



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LÍGIA ARAUJO BARBOSA

MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E AUTOFAGIA DE
LINFÓCITOS T POR RAGE

Araraquara

2014



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LÍGIA ARAUJO BARBOSA

MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E AUTOFAGIA DE
LINFÓCITOS T POR RAGE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia - Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

Co-orientadora: Dra. Sabrina Garcia de Aquino

Araraquara

2014

Barbosa, Lígia Araujo

Modulação da proliferação, apoptose e autofagia de linfócitos T por RAGE / Lígia Araújo Barbosa - Araraquara: [s.n.], 2014.

94 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Imunidade adaptativa 2. Linfócitos T 3. Produtos finais de glicosilação I.Título

LÍGIA ARAUJO BARBOSA

MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E AUTOFAGIA DE
LINFÓCITOS T POR RAGE

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º examinador: Prof. Dr. Guiseppe Alexandre Romito

3º examinador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 21 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

LÍGIA ARAUJO BARBOSA

NASCIMENTO: 20 de novembro de 1984

FILIAÇÃO: Ubirajara Soares Barbosa

Maria Christina Araujo Barbosa

2004 – 2008: Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da

Bahia, Salvador- BA, Brasil

2008 – 2010: Especialização em Periodontia

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP),

Salvador- BA, Brasil

2012 – 2014: Pós-graduação em Odontologia – Área de Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara da

Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, Brasil

*Aos meus pais, Bira e Christina, por todo
amor e fé depositados em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Carlos Rossa Junior, pela paciência, confiança em meu trabalho e enorme oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

A minha co-orientadora, Dra. Sabrina Garcia de Aquino, por ter “colocado a mão na massa” e se empenhado tanto em compartilhar (um pouco) de todo seu conhecimento em laboratório.

A todos os queridos amigos e colegas de pós-graduação, pela convivência, companheirismo e por tornar o dia-a-dia de trabalho mais fácil.

Aos meus familiares, em especial vovô Manoel (em memória), vovó Miranda, vovô Birão e vovó Rosário (em memória) e os meus irmãos Luiza e Victor, por serem o meu alicerce.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) pelas oportunidades oferecidas a todos nós, alunos de pós-graduação.

Aos docentes da disciplina de Periodontia dessa faculdade, pelos conhecimentos compartilhados e pela contribuição em minha formação.

Aos funcionários da faculdade, em especial a Claudinha, o Leandro, a Zezé, a Isa e a Mara pela atenção, competência e por serem imprescindíveis para o desenvolvimento do nosso trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fornecido ao projeto, por meio da concessão de auxílio à pesquisa (processo # 2011/06664-2) e bolsa de estudos.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação e no desenvolvimento desse trabalho.

*“O único verdadeiro progresso é o interior.
O progresso material é um nada.”*

Julien Green

Barbosa LA. Modulação da proliferação, apoptose e autofagia de linfócitos T por RAGE [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

RAGE (*Receptor for advanced glycation endproducts*) é um receptor de padrões moleculares (PRR) reconhecido principalmente por seu envolvimento na patogênese de complicações secundárias do Diabetes Mellitus. Sua ativação está relacionada à modulação da resposta imune-inflamatória, promovendo ativação, migração e maturação de leucócitos; e induzindo a liberação de citocinas inflamatórias. A sinalização via RAGE também está relacionada à regulação dos processos de sobrevivência, apoptose e autofagia celular. Pouco se sabe sobre o papel de RAGE na regulação desses processos em células da resposta imune adaptativa e, especificamente, em linfócitos T. Nosso objetivo foi avaliar a influência da ativação de RAGE na biologia de células T. Para isso, observamos seus efeitos na modulação da proliferação, apoptose e autofagia, e a contribuição da ativação de NF- κ B na indução desses processos. Células de linhagem de linfócitos T (JM/Jurkat) foram estimuladas com os ligantes de RAGE BSA-AGE (100 e 200 μ g/mL) e S100b (10 μ g/mL). A estimulação também foi realizada mediante a pré-ativação do receptor de células T (TCR). Experimentos de ganho de função foram realizados por meio da transfecção transitória das células com um vetor plasmidial de RAGE. A proliferação celular foi determinada por ensaio de exclusão com azul de Trypan. A apoptose foi avaliada através da detecção da fragmentação do DNA pelo método TUNEL e da expressão de p53, Bax e Bcl-2 por Western blot. Ainda por Western blot, observamos a expressão de proteínas características do processo de autofagia, p62 e LC3; e de p50, subunidade do fator de transcrição NF- κ B. O estímulo com BSA-AGE e S100b não alterou a proliferação e a viabilidade, mas, em células transfectadas, esse estímulo tendeu a aumentar a proliferação e a viabilidade, sobretudo após a pré-ativação das células. O BSA-AGE e o S100b produziram efeitos distintos sobre a apoptose a depender da pré-ativação e do período experimental avaliado. O estímulo com os agonistas de RAGE atenuaram a inibição de LC3 e p53 induzida pela camptotecina. Efeito de “resgate” semelhante foi verificado na expressão de p50. O estímulo de RAGE parece favorecer a

proliferação e a autofagia de linfócitos T. Os seus efeitos sobre a apoptose variam de acordo com o tipo, concentração e período de exposição ao ligante utilizado.

Palavra-chaves: Imunidade adaptativa, Linfócitos T, Produtos finais de glicosilação.

Barbosa LA. Modulation of proliferation, apoptosis and autophagy of T lymphocytes by RAGE [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

RAGE (*Receptor for advanced glycation endproducts*) is a pattern recognition receptor (PRR) that is especially recognized for its involvement in the pathogenesis of secondary complications of Diabetes Mellitus. Its activation is related to the modulation of immune-inflammatory responses, by promoting activation, maturation and migration of leukocytes, as well as the induction of inflammatory cytokines. RAGE signaling is also related to the regulation of cellular processes like survival, apoptosis and autophagy. Little is known about the role of RAGE in the regulation of these processes in cells of the adaptive immune response, specifically in T lymphocytes. Our main purpose was to evaluate the influence of RAGE activation in T cell biology. We observed the role of this receptor in the modulation of proliferation, apoptosis and autophagy, and the contribution of NF- κ B in the induction of these processes. A human cell line of T lymphocytes (JM/ Jurkat) were stimulated with the RAGE ligands: BSA-AGE (100 and 200 μ g/mL) and S100B (10 μ g/mL). The stimulation was also performed after pre-activation of the T cell receptor (TCR). Gain of function experiments were performed by transient transfection of cells with a plasmid vector to increase RAGE expression. Cell proliferation was determined by Trypan blue dye exclusion assay. Apoptosis was assessed by the detection of DNA fragmentation by the TUNEL method, and p53, Bax and Bcl-2 expression by Western blotting. Also by Western blotting, we observed the effect of RAGE on the expression of autophagy-related proteins, p62 and LC3, and on the expression of p50, subunit of the transcription factor, NF- κ B. The stimulation with BSA- AGE and S100b did not alter the proliferation and viability, but, in transfected cells, this stimulation tended to increase proliferation and viability, especially after the cell pre-activation. BSA-AGE and S100b had distinct effects on apoptosis depending on the cell pre-activation and trial period evaluated. The stimulation with agonists of RAGE attenuated the inhibition of LC3 and p53 induced by camptothecin. Similar effect was observed in the expression of p50. The stimulation of RAGE seems to favor the proliferation and

autophagy of T lymphocytes. Its effects on apoptosis may vary according to the type, concentration and period of exposure to the ligand used.

