5% albumina. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com cada

anticorpo primário específicos contra as formas fosforiladas (ativas) das MAPKs ERK1/2, p38, JNK e também de AKT em concentrações sugeridas pelo fornecedor. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com TTBS por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário IgG ligado a peroxidase por duas horas (diluição 1:100). A imunorreatividade foi detectada por um procedimento quimioluminescente de imunodeteção. A quantificação foi realizada com o software ImageJ.

4.7 Análise estatística

Os resultados dos experimentos que continham mais de dois grupos a serem comparados entre si, foram analisados estatisticamente através de teste ANOVA, seguido de pós-teste Tukey. Já para o resultados do experimento com apenas dois grupos, realizou-se análise estatística através do teste t student. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão. Para cada experimento foi utilizado um $n \geq 3$. Um índice de confiança maior que 95% (valor de $P < 0.05$) foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1 A proteína HSP70 como um agonista de RAGE

A fim de visualizar a interação da HSP70 com o RAGE, as células RAW 264.7 foram tratadas com os agonistas de RAGE já conhecidos, HMGB1 1µg/mL (TADIÉ et al., 2012), S100B 20µg/mL e AGE 1mg/mL (OKUDA et al., 2012), LPS 1 µg/mL (HASSAN et al., 2005) e também com HSP70 bovina 1µg/mL (GRUNWALD et al., 2014) por 20 minutos, 5% CO₂ a 37°C. Realizou-se ensaios de imunodeteção por western blot, a fim de analisar a presença de enzimas localizadas em uma parte mais derivada da via de sinalização, depois da interação com o ligante (Figura 4).

5.2 Curva de tempo do tratamento com HSP70

As células foram submetidas a um tratamento com HSP70 em uma curva de tempo, a fim de analisar em que momento ocorre o pico de fosforilação das cinases. Os tratamentos foram feitos em 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. Realizou-se ensaios de imunodeteção contra ERK, p-p38, p-Akt e p-JNK (Figura 5). Para visualizar a diferença da ativação das cinases durante os 60 minutos, o imunoconteúdo das proteínas foi representado em relação ao controle, que foi determinado como 100% (1) (Figura 5, E).

5.3 HSP70 oxidada

A fim de avaliar a atividade de HSP70 em seus diferentes níveis de oxidação, a proteína foi submetida a um protocolo de oxidação. A proteína foi utilizada em uma concentração de 1µg/mL e oxidada com três diferentes concentrações do agente oxidante, peróxido de hidrogênio, (volume 1:1) a 37°C por 1 hora em um sistema aberto (GRUNWALD et al., 2014; VENEREAU et al., 2012). A reação de redução do H₂O₂ em água e gás carbônico ocorre neste período. As concentrações do agente oxidante utilizadas foram 10 mM, 25 mM e 50 mM.. As células foram semeadas, como explicado em materiais e métodos, se acrescidas de HSP70 em seu estado nativo, três condições de HSP70 oxidada e, como controle, peróxido de hidrogênio nas três diferentes concentrações, também submetido às mesmas condições de pressão e temperatura (Figura 6). A imunodeteção das enzimas cinases foi realizada por Western blot.

5.4 Silenciamento RAGE

É necessário saber se o receptor para produtos finais de glicação avançada é expressado nas células RAW 264.9. Para isso, as células foram semeadas e submetidas a um tratamento de 24 horas com LPS em uma concentração de 1 µg/mL, a qual já se sabe que ativa macrófagos. A expressão de RAGE foi confirmada por western blot e normalizada com beta-actina (Figura 7).

A fim de testar se pequenos RNAs de interferência (siRNA) são capazes de modular a expressão de RAGE em RAW 264.7, estas células foram tratadas com siRNA em diferentes concentrações e tempo. Um primeiro experimento foi realizado utilizando concentrações de 30nM, 60nM e 90nM, tanto para o siRNA alvo, quanto para o controle negativo (srcRNA), durante 24 e 48 horas (Figura 8). A imunodeteccção dos dois experimentos de silenciamento foi realizada; o imunocnteúdo de RAGE foi normalizado com β-actina (Figura 8, A).

As células RAW 264.7 foram visualizadas por microscopia, a fim de analisar a confluência de células nos poços de tratamento e morfologia (Figura 8, B).

Um segundo experimento de silenciamento foi realizado. Uma maior quantidade de agente transfectante foi utilizada, proporcional à quantidade de células semadas. Assim, utilizou-se o agente transfectante também como controle; além disso, adicionou-se srcRNA como controle negativo em uma concentração de 180nM, e siRNA nas mesmas condições. Os tempos de silenciamento foram 24 e 48 horas (Figura 9). As células foram analisadas por microscopia e posteriormente destinadas à imunodeteccção de RAGE.

6. Discussão

A ativação dos receptores de produtos finais de glicação avançada por seus ligantes estimula a expressão de várias vias de sinalização inflamatórias, incluindo Janus cinase (JNK) -transdutor e ativador de transcrição (STAT) e MAPK (p38 e Erk) (CHEN e NUÑEZ, 2010). Primeiramente, investigamos a capacidade dos agonistas de RAGE já conhecidos e também da HSP70, em ativar a fosforilação de cinases. Sabendo que AKT é uma via que controla a sobrevivência da célula, uma vez que possui efeitos positivos indiretos sobre o fator nuclear κ B (NF- κ B) (ROMASHKOVA e MAKAROV, 1999), também foi pesquisado os efeitos dos tratamentos na sua ativação (p-AKT 1/2/3 fosforilação do resíduo de treonina 308).