Keywords: Adaptive immunity, T-Lymphocytes, Advanced glycosylation end products

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES – Produtos finais de glicação avançada

Bax – Proteína X associada ao Bcl-2

Bcl2 – Proteína do linfoma de células B 2

BSA-AGE – AGE sintetizado a partir de albumina sérica bovina

CMV – Citomegalovirus

CTP – Camptotecina

DAMPS – Padrões moleculares associados ao dano

ERK 1/2 – Kinase controlada por sinais extracelulares 1/2

HMGB1 – Proteína do grupo de alta mobilidade Box 1

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1

IL – Interleucina

INF- γ – Interferon gama

JNK – Kinase N-terminal c-Jun

LC3 – Proteína de cadeia leve 3 associada à microtúbulos

LPS – Lipopolissacarídeo

Mac-1 – Antígeno de macrófago 1

MAPK – Kinase protéica ativada por mitógeno

M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos

MEK – Kinase-kinase protéica ativada por mitógeno

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

p38 MAPK – Kinase protéicas ativadas por mitógeno p38

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos

PI3K – Fosfatidilinositol 3-kinase

PKC – Proteína kinase C

PRR – Receptor de reconhecimento padrão

RAGE – Receptor de produtos finais de glicação avançada

ROS – Espécie reativas de oxigênio

sRAGE – RAGE solúvel

Src – Kinase derivada de sarcoma

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TCR – Receptor de célula T

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta

Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2

Th17 – Linfócito T auxiliar tipo 17

TLR – Receptor do tipo Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócito T regulatório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Diabetes é um importante problema de saúde pública devido às complicações associadas, as quais são decorrentes da modulação da resposta imune	16
1.2 O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE): características e funções biológicas	18
1.3 A ativação de RAGE por ligantes diferentes resulta em respostas celulares diversas	22
1.4 Sinalização via RAGE está relacionada à resposta imune e inflamatória e ao processo de proliferação celular	26
1.5 A ativação de RAGE influencia os processos de apoptose e autofagia	31
2 PROPOSIÇÃO	36
3 MATERIAL E MÉTODO	38
3.1 Ligantes de RAGE	38
3.1.1 Preparo do BSA-AGE.....	38
3.1.2 S100b.....	38
3.2 Manutenção da linhagem celular	39
3.3 Pré-ativação celular	39
3.4 Transfecção – experimentos de ganho de função de RAGE	40
3.4.1 Transformação bacteriana.....	41
3.4.2 Amplificação do plasmídeo.....	42
3.4.3 Purificação do plasmídeo.....	42
3.4.4 Transfecção.....	43
3.5 Proliferação e viabilidade celular	43
3.6 Citometria de fluxo – modulação da apoptose	45
3.7 Western blot - modulação dos processos de autofagia e apoptose	46

3.8 Análise estatística.....	48
4 RESULTADO.....	49
4.1 Eficiência da transfecção/eletroporação.....	49
4.2 Avaliação da proliferação e viabilidade após estímulo com ligantes de RAGE.....	51
4.3 Avaliação da influência de RAGE na apoptose induzida.....	54
4.4 Avaliação da apoptose após estímulo de RAGE – Método TUNEL.....	56
4.5 Avaliação da influência do estímulo de RAGE na apoptose induzida – Método TUNEL.....	61
4.6 Modulação da expressão de proteínas relacionadas a apoptose e autofagia.....	66
4.7 Modulação da ativação de NF-κB após estímulo com ligantes de RAGE.....	70
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes é um importante problema de saúde pública devido às complicações associadas, as quais são decorrentes da modulação da resposta imune.

Estimativas recentes indicam que o diabetes afeta cerca de 13% da população com mais de 20 anos de idade, sendo que aproximadamente 40% dos casos não são diagnosticados. Entre adultos acima de 60 anos estas proporções aumentam para 30% de portadores, incluindo 46% dos casos não diagnosticados (Cowie et al.¹³, 2009)

O Diabetes Mellitus e suas complicações representam uma das principais causas de mortalidade e morbidade nos EUA (Engelgau et al.²⁰, 2004), com custos econômicos associados às despesas de assistência médica e redução da capacidade produtiva destes pacientes na ordem de US\$ 174 bilhões em 2007 (American Diabetes Association³, 2008). As complicações cardiovasculares associadas ao diabetes representam a principal causa de mortalidade nestes pacientes (Mooradian⁶³, 2003). De fato, a presença de diabetes não apenas é considerada um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, como também amplifica o risco associado a outros fatores de risco clássicos, como a hipertensão, fumo e hipercolesterolemia (Stamler et al.⁸⁴, 1993; Whiteley et al.⁹⁹, 2005), ainda que os mecanismos biológicos dessa relação não sejam completamente conhecidos (Sun et al.⁸⁵, 2009).

Especificamente em relação às doenças periodontais, existem abundantes evidências epidemiológicas indicando maior severidade e extensão de

destruição periodontal em pacientes com diabetes, sendo a doença periodontal considerada uma das complicações “clássicas” (King⁴⁷, 2008). A relação causal entre a presença do diabetes e estas complicações é demonstrada por estudo de intervenção longitudinal com mais de 25 anos de acompanhamento, em que o melhor controle metabólico resultou em significativa redução da incidência de complicações microvasculares e neurológicas (Kilpatrick et al.⁴⁶, 2009). De forma similar, pacientes portadores de diabetes com melhor controle metabólico não apresentam maior severidade de doença periodontal (Tsai et al.⁹², 2002); e a resposta ao tratamento periodontal nestes pacientes é similar a de pacientes sem diabetes (Christgau et al.¹², 1998).

A relação diabetes-resposta imune é complexa e recíproca, com diversas possibilidades de convergência das vias metabólica e inflamatória em múltiplos níveis (Hotamisligil, Erbay³¹, 2008). Por exemplo, a resposta imune tem papel etiológico no diabetes tipo 1, que é uma condição resultante do ataque de linfócitos T às células beta produtoras de insulina do pâncreas (Li et al.⁵³, 2009), e possivelmente no diabetes tipo 2 em que níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios como IL-6 e proteína C-reativa são associados a maior risco de desenvolvimento do diabetes (Pradhan et al.⁷⁶, 2001). Por outro lado, a presença de diabetes também modula a resposta imune, como demonstrado pela menor resistência à infecção nesses pacientes (Peleg et al.⁷⁴, 2007) e pela inibição da função de polimorfonucleares na resposta imune inata (Delamaire et al.¹⁶, 1997). Reciprocamente, a resposta imune/inflamatória pode inibir eventos moleculares relacionados à atividade biológica da insulina, exercendo um papel crucial no metabolismo da glicose (Hotamisligil, Erbay³¹, 2008).

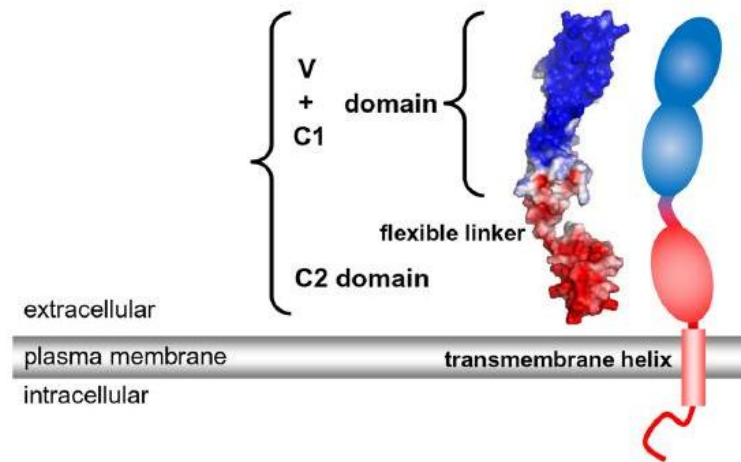
Em resumo, estas informações indicam a existência de uma importante interrelação entre o diabetes e a resposta imune, sendo esta relação a responsável pelas complicações associadas ao diabetes.

1.2 O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE): características e funções biológicas

O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana unipasso do tipo I pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Ig) (Neeper et al.⁶⁹, 1992). Em humanos, o seu gene está localizado na região do complexo maior de histocompatibilidade de classe III (MHC III) do cromossomo 6 e é composto por 11 exons e cerca de 1400 pares de bases (Hudson et al.³², 2008).

Sua estrutura completa é composta por uma cadeia de 404 aminoácidos, contendo 3 domínios principais: um extracelular de reconhecimento e ligação, uma hélice transmembrana e um domínio C-terminal citoplasmático (ctRAGE), necessário para a transdução de sinais (González et al.²⁵, 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando a estrutura da molécula de RAGE (Fonte: Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013).



A porção extracelular é formada por 3 domínios de Ig, sendo um domínio V (variável) na extremidade aminoterminal, seguido por dois domínios C (constantes), denominados C1 e C2. O domínio V forma com C1 o domínio em tandem VC1, carregado positivamente, que funciona como uma unidade funcional onde ocorre a ligação do receptor com a maioria dos seus ligantes. O domínio C2 apresenta carga predominantemente negativa e não parece contribuir muito na adesão aos ligantes (Fritz²², 2011).

Além da proteína completa (*full-length RAGE*), variações no splicing do RNAm resultam em mudanças no receptor e mais de 20 produtos de splicing alternativo de RAGE já foram descritos (Hudson et al.³², 2008).

Dos variantes identificados em humanos, o mais prevalente é o RAGE_v1 (conhecido também como sRAGE, esRAGE, hRAGEsec ou RAGE C-truncado), que codifica uma proteína solúvel que não possui os domínios transmembrana e citoplasmático (Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013). Esse isotipo também pode ser produzido por clivagem proteolítica (Galichet et al.²³, 2008; Zhang et al.¹⁰⁹, 2008). O RAGE solúvel parece funcionar como um regulador da sinalização via RAGE, pois

age como um “receptor falso”, prevenindo a interação dos ligantes com o receptor completo ancorado na membrana citoplasmática das células e, dessa forma, é capaz de reduzir ou mesmo reverter os efeitos da ativação de RAGE (Nishizawa, Koyama⁷¹, 2008; Park et al.⁷³, 1998).

Outras importantes variantes de splicing, RAGE_v4 e RAGE_v5, apresentam uma deleção ou uma inserção na região N-terminal, onde ocorre a ligação do receptor com seus ligantes (Hudson et al.³², 2008; Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013). Essas isoformas são expressas na superfície das células, mas são incapazes de transmitir a sinalização porque não possuem um domínio de adesão aos ligantes (Nishizawa, Koyama⁷¹, 2008). Apesar de não funcionais, o seu papel biológico também parece estar relacionado à regulação da sinalização via RAGE, possivelmente pela interferência na formação de oligômeros entre moléculas completas de RAGE, o que impediria a estabilização de um complexo proteico competente para transmitir a sinalização celular (Fritz²², 2011).

Diferente de outros receptores, a ativação de RAGE é induzida pelo reconhecimento de características tridimensionais nos ligantes e não por uma sequência específica de aminoácidos (Fritz²², 2011; Koch et al.⁴⁹, 2010). Na ausência de ligantes, RAGE é encontrado na forma de oligômeros de pelo menos 4 moléculas na membrana plasmática, formando agrupamentos (Xie et al.¹⁰¹, 2008). Quando há a adesão a algum ligante, uma alteração no equilíbrio da membrana favorece a estabilização desse arranjo, o que leva a mudanças de conformação na porção intracelular da molécula de RAGE, permitindo que se inicie a cascata de sinalização (Ostendorp et al.⁷², 2007).

Em condições fisiológicas, RAGE é expresso por diversos tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, sendo suprimido nos

tecidos ao seu término, com exceção dos pneumócitos tipo I, que permanecem expressando constitutivamente altos níveis desse receptor ao longo da vida (Bierhaus et al.⁴, 2005). Por outro lado, em estados patológicos como diabetes, desordens neurodegenerativas ou inflamação crônica, a expressão de RAGE é substancialmente aumentada em vários tecidos devido à regulação positiva induzida por seus ligantes (Sorci et al.⁸², 2013).

As consequências funcionais da ativação de RAGE são complexas e influenciadas por uma série de fatores, sobretudo a natureza e a concentração do ligante, a presença de outros ligantes ou de correceptores, o tipo e o contexto celular em questão e suas vias de sinalização estabelecidas (Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013). Essa ativação poderá levar à regulação da transcrição de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas, enzimas pró-inflamatórias e moléculas de adesão; bem como ativar os processos de proliferação, migração, diferenciação, fagocitose, apoptose e autofagia celular (Sorci et al.⁸², 2013; Xie et al.¹⁰², 2013).

A diversidade de efeitos da ativação de RAGE e o fato de ser ativado por diferentes moléculas relacionadas ao dano celular sugere que esse receptor apresenta funções biológicas relacionadas principalmente a estados patológicos (Bierhaus et al.⁴, 2005). Entretanto, evidências recentes apontam para uma possível participação desse receptor também em condições de homeostase, reparo e regeneração (Sorci et al.⁸², 2013).

Coletivamente, essas informações indicam que RAGE tem funções biológicas relevantes para a resposta do hospedeiro e papel fundamental no diabetes, condição fortemente relacionada às doenças periodontais.

1.3 A ativação de RAGE por ligantes diferentes resulta em respostas celulares diversas

RAGE é comumente descrito como um receptor de padrões moleculares (*pattern recognition receptor* ou *PRR*), semelhante aos receptores do tipo Toll. Porém, diferente de outros PRR, RAGE é capaz de reconhecer uma grande diversidade de ligantes que possuem características estruturais em comum (Fritz²², 2011; Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013).