Foi possível visualizar uma ativação significativamente alta de ERK e p38 nos tratamentos com S100B e LPS (Figura 4, A e B). O mesmo padrão não foi visualizado na presença das outras proteínas (Figura 4, C e D), que pode ser devido às concentrações utilizadas, a relação estequiométrica ligante/célula e a maneira de interação individual com o receptor; outro fator que pode ter dirigido esse resultado é o tempo de exposição das células aos tratamentos, que foi correspondente a 20 minutos. Sendo que presença e quantidade de LPS necessária para causar uma resposta inflamatória já é bem descrita, e a concentração utilizada de S100B foi alta, essas duas proteínas desencadearam uma resposta de sinalização maior em relação às outras. A via da AKT mostrou não estar envolvida neste processo, uma vez que nenhuma diferença estatística na fosforilação dessa cinase foi detectada. Esses resultados mostram o que já foi observado como um mecanismo de ativação de RAGE, onde, na presença de um ligante, é desencadeado um mecanismo de resposta celular através de vias clássicas de sinalização de MAP cinases.

Com o intuito de avaliar o fator tempo nos eventos de respostas celulares, realizou-se tratamento das células com a proteína de choque térmico sob diferentes tempos de exposição nas células (Figura 5). A maior ativação da ERK ½ ocorreu em 60 minutos de exposição (Figura 5, A), porém nenhuma diferença estatística na fosforilação das demais cinases foi encontrada, tanto em relação ao controle quanto com os diferentes tempos de tratamento (Figura 5, B, C e D). É possível notar que o conteúdo de cinases fosforiladas nos controles foi alta; isso pode ter ocorrido como consequência de uma situação de maior estresse em que as células se encontravam, que pode ser relacionado com a passagem em que as células se encontravam, ou a fatores como a manipulação. A partir destes resultados, pode-se concluir que a resposta celular ocorre de maneira via ERK-dependente, em um tempo maior de exposição da HSP70.

Na maioria dos processos inflamatórios graves, ocorre uma perda no equilíbrio de elementos oxidantes e defesas antioxidantes do organismo, caracterizando uma situação de estresse oxidativo. Nessas condições condições oxidantes, muitas proteínas sofrem ação de agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio. Assim, os resíduos de cisteína presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas (entre elas as HSP70), formam ligações dissulfeto, tanto com outras HSP70 quanto com outras proteínas. Além disso, a ligação de peptídeos antigênicos pela HSP70 é mais efetiva sob condições oxidantes quando comparada com condições redutoras; sendo que este fato é provavelmente causado pelo ganho de

estruturas secundárias em meio oxidante (CALLAHAN et al., 2002). Uma vez que em condições pró-oxidantes há um número maior de proteínas HSP70 (GELAIN et al., 2011) e ocorre um desbalanço redox onde número de espécies oxidantes é maior, a proteína encontra-se no seu estado oxidado com ligações dissulfeto estabelecidas. Foi demonstrado a relação entre o estado redox, HSP70 e os efeitos decorrentes em um trabalho do grupo; com base nestas informações e na ausência de diferenças estatísticas nos diferentes tempos de tratamentos com a HSP70 em seu estado nativo (Figura 5), realizou-se um experimento em que esta proteína de choque térmico foi submetida à um protocolo de oxidação. A fim de analisar a alteração na resposta celular desencadeada por essa alteração conformacional, utilizou-se o peróxido de hidrogênio como agente oxidante; a sua concentração máxima utilizada foi de 50 mM, pois se limita a um efeito citostático, uma vez que a partir de 100 mM o efeito gerado pelo composto é citotóxico às células (GRUNWALD et al., 2014). As concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas foram de 10mM, 25mM e 50mM.

A fosforilação de ERK ½ nas células foi significativamente maior quando desafiadas com LPS (Figura 6, A), porém o mesmo perfil de ativação não foi visualizado com HSP70 tanto em seu estado oxidado quanto nativo; isso também ocorreu quando as células foram tratadas somente com agente oxidante, uma vez que este, em suas diferentes concentrações, não demonstrou efeito positivo. A fosforilação das cinases p38, AKT e JNK ocorreu no estímulo do LPS, porém não mostrou diferença significativa quando comparada com os demais grupos de tratamento (Figura 6, B, C e D). Algumas hipóteses podem ser feitas em relação a esses resultados, como o fato do pico de fosforilação dessas cinases ocorrer em tempos diferentes dos 20 minutos estabelecidos.

É sabido que RAGE é um sítio de ligação de LPS; a fim de determinar se há presença de RAGE nas células RAW 264.7, as células foram desafiadas com tratamentos com LPS 1µg/mL por 24 horas (Figura 7). Em resposta à adição do lipopolissacarídeo, é possível visualizar que os macrófagos se ativam (Figura 7, B) e, conseqüentemente, a expressão de RAGE aumenta significativamente nas células (Figura 7, A). Assim, confirma-se a presença da proteína receptora na nossa linhagem celular.

Confirmada a expressão de RAGE nestas células, utilizou-se RNA interferente para inibir a expressão do gene de RAGE. Os resultados mostraram baixa eficiência no silenciamento (Figuras 8 A, Figura 9, A). Em 24h de silenciamento, 90 nM de siRNA (8, A) e em 48h de silenciamento, 180nM de siRNA (9, A) parecem ter sido eficientes em atenuar os níveis de RAGE, porém, com o teste estatístico ANOVA realizado, esta diferença não é estatisticamente significativa. Por outro lado, as células RAW 264.7 possuem baixos níveis de expressão de RAGE em situações normais; assim, nestas condições, a eficiência da inibição da expressão é mais difícil de ser visualizada.

Através da análise das células RAW 264.7 por microscopia, confirmou-se que a incubação com o siRNA, meio Opti-MEM e o agente transfectante não levou a mudanças significativas no número de células, morfologia e viabilidade celular em ambos os silenciamentos (Figuras 8 B; 9 B e C); assim, conclui-se que os mesmos não causam efeitos adversos sobre a célula. Adicionalmente, através de microscopia, pode-se notar que a

confluência de células nos poços estava maior em 48h de tratamento em relação à 24h (Figura 9, Be C); isso deve-se ao evento de duplicação celular, uma vez que nesta linhagem o ciclo celular tem duração de 18 horas.

7. Conclusões e Perspectivas

Com a finalidade de estudar melhor o papel extracelular da proteína de choque térmico HSP70, sua interação com o receptor para produtos finais de glicação avançada e ação intracelular via RAGE-dependente, mais estudos devem ser realizados.

Os agonistas de RAGE, uma vez ligados nesse receptor, ativam vias de sinalização como a das MAPK. Para elucidar o papel da HSP70 em seu estado nativo e nos diferentes conformações redox como potencial ligante de RAGE, pretende-se realizar uma exposição mais prolongada das proteínas às células, a fim de verificar se ocorre o aumento dos níveis da expressão RAGE. Paralelamente, os níveis de expressão de NFκB também devem ser mensurados nos mesmos períodos, assim como o imunoconteúdo de citocinas pró-inflamatórias presentes no meio extracelular, como TNF-α, será avaliado através de ELISA.

Uma vez comprovado que os níveis de expressão de RAGE em RAW 264.7 são baixos em situações normais, também foi relatado que mesmos não foram atenuados em células silenciadas para este gene. O próximo passo será realizar um novo experimento de silenciamento, com menores concentrações do siRNA indicadas pelo fabricante, e quantificar os níveis de RAGE através a técnica de RT-qPCR, uma vez que este método é mais sensível e quantitativo. Criam-se perspectivas de estudar o silenciamento de RAGE em situações nas quais as células se encontram em condições adversas, ou seja, onde a expressão deste gene está aumentada quando na presença um ligante; neste caso, utilizaremos LPS, pois além de já ser bem descrito na literatura como ativador de RAGE, aqui comprovamos essa atividade.

Mais adiante, após obtermos melhor compreensão desses eventos, deseja-se provar se os eventos de retroalimentação positiva, já descritos como eventos de ativação de RAGE, ocorrem via HSP70. Então, para determinar efeitos da HSP70 na ativação de NF-κB e na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, realizar-se-á a imunodeteção das mesmas. Posteriormente, pretende-se incubar os macrófagos em cultura com siRNA de RAGE e visualizar a sua capacidade em inibir ou diminuir esses eventos na presença da proteína.

8. Referências

- ABBAS ABUL K.;; LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. [S.l: s.n.], 2011. v. 7^a ed.p. 125–130
- ANAND, P. K. et al. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10136, doi:10.1371/journal.pone.0010136, 2010.
- ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 435–42, doi:10.1038/74697, 2000.
- BASU, S. et al. 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. **International immunology**, v. 12, n. 11, p. 1539–46, 2000.
- BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222–32, doi:10.1007/s15010-008-8203-z, 2009.
- BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257–63, doi:10.1038/nature02761, 2004.
- BIERHAUS, A.;; STERN, D. M. e NAWROTH, P. P. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 7, n. 11, p. 985–91, 2006.
- BRETT, J. et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **The American journal of pathology**, v. 143, n. 6, p. 1699–712, 1993.
- CALLAHAN, M. K. et al. Differential acquisition of antigenic peptides by Hsp70 and Hsc70 under oxidative conditions. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33604–9, doi:10.1074/jbc.M202890200, 2002.
- CHEN, G. Y. e NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–37, doi:10.1038/nri2873, 2010.
- CHUAH, Y. K. et al. Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. **International journal of inflammation**, v. 2013, p. 403460, doi:10.1155/2013/403460, 2013.
- CLYNES, R. et al. Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. **Current molecular medicine**, v. 7, n. 8, p. 743–51, 2007.
- GELAIN, D. P. et al. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 35, n. 5, p. 466–70, doi:10.1097/SHK.0b013e31820fe704, 2011.

GRUNWALD, M. S. et al. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. **Cell stress & chaperones**, doi:10.1007/s12192-014-0516-5, 2014.

HAENEY, M. R. The role of the complement cascade in sepsis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41 Suppl A, p. 41–6, 1998.

HASSAN, F. et al. Lipopolysaccharide Prevents Doxorubicin-Induced Apoptosis in RAW 264 . 7 Macrophage Cells by Inhibiting p53 Activation Lipopolysaccharide Prevents Doxorubicin-Induced Apoptosis in RAW 264 . 7 Macrophage Cells by. p. 373–379, 2005.

IP, Y. T. e DAVIS, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 2, p. 205–19, 1998.

ISHIHARA, K. et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. **FEBS letters**, v. 550, n. 1-3, p. 107–13, 2003.