Os primeiros ligantes descritos de RAGE foram os produtos finais de glicação avançada (*advanced glycosylation end products* ou *AGES*), compostos protéicos ou lipídicos gerados por glicosilação não-enzimática que se acumulam no tecido vascular durante o envelhecimento e, de forma mais acelerada, em indivíduos diabéticos (Neeper et al.⁶⁹, 1992). A glicosilação é um processo no qual açúcares redutores ou seus metabólitos reagem, através de grupos aldeído funcionais, com grupos amino ou guanidina livres de resíduos de lisina ou de arginina de proteínas plasmáticas, produzindo ligações cruzadas (Mahali et al.⁶¹, 2011). Esses produtos posteriormente sofrem outras mudanças por rearranjos, oxidações e ligações com outros AGES, ampliando a heterogeneidade desse grupo de compostos (Fritz²², 2011). Nem todos os AGES interagem com RAGE. Dentre os compostos caracterizados dessa classe, sabe-se que a carboximetilisina (CML-AGE) é um importante ativador da sinalização via esse receptor (Kislinger et al.⁴⁸, 1999).

Além dos AGES, dentre os ligantes de RAGE estão moléculas pró-inflamatórias de origem endógena liberadas no meio extracelular em decorrência de dano tecidual ou de processos infecciosos e inflamatórios, conhecidos como DAMPS (*damage-associated molecular pattern*) (Popa et al.⁷⁵, 2012). Essas moléculas

incluem a proteína HMGB1 (*high mobility group box 1* ou anfoterina), proteínas da família S100/calgranulina e o peptídeo beta-amilóide (Abeta ou A β) (González et al.²⁵, 2013).

HMGB1 é uma proteína altamente conservada, expressa em praticamente todas as células eucarióticas e que, inicialmente, foi descrita como uma proteína não-histona associada à cromatina (Goodwin et al.²⁶, 1977). Atualmente, sabe-se que ela pode apresentar outras funções biológicas a depender de sua localização (Li et al.⁵⁴, 2013). No núcleo das células, HMGB1 age como uma chaperona, estabilizando a formação de nucleossomas e promovendo o acesso de fatores de transcrição a genes específicos (Müller et al.⁶⁸, 2001; Thomas⁹¹, 2001). Livre no citoplasma, seu papel parece estar relacionado à regulação do processo de autofagia em resposta ao estresse ambiental ou intracelular (Tang et al.⁹⁰, 2010). Essa proteína também pode ser secretada no meio extracelular por células inflamatórias e, de forma passiva, por células necróticas e, nesse caso, age como uma citocina, ativando a resposta imune-inflamatória pela interação com diferentes receptores, inclusive RAGE (Li et al.⁵⁴, 2013). Os efeitos da interação de RAGE com HMGB1 foram observados em condições inflamatórias como artrite reumatoide e sepse, assim como em alguns tipos de câncer (Sparvero et al.⁸³, 2009).

A família de proteínas S100 é composta por 20 membros expressos exclusivamente em vertebrados que possuem a capacidade de ligação a íons cálcio por meio de sítios *EF-hand* (Sparvero et al.⁸³, 2009). A ligação do cálcio nessas regiões ocasiona mudanças na estrutura da proteína S100, expondo um domínio de ligação hidrofóbico que permite sua interação com proteínas alvo e, dessa forma, elas regulam a atividade de moléculas envolvidas em funções celulares como homeostase de cálcio, crescimento e diferenciação celular, dinâmica do

citoesqueleto, transcrição e metabolismo energético (Leclerc et al.⁵¹, 2009). Além do cálcio, algumas dessas proteínas podem interagir com zinco e cobre (Heizmann et al.²⁹, 2007).

Os diferentes membros dessa família de proteínas apresentam padrões de expressão específicos de acordo com o tecido e o tipo celular (Ostendorp et al.⁷², 2007). A maioria das proteínas S100 existe no interior das células como homodímeros ligados de forma não covalente, embora alguns membros possam formar heterodímeros ou oligômeros de até 8 subunidades (Donato¹⁷, 2001). Algumas também podem ser secretadas, passando a funcionar como citocinas e quimiocinas (Fritz²², 2011). No ambiente extracelular, onde a concentração de cálcio é normalmente elevada, essas proteínas se encontram permanentemente carregadas com esse íon, o que é um pré-requisito para sua interação com RAGE (Leclerc et al.⁵¹, 2009). Nem todos os membros da família S100 são ligantes de RAGE. Dentre as que proteínas demonstraram interagir com esse receptor in vivo e in vitro estão: S100B, S100P, S100A1, S100A2, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7, S100A8/A9, S100A11, S100A12 e S100A13 (Leclerc et al.⁵¹, 2009).

O S100B é sintetizado por astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann e está presente principalmente no cérebro, onde é responsável pela regulação da plasticidade sináptica (Nishiyama et al.⁷⁰, 2002). No ambiente intracelular, essa proteína modula o arranjo de microtúbulos e regula o ciclo celular por meio da interação com fatores de transcrição (Ostendorp et al.⁷², 2007). Quando secretado, seus efeitos parecem variar de acordo com a concentração no meio extracelular: enquanto níveis nanomolares resultam em efeito neuroprotetor, concentrações micromolares parecem favorecer a apoptose celular (Huttunen et al.³⁵, 2000; Businaro et al.⁶, 2006). Níveis elevados dessa proteína foram detectados

após trauma cerebral e em desordens neurodegenerativas como síndrome de Down, doença de Alzheimer e encefalomielite (Griffin et al.²⁷, 1998; Mrak, Griffin⁶⁶, 2001).

O peptídeo beta-amilóide é um peptídeo neurotóxico derivado da clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (PPA) (González et al.²⁵, 2013). Essa molécula tende a se agregar inicialmente como fibrilas amilóides e, posteriormente, formando placas amilóides, cujo acúmulo no cérebro representa a marca da doença de Alzheimer (Fritz²², 2011; Sparvero et al.⁸³, 2009). O A β pode se localizar no interior dos neurônios ou no meio extracelular, o que é um achado comum em estágios avançados de neurodegeneração (Khandelwal et al.⁴⁴, 2011). Foi demonstrado que sua ligação a RAGE em neurônios leva à expressão do fator estimulador de colônias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) pela ativação do fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- κ B) (Du Yan et al.¹⁹, 1997). Além disso, a relevância interação do A β com RAGE na patogênese de desordens neuronais também parece estar relacionada à indução da resposta inflamatória envolvendo a ativação de micróglias (Yan et al.¹⁰⁴, 1996).