JANSSEN-HEININGER, Y. M.;; POYNTER, M. E. e BAEUERLE, P. A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. **Free radical biology & medicine**, v. 28, n. 9, p. 1317–27, 2000.

KIMPE, S. J. DE et al. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 22, p. 10359–63, 1995.

KOTSAKI, A. e GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Emerging drugs for the treatment of sepsis. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 17, n. 3, p. 379–91, doi:10.1517/14728214.2012.697151, 2012.

LEWIS, T. S.;; SHAPIRO, P. S. e AHN, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Advances in cancer research**, v. 74, p. 49–139, 1998.

LI, J. e SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16498–506, 1997.

LILIENSIEK, B. et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 11, p. 1641–50, doi:10.1172/JCI18704, 2004.

LOTZE, M. T. e TRACEY, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 4, p. 331–42, doi:10.1038/nri1594, 2005.

LUKIC, I. K. et al. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1126, p. 76–80, doi:10.1196/annals.1433.059, 2008.

MACZUREK, A.; SHANMUGAM, K. e MÜNCH, G. Inflammation and the redox-sensitive AGE-RAGE pathway as a therapeutic target in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1126, p. 147–51, doi:10.1196/annals.1433.026, 2008.

MAIO, A. DE. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 1999.

MALHOTRA, V. e WONG, H. R. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1 Supp, p. S89–S95, 2002.

MEDZHITOV, R. e HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 10, p. 692–703, doi:10.1038/nri2634, 2009.

MILLER, S. I.; ERNST, R. K. e BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36–46, doi:10.1038/nrmicro1068, 2005.

OKUDA, L. S. et al. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1821, n. 12, p. 1485–92, doi:10.1016/j.bbali.2012.08.011, 2012.

PECK, G. et al. Serum-induced macrophage activation is related to the severity of septic shock. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 58, n. 2, p. 89–93, doi:10.1007/s00011-009-8088-z, 2009.

RINALDI, S.; LANDUCCI, F. e GAUDIO, A. R. DE. Antioxidant therapy in critically septic patients. **Current drug targets**, v. 10, n. 9, p. 872–80, 2009.

ROBINSON, M. J. e COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n. 2, p. 180–6, 1997.

ROMASHKOVA, J. A. e MAKAROV, S. S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 86–90, doi:10.1038/43474, 1999.

SALOMAO, R. et al. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 38, n. 3, p. 227–42, doi:10.1097/SHK.0b013e318262c4b0, 2012.

SCHMIDT, A. M. et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 7, p. 949–55, doi:10.1172/JCI14002, 2001.

TADIÉ, J.-M. et al. Differential activation of RAGE by HMGB1 modulates neutrophil-associated NADPH oxidase activity and bacterial killing. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 302, n. 1, p. C249–56, doi:10.1152/ajpcell.00302.2011, 2012.

TANG, D. et al. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 2, p. 1236–44, 2007.

VENEREAU, E. et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 9, p. 1519–28, doi:10.1084/jem.20120189, 2012.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. NFκB inhibitors induce cell death in glioblastomas. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 412–24, doi:10.1016/j.bcp.2010.10.014, 2011.

Apêndice

Figura 4

Figura 4

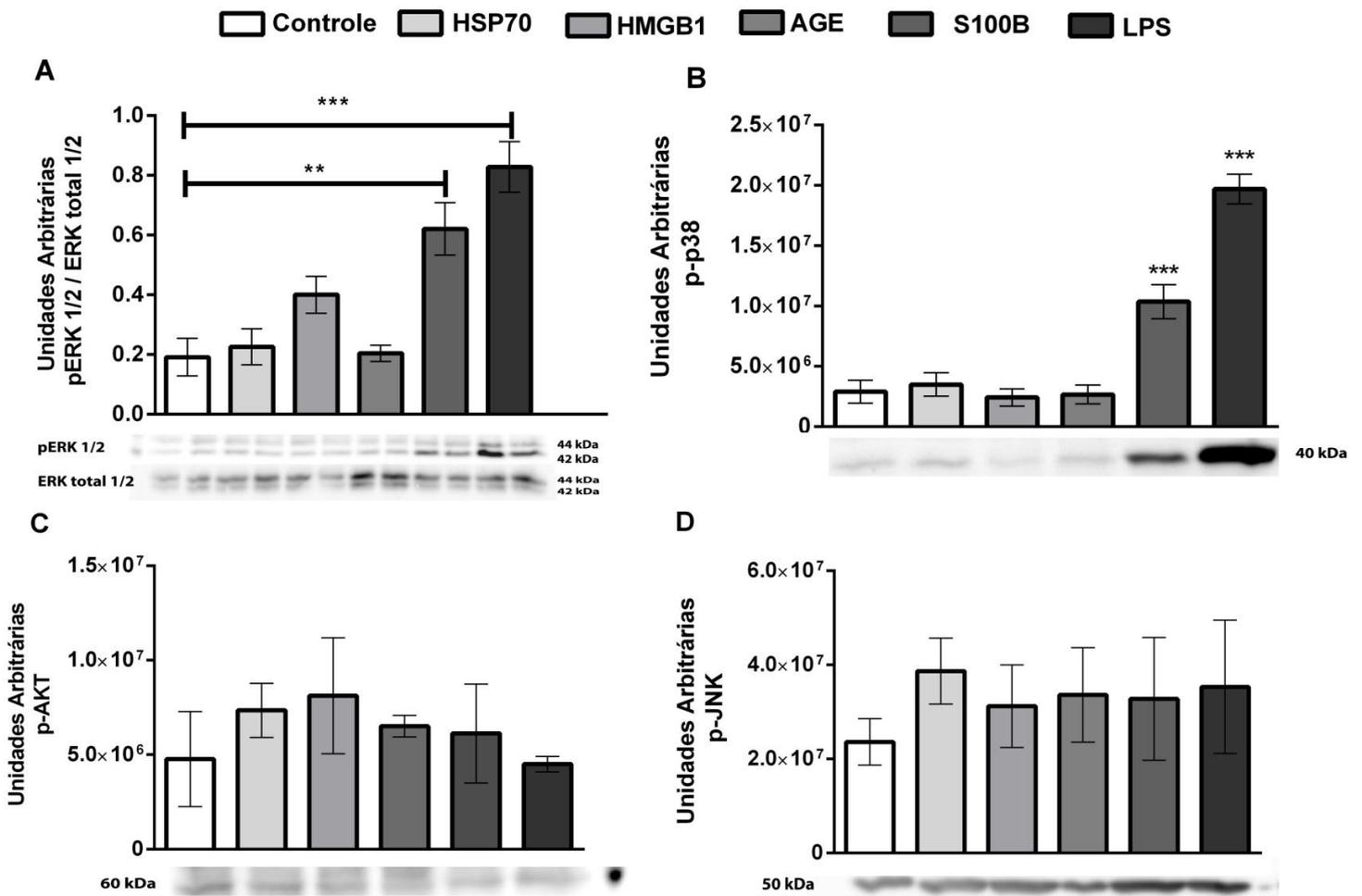


Figura 4. Agonistas RAGE. Western blots das cinases do tratamento de 20 minutos com agonistas de RAGE. A) ERK1/2. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. Diferença estatística *P<0.005, **P<0.001, ***P<0.001 (ANOVA seguida de pós-teste Tukey).

Figura 5

Figura 5

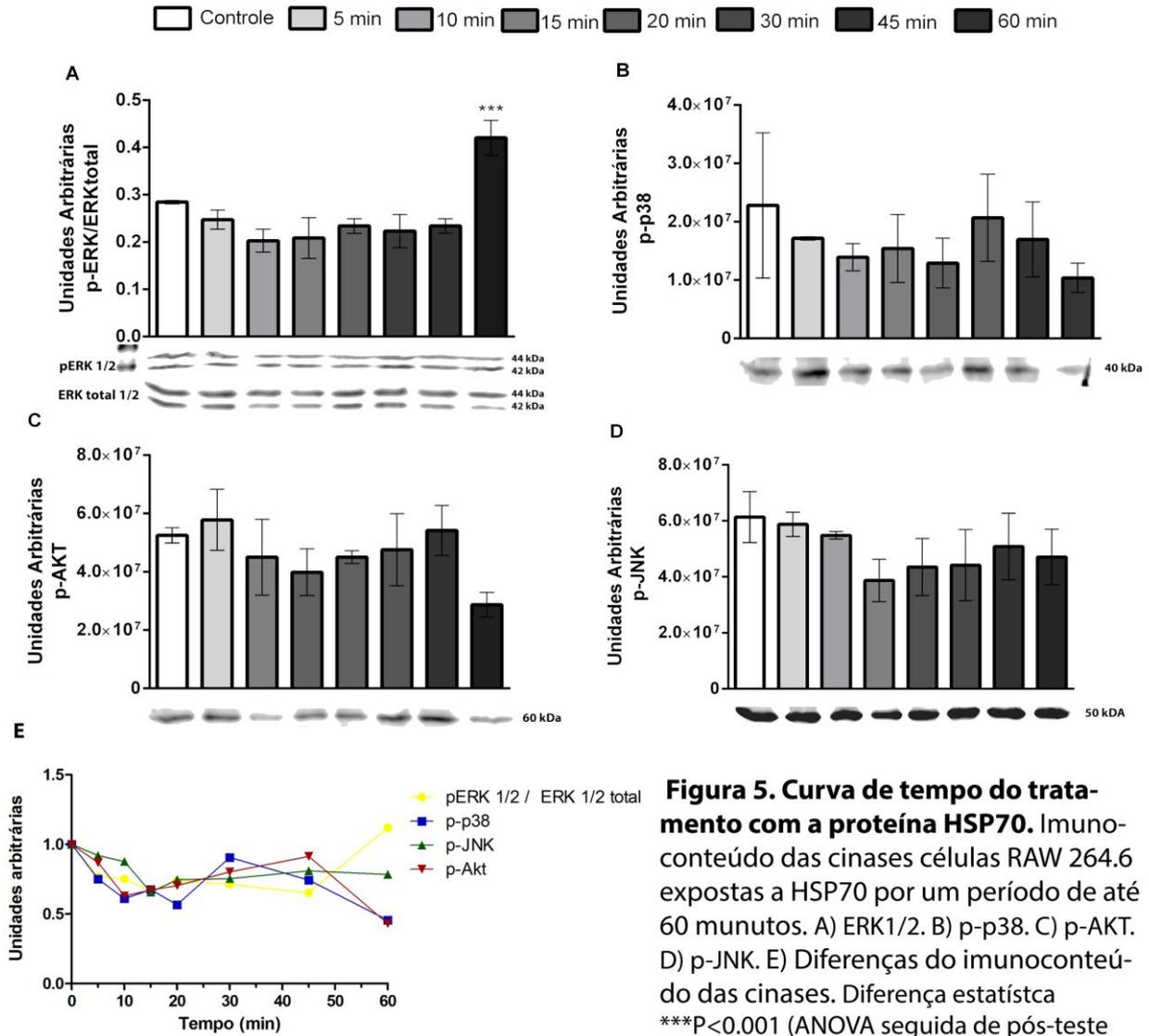


Figura 5. Curva de tempo do tratamento com a proteína HSP70. Imunoconteúdo das cinases células RAW 264.6 expostas a HSP70 por um período de até 60 minutos. A) ERK1/2. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. E) Diferenças do imunoconteúdo das cinases. Diferença estatística *** $P < 0.001$ (ANOVA seguida de pós-teste Tukey).