O RAGE também pode interagir com o componente da família β 2 integrina, Mac-1, e com a molécula de adesão ICAM-1, auxiliando o recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio (Chavakis et al.⁷, 2003). Mais recentemente, outros ligantes de RAGE foram descritos. Foi demonstrado que o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é capaz de se ligar a esse receptor, levando à ativação do fator nuclear kB (NF- κ B) e à liberação de TNF- α (Yamamoto et al.¹⁰³, 2011). Oligonucleotídeos CpG de DNA, o componente do sistema complemento, C3a, bem como a proteína HSP70, molécula reconhecida por contribuir com estados de inflamação crônica, também foram relacionados como possíveis ligantes de RAGE (González et al.²⁵, 2013).

A complexidade de RAGE pode ser evidenciada pela diversidade de seus ligantes. Ainda não está muito claro na literatura quais características ou propriedades são comuns a todas essas moléculas, bem como quais circunstâncias são necessárias para o reconhecimento de cada ligante por esse receptor. Não se pode descartar também a possibilidade de existirem outros ligantes que ainda não foram identificados.

1.4 Sinalização via RAGE está relacionada à resposta imune e inflamatória e ao processo de proliferação celular

A interação de RAGE com seus ligantes resulta na ativação de várias vias de sinalização intracelular relevantes para diversos processos da biologia celular.

Essas vias de sinalização incluem as quinases protéicas ativadas por mitógeno (MAPK) como a quinase controlada por sinais extracelulares 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK 1/2), a quinase N-terminal c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK), a quinase-quinase protéica ativada por mitógeno (MEK) e p38; além da via do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3), da família de proteínas kinase derivada de sarcoma (*sarcoma tyrosine kinase*, Src) e a proteína kinase C (*protein kinase C*, PKC) (Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013; Xie et al.¹⁰², 2013). A ativação de RAGE pode resultar na geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), moléculas quimicamente reativas como íons de oxigênio e peróxidos, que também participam da sinalização mediada por esse receptor e podem levar ao estresse

oxidativo pelo aumento da atividade de NADPH oxidase (Clynes et al.¹¹, 2007; Han et al.²⁸, 2011).

A principal consequência da sinalização via RAGE está relacionada à modulação da inflamação pela ativação de fatores de transcrição, dentre os quais se destaca o fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF-κB). Esse complexo proteico funciona como um regulador para a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios, tais como ciclooxygenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina-6 (IL-6), aumentando sua síntese e secreção (Xie et al.¹⁰², 2013). Isso foi observado in vivo, num modelo de remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio em animais com diabetes mellitus do tipo 1, no qual o bloqueio da interação de RAGE com o ligante HMGB1 reduziu significativamente a atividade de NF-κB, a expressão de TNF- α, IL-6 e TGF- β1, bem como o dano ao tecido cardíaco (Volz et al.⁹⁴, 2010). Outros estudos com animais geneticamente deficientes para expressão de RAGE confirmaram haver uma redução na ativação de NF-κB e na expressão de vários genes pró-inflamatórios em comparação com os animais *wild-type*, sob diferentes condições experimentais (Sunahori et al.⁸⁶, 2006; Volz et al.⁹⁵, 2012).

A região promotora do gene de RAGE possui dois sítios de ligação para NF-κB. Portanto, esse fator de transcrição também promove a expressão do RNAm de RAGE e representa um importante mecanismo de feedback positivo para a sinalização através desse receptor (Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013; Fritz²², 2011). Assim, tanto o dano tecidual, com a consequente liberação de ligantes, como a ativação celular da resposta inflamatória via RAGE estimulam a produção de mais moléculas desse receptor, amplificando o sinal inicial e promovendo a manutenção dessa sinalização. Esse fato foi observado em desordens inflamatórias mediadas por

RAGE, como artrite reumatóide (Sunahori et al.⁸⁷, 2006), aterosclerose (Wendt et al.⁹⁸, 2006), distúrbios renais (D'Agati, Schmidt¹⁴, 2010) e neuroinflamação (Fang et al.²¹, 2010).

A participação de RAGE no início e na manutenção da resposta imune inata está bem definida (Bierhaus et al.⁴, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel de RAGE na imunidade adaptativa. Estudos demonstraram que RAGE é expresso por linfócitos B, T e células dendríticas, e sua ativação pode representar uma importante ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo (Yan et al.¹⁰⁵, 2010; Moser et al.⁶⁴, 2007; Ge et al.²⁴, 2005). As primeiras evidências dessa relação vieram de estudos com modelos animais de doenças autoimunes, como a encefalomielite autoimune experimental (Yan et al.¹⁰⁶, 2003), em que a inibição de RAGE em células T CD4⁺ suprimiu a infiltração de células imunes e inflamatórias ao sistema nervoso central e o desenvolvimento de doença, sugerindo papel de RAGE na modulação da produção de quimiocinas e/ou na migração de leucócitos dos vasos para o tecido.

Estudos demonstraram que RAGE é expresso constitutivamente por células T de indivíduos diabéticos (Akirav et al.², 2012) e também induzível pela ativação de TCR em células CD4⁺ e CD8⁺ saudáveis, principalmente do repertório de células de memória (Akirav et al.², 2012; Moser et al.⁶⁴, 2007). Wild et al.¹⁰⁰ (2012) demonstraram ainda a expressão de RAGE em linfócitos T regulatórios (Treg; CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻).

RAGE parece ter influência na infiltração, na proliferação e na diferenciação de células Th1 (Yan et al.¹⁰⁶, 2003; Chen et al.¹⁰, 2004; Moser et al.⁶⁵, 2007; Chen et al.⁹, 2008). Moser et al.⁶⁵ (2007) demonstraram que o bloqueio desse receptor com sRAGE reduziu o recrutamento de linfócitos T e retardou a rejeição ao

tecido enxertado após transplante cardíaco heterotópico, sugerindo que a ativação de RAGE teria um efeito imunoestimulatório. Experimentos *in vitro* suportam esta possível função imunoestimulatória, uma vez que o bloqueio do eixo RAGE suprimiu a resposta proliferativa de linfócitos T (Moser et al.⁶⁵, 2007). Resultados semelhantes foram relatados por Chen et al.⁹ (2008), que observaram, em cultura mista com esplenócitos irradiados, uma redução da proliferação de células T RAGE^{-/-} e de células T *wild type* tratadas com o inibidor de RAGE, TTP488.

A influência de RAGE na diferenciação de célula T efetoras foi observada em um modelo animal de diabetes tipo I, em que o tratamento com sRAGE alterou o fenótipo das células que infiltraram as ilhotas de Langerhans após transferência de esplenócitos diabetogênicos, constatado pelo aumento na expressão de IL-10 e TGF- β . Os animais que receberam esse tratamento apresentaram redução na taxa de transferência do diabetes e na incidência de insulite, novamente sugerindo a participação desse receptor na modulação da resposta imune (Chen et al.¹⁰, 2004). Células T deficientes para expressão de RAGE também exibiram polarização alterada mediante ativação em comparação com células RAGE^{+/+}, com menor produção de IL-2 e INF- γ , características do perfil Th1, e aumento de IL-4 e IL-5, citocinas relacionadas ao perfil Th2 (Moser et al.⁶⁴, 2007). Em concordância com esses resultados, Mu et al.⁶⁷ (2011) demonstraram um desequilíbrio na distribuição das subpopulações de linfócitos T auxiliares durante a progressão da miastenia gravis, doença autoimune caracterizada pelo funcionamento anormal das junções neuromusculares. O estímulo com o ligante S100b nas células T CD4⁺ isoladas de animais com essa doença resultou no aumento da população de células Th1 e Th17 e redução de Th2 e Treg.