Figura 6

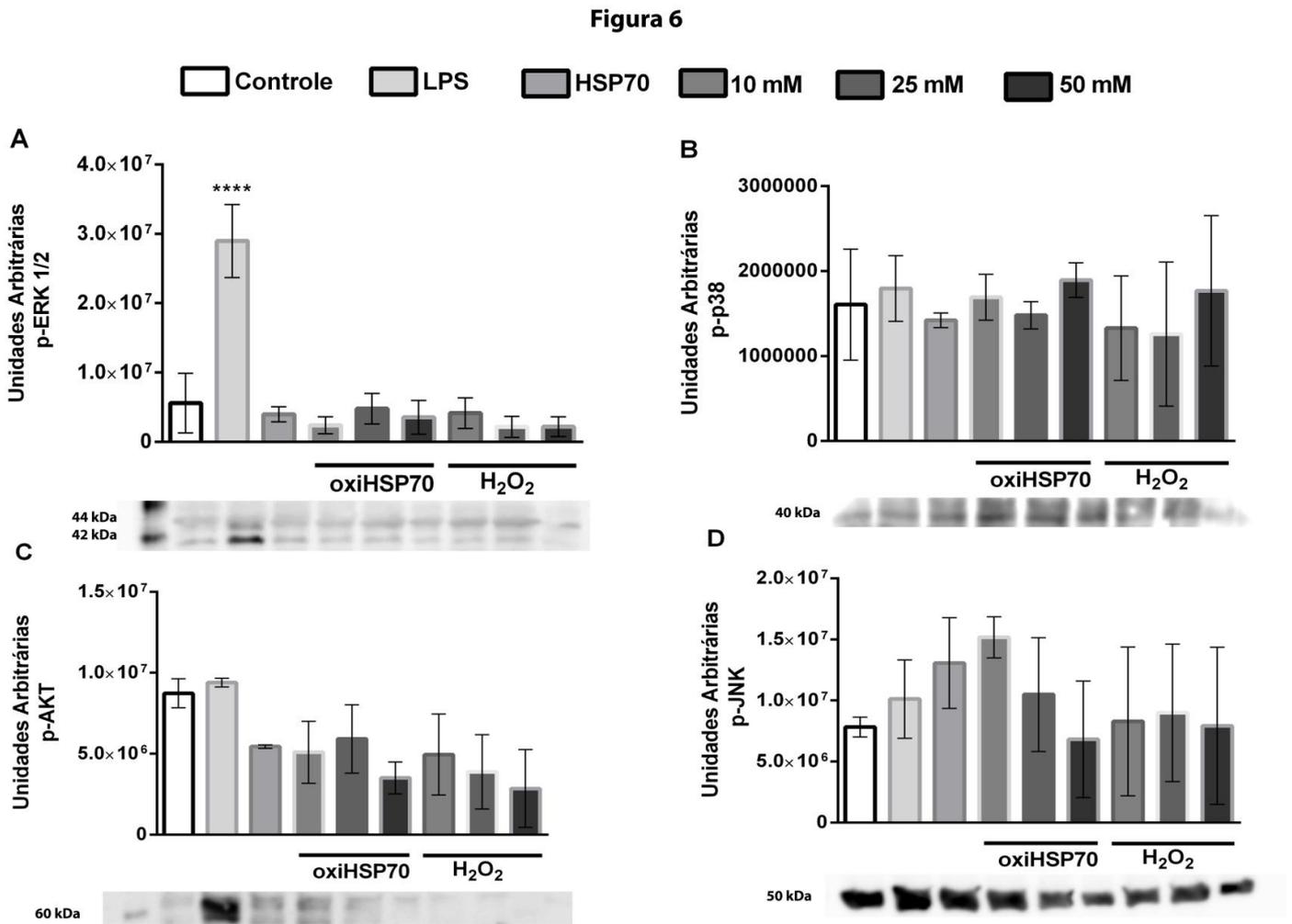


Figura 6 HSP70 oxidada. Western blot das cinases provenientes do tratamento de 20 minutos das células RAW 264.7. A) p-ERK. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. ****P<0.0001 (ANOVA seguido de pós-teste Tukey).

Figura 7

Figura 7

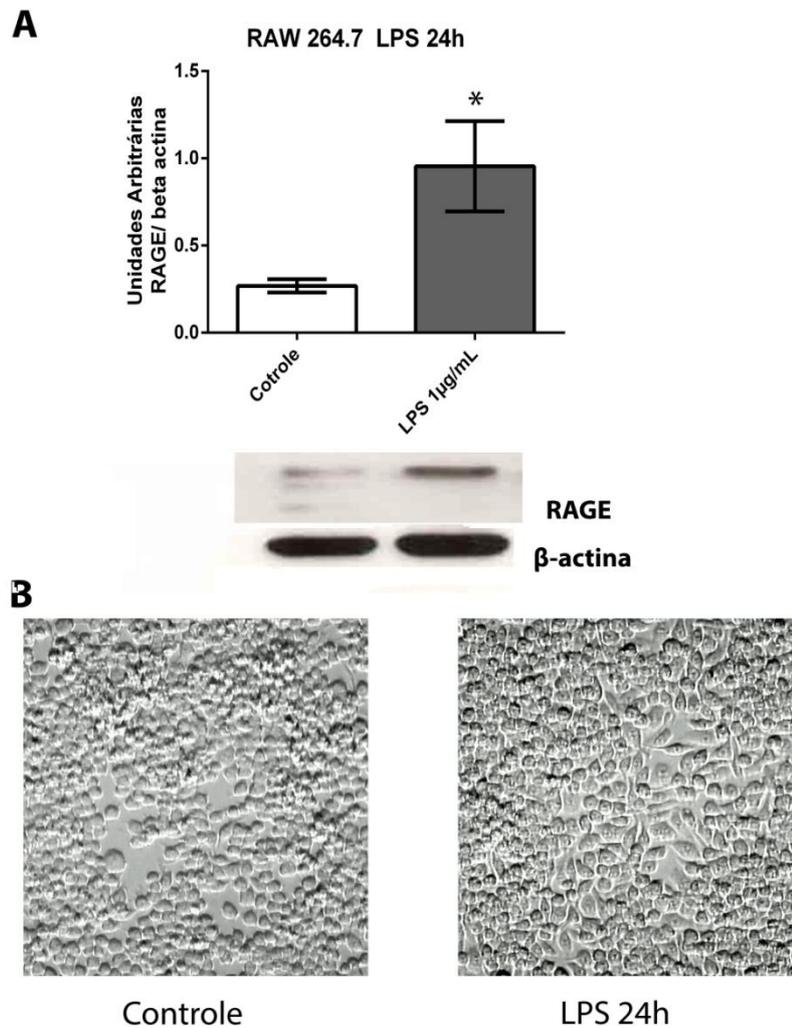


Figura 7. Imunoconteúdo de RAGE em RAW 264.6. A) As células foram tratadas por 24h com LPS; o imunoconteúdo de RAGE foi analisado por western blot. * $P < 0.05$ (Teste t não paramétrico). B) Microscopia das células.