No que refere à proliferação celular, estudos mostram que células da imunidade inata e adaptativa, bem como da musculatura lisa vascular (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) respondem à ativação de RAGE induzindo a divisão celular, amplificando a resposta dessas células no contexto de processos imuno-inflamatórios (Sorci et al.⁸², 2013). Em células da musculatura lisa vascular, a proliferação celular induzida por BSA-AGE parece estar relacionada à modulação do fluxo de íons K^+ e Ca^{2+} , por meio da ativação das vias ERK1/2, p38 MAPK, fosfatidilinositol 3-kinase (*phosphatidylinositol-3-kinases*, PI3K) (Zhao et al.¹¹⁰, 2013) e do eixo STAT3- Pim1 (*provirus integration site for Moloney murine leukemia virus*)-fator nuclear de células T ativadas (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT) (Meloche et al.⁶², 2011). Também foi demonstrado que a capacidade das células dendríticas de induzir a ativação e a proliferação de linfócitos T aumentava após o tratamento com BSA-AGE, e que esse efeito era mediado pela ativação de JNK e aumento na expressão de moléculas de adesão e moléculas apresentadoras de antígeno (Ge et al.²⁴, 2005). Por outro lado, em mioblastos, a ativação de RAGE por HMGB1 inibiu a proliferação e estimulou a diferenciação dessas células via Cdc42-Rac-MKK6-p38 MAPK, pelo aumento da regulação do fator de transcrição específico do tecido muscular, miogenina (Sorci et al.⁸¹, 2004).

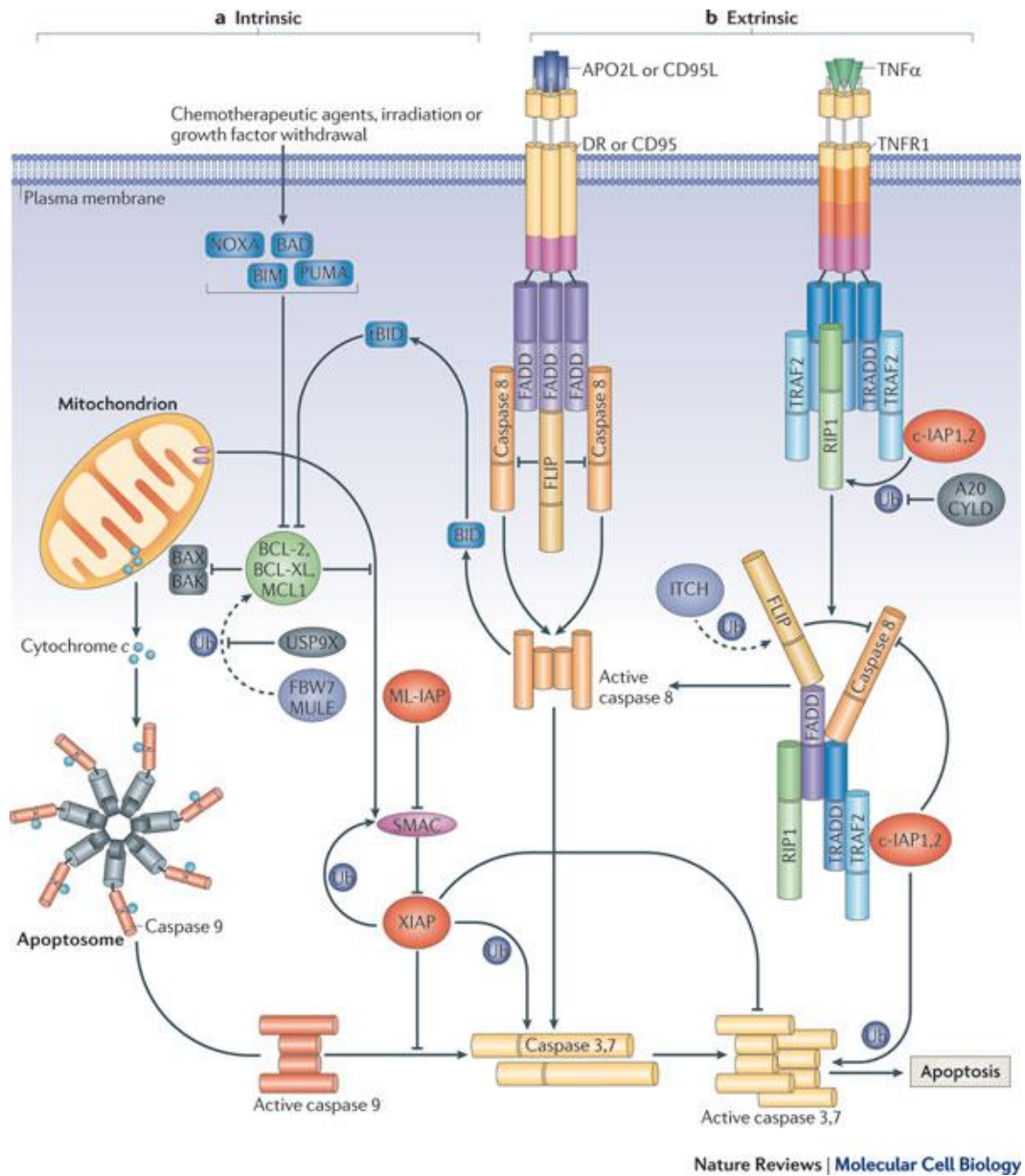
As informações apresentadas indicam que RAGE pode ativar diversas vias de sinalização intracelular relacionadas à expressão de múltiplos mediadores inflamatórios, notadamente, NF- κ B, STAT3 e as MAPKinases. Além disso, a própria expressão de RAGE pode ser regulada por fatores de transcrição (notadamente NF- κ B) ativados na resposta inflamatória, gerando um possível loop de feedback positivo. Existem evidências de que a ativação de RAGE tem importante papel imunoestimulador, tanto na resposta imune inata quanto adaptativa, além de

promover a proliferação celular de linfócitos T, porém estes efeitos são dependentes do tipo celular considerado e do tipo de ligante de RAGE utilizado.

1.5 A ativação de RAGE influencia os processos de apoptose e autofagia

A apoptose é o processo de morte celular programada, que pode ser ativado por dois mecanismos distintos (Figura 2): a via intrínseca (mitocondrial), relacionada à regulação de membros anti ou pró-apoptóticos da família de proteínas do linfoma de células B 2 (*B-cell lymphoma 2*, Bcl2), liberação de proteínas mitocondriais e ativação da cascata das caspases; e a via extrínseca (iniciada por receptor), em que a ligação de receptores de morte (*death receptors*) presentes na membrana celular leva à ativação direta das caspases.

Figura 2 – Representação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Fonte: Vucic et al.⁹⁷, 2011).



O efeito da ativação de RAGE na apoptose pode ser positivo ou negativo a depender do tipo e do contexto celular, bem como do tipo e concentração de ligantes. Por exemplo, enquanto baixas doses de S100A14 promoveram o aumento da proliferação de células de linhagem de carcinoma esofágico pela ativação, via RAGE, de ERK 1/2 e aumento da atividade de NF- κ B; doses elevadas

desse ligante induziram a apoptose dessas células pela via mitocondrial, verificado pela ativação de caspase-9, caspase-3 e poli-ADP-ribose polimerase (Jin et al.³⁹, 2011). Huttunen et al.³⁵ (2000) observaram que altas concentrações do ligante S100B induziam a apoptose de células de neuroblastoma e de glioma, com liberação de citocromo C e ativação de caspase-3; por outro lado, o estímulo em baixas doses resultou em sensibilidade reduzida à apoptose, evidenciado pela indução da expressão de Bcl-2.

O estresse oxidativo induzido pelo aumento da formação de ROS parece ser um dos principais mecanismos envolvidos na regulação da apoptose a partir da ativação de RAGE (Loske et al.⁵⁹, 1998). Esse fato foi demonstrado em alguns tipos celulares, incluindo células endoteliais, células beta do pâncreas e linfócitos T (Lee et al.⁵², 2010; Chen et al.⁸, 2010; Hung et al.³³, 2010). Paradoxalmente, em células cancerígenas pancreáticas, a inibição de RAGE estimulou a formação de ROS e a apoptose, com aumento da atividade de caspases e translocação mitocondrial da proteína X associada ao Bcl-2 (*Bcl2-associated X protein*, Bax) (Kang et al.⁴³, 2011).

A modulação da apoptose por RAGE também parece estar relacionada a regulação da proteína p53, fator de transcrição que pode ser ativado por diferentes insultos genotóxicos e que induz a parada do ciclo celular ou a apoptose (Maiuri et al.⁶⁰, 2007). Em podócitos, o bloqueio de RAGE reduziu a ativação da via p53- Bax e a apoptose intrínseca induzida por produtos protéicos de oxidação avançada (*advanced oxidation protein products*, AOPPs) (Zhou et al.¹¹¹, 2012). Em osteoblastos *knockout* para RAGE, a expressão e a translocação nuclear de p53 e p73 foram aumentadas devido à redução da ubiquitinação e degradação dessas

proteínas, levando ao aumento da apoptose em relação às células sem depleção desse gene (Brune et al.⁵, 2013).

Mahali et al.⁶¹ (2011) descreveram uma nova via apoptótica induzida pela interação AGE- RAGE. Essa cascata de sinalização envolve a liberação de interleucina-8 (IL-8) e ativação de seus receptores (IL-8Rs), aumento de Ca^{++} intracelular, ativação de calcinerina, translocação de NFAT para o núcleo e indução da expressão de Fas ligante (FasL), permitindo, finalmente, a ativação das caspases.

Ao contrário da apoptose, a autofagia constitui-se em um mecanismo de sobrevivência celular, em que organelas e outros componentes citoplasmáticos são sequestrados em vacúolos autofágicos que se fundem com lisossomos para que depois sejam eliminados, permitindo a renovação da célula. Em condições patológicas como inflamação, oxidação lipídica, estresse metabólico e oxidativo, esse processo torna-se notadamente ativo (Heymann³⁰, 2006).

RAGE promoveu a autofagia em células da musculatura lisa vascular (VMSC) e em alguns tipos de células tumorais (Hu et al.³⁴, 2012; Kang et al.⁴¹, 2010; Kang et al.⁴², 2012). Em VSMC, a ativação de RAGE por AGE-BSA induziu a autofagia pela ativação de ERK e inibição da via Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*, mTOR) (Hu et al.³⁴, 2012). A deleção de RAGE em células de linhagem de carcinoma pancreático inibiu a autofagia, verificado pela redução da expressão de LC3 II e da degradação de p62, associado ao aumento da fosforilação de mTOR e à redução da formação de autofagossomos (Kang et al.⁴¹, 2010). Além disso, a indução da autofagia por RAGE parece ser necessária para a ativação da via STAT3 por IL-6, que leva à proliferação celular, sugerindo, portanto, uma participação desse receptor na promoção do crescimento tumoral (Kang et al.⁴², 2012).

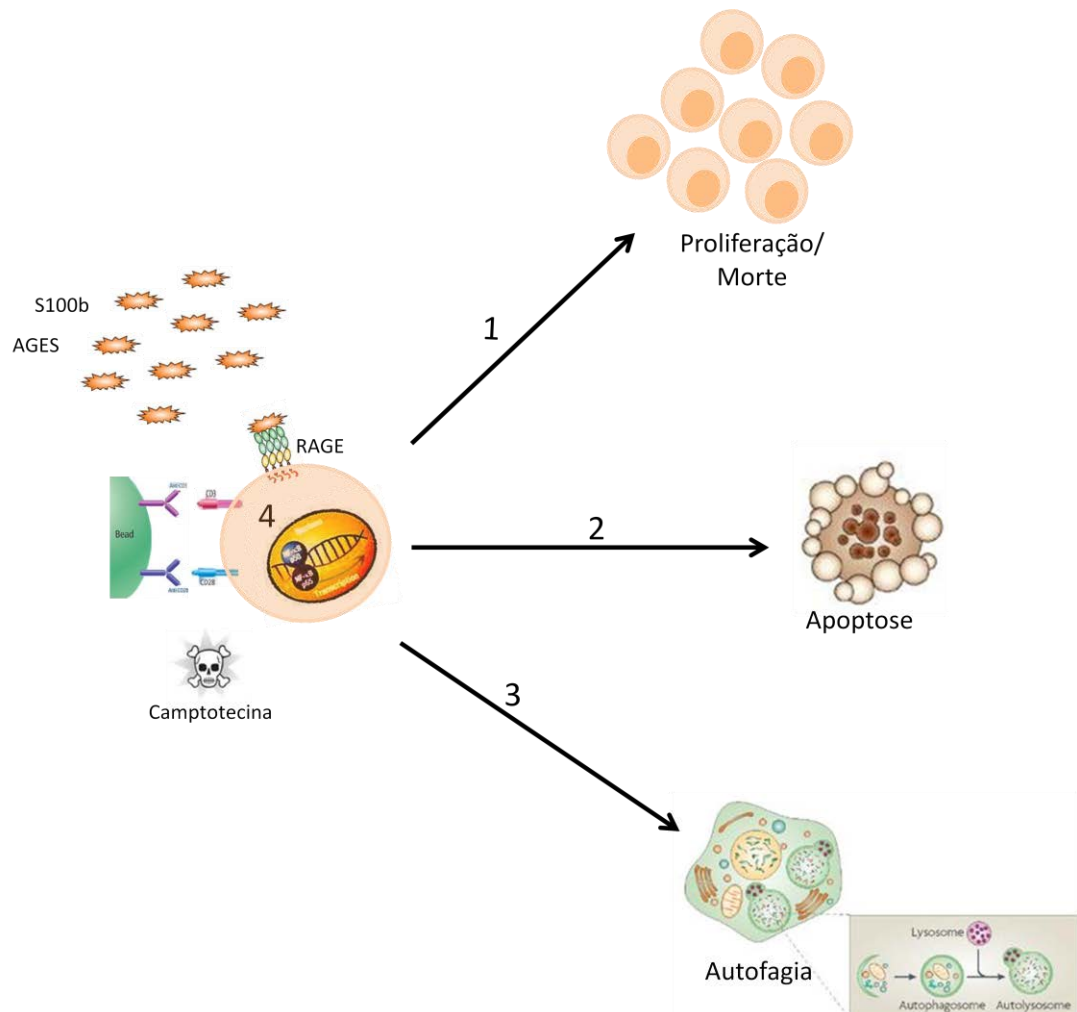
Assim, RAGE parece ter um papel relevante tanto no processo de sobrevivência (estimulando a autofagia e inibindo a apoptose) quanto de morte celular (estimulando a apoptose e inibindo a autofagia), dependendo da natureza do ligante e do tipo celular. No entanto, em células inflamatórias, a modulação desses processos ainda é pouco conhecida.