Figura 8

Figura 8

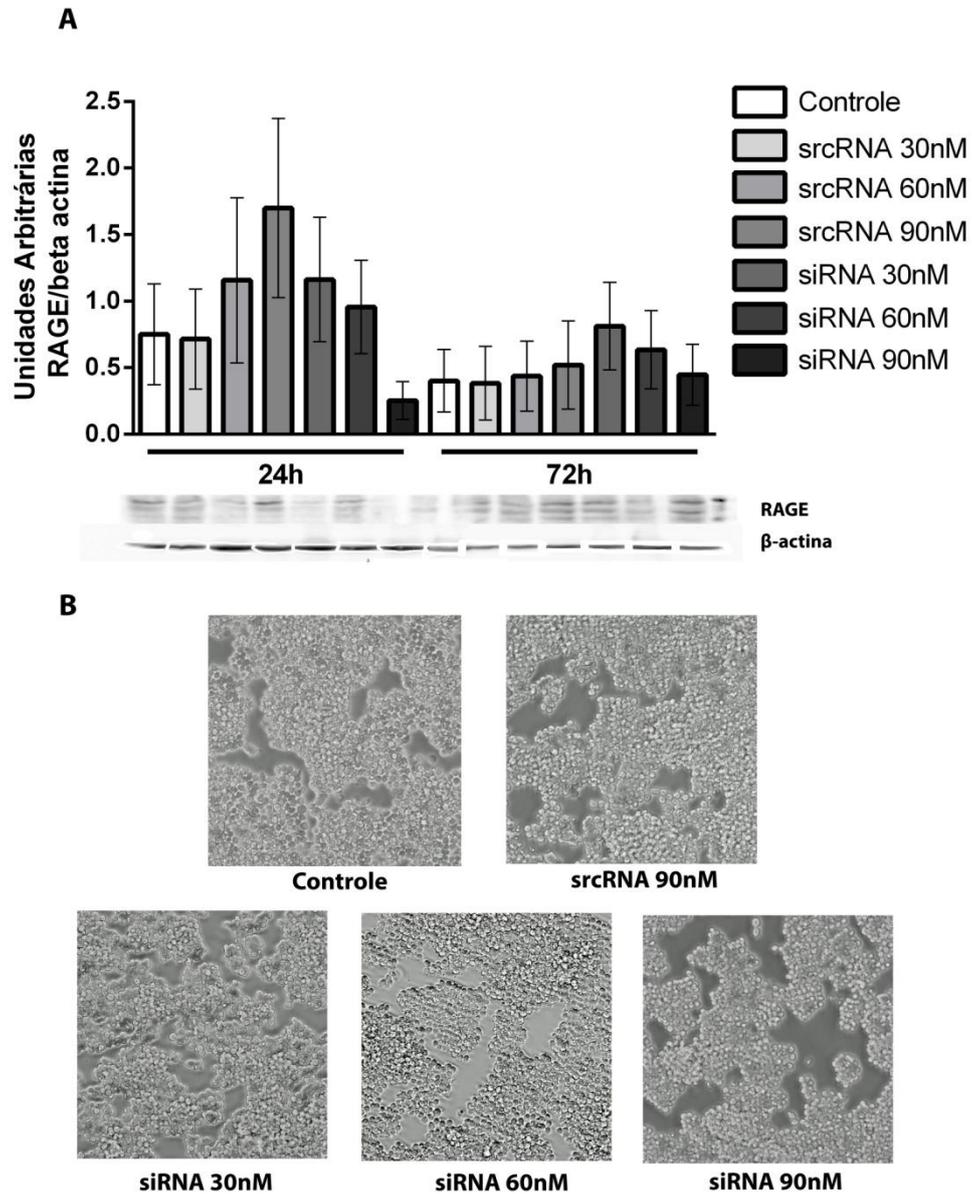


Figura 8. Silenciamento 1 de RAGE . A) Silenciamento por 24h e 72h realizado com três diferentes concentrações de si RNA (30, 60, 80nM); o controle negativo (srcRNA) também foi usado nestas concentrações. Teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste Tukey. B) Microscopia das células em 72h de tratamento (aumento 20x)

Figura 9

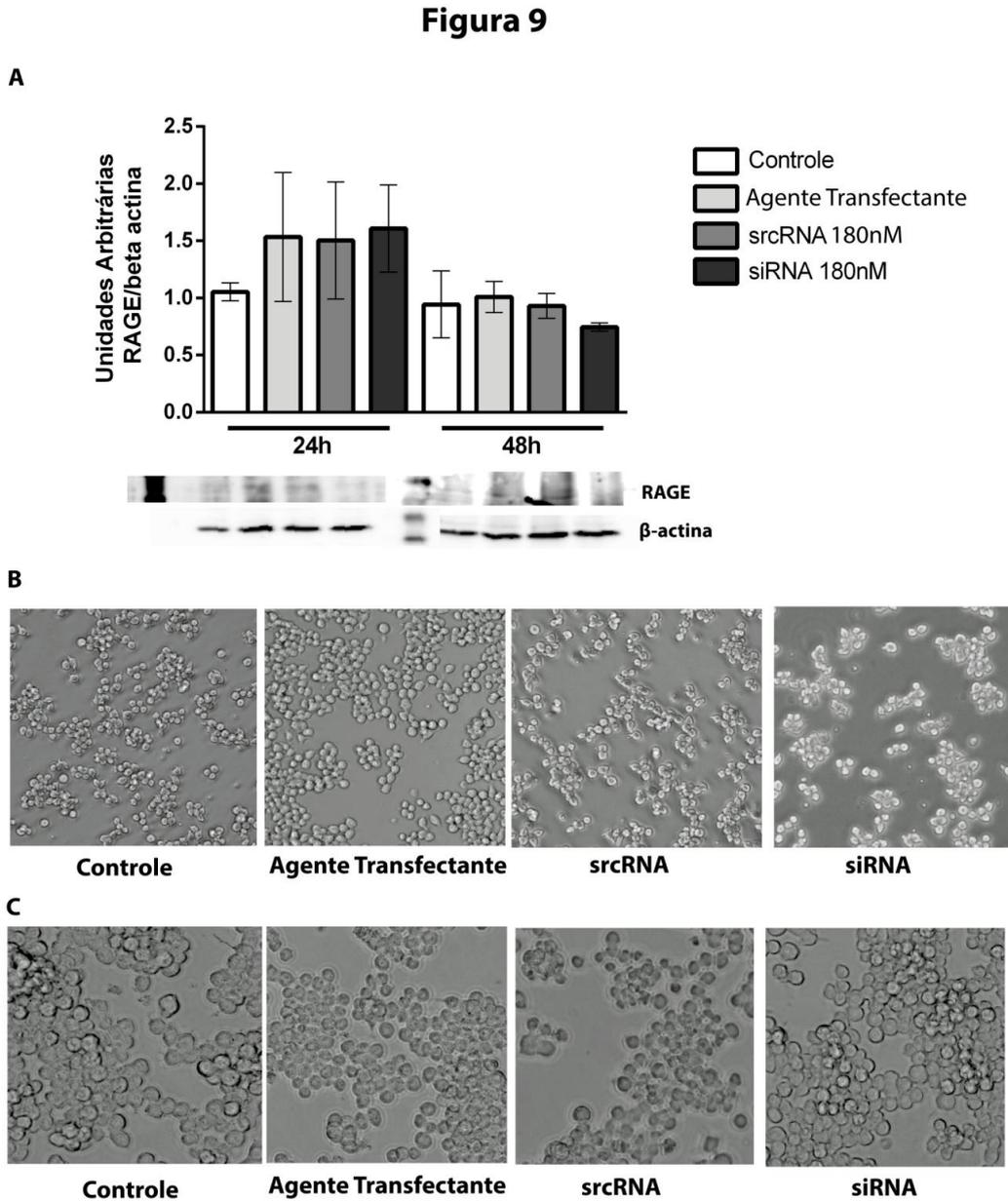


Figura 9. Silenciamento 2 de RAGE. Silenciamento de RAGE utilizando o agente transfectante também como controle, além do controle negativo. A) Imunodeteção de RAGE normalizado com beta actina, por western blot. Teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste Tukey). B) Microscopia das células em 24h de tratamento (aumento 20X). C) Microscopia das células em 48h de tratamento (aumento 40x).