2 PROPOSIÇÃO

Com base nas informações apresentadas sobre a relevância do receptor RAGE na modulação da resposta imune inata e adaptativa e dos processos de proliferação, morte, e sobrevivência celular propomos avaliar a influência de sua ativação em células T. Nossa hipótese principal é que a ativação de RAGE influencia a biologia celular de linfócitos T, o que poderia indicar um possível papel desse receptor em condições de natureza imune-inflamatória, como a doença periodontal.

Para testar essa hipótese, foram propostos os seguintes objetivos específicos (Figura 3):

Figura 3 – Representação esquemática dos objetivos específicos a serem testados.



1) Determinar o efeito da ativação de RAGE com dois tipos de ligantes (BSA-AGE e S100b) na proliferação e na morte celular espontânea e induzida por um agente citotóxico (camptotecina) em células de linhagem de linfócitos T (JM/Jurkat), associado ou não à pré-ativação do TCR.

2) Determinar o efeito dos ligantes de RAGE na apoptose espontânea e induzida e na expressão de proteínas associadas à esse processo (Bax, Bcl-2 e p53) por linfócitos T de linhagem (JM/Jurkat), associado ou não à pré-ativação do TCR.

3) Determinar o efeito dos agonistas de RAGE na expressão de proteínas características do processo de autofagia celular, p62 e LC3, por células T (JM/Jurkat) estimuladas ou não com agente indutor de apoptose e associado ou não à pré-ativação do TCR.

4) Avaliar a ativação de NF- κ B em células T (JM/Jurkat) após o estímulo com os ligantes de RAGE (BSA-AGE e S100b), na presença e na ausência de pré-ativação do TCR.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Ligantes de RAGE:

3.1.1 Preparo do BSA-AGE

O produto final de glicação (AGE) empregado na estimulação das células foi preparado a partir de albumina sérica bovina como descrito na literatura (Li et al.⁵⁶, 1997; Konishi et al.⁵⁰, 2004). A albumina sérica bovina – fração V (BSA) na concentração de 50 mg/mL foi incubada a 37° C por 8 semanas com 0.5 M de glicose em 0.2 M de tampão fosfato (PBS), pH 7.4, contendo 0.5 mM de EDTA. A glicose livre foi removida por diálise (12 h) com PBS estéril e livre de cálcio de magnésio, pH 7.4, a temperatura de 4° C. O controle desta reação foi feito pela incubação de BSA nas mesmas condições exceto pela adição de glicose. A densidade da cor marrom, típica dos AGES, foi determinada em espectrofotômetro pela absorvância a 405 nm: a absorvância de BSA não glicado é baixa (menor 0.1 que na concentração de 3%), enquanto a absorvância do BSA-AGE é mais elevada (entre 1.8 e 2.1 na mesma concentração de 3%). Alíquotas do BSA-AGE (50 mg/mL) foram mantidas sob refrigeração a temperatura de 4° C.

3.1.2 S100b

A proteína S100b foi obtida comercialmente (S-100B Protein from bovine brain, cat. S6677, Sigma-Aldrich Co., EUA), diluída em água ultrapura na concentração de 1 mg/mL, alíquotada e armazenada a temperatura de - 20° C.

3.2 Manutenção da linhagem celular

Cultivamos a linhagem celular humana de linfócitos T JM/Jurkat em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor, em ambiente úmido à 37° C e em atmosfera contendo 5% de CO₂. Essa linhagem celular foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Depto. de Biologia Celular e Agentes Biopatogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Por se tratar de uma linhagem de células imortalizadas amplamente utilizada no meio científico por mais de 30 anos e não envolver animais e humanos, não houve necessidade de submissão à Comitê de Ética em pesquisa para sua utilização (Anexo).

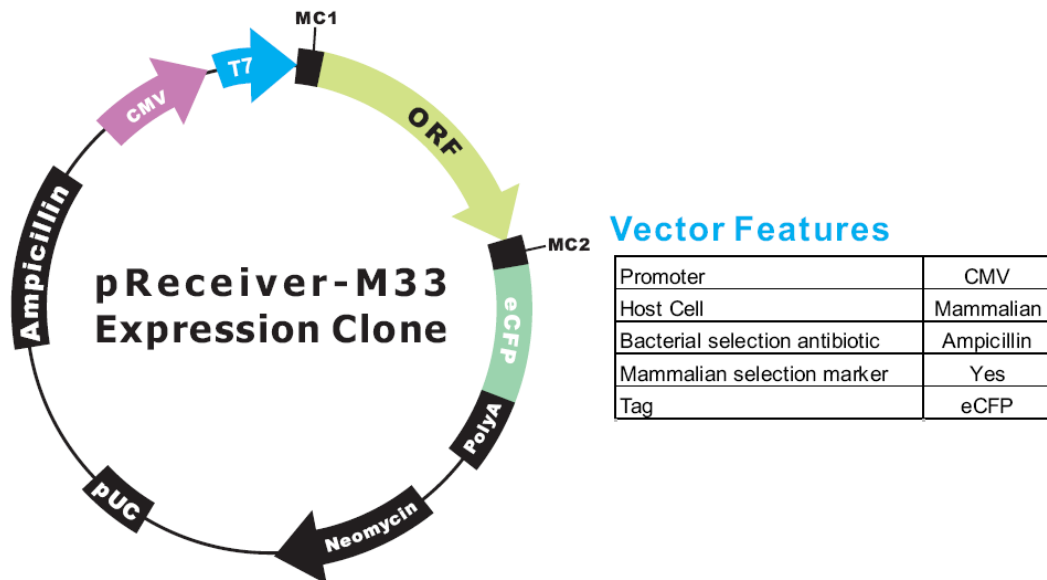
3.3 Pré-ativação celular

Os estímulos da sinalização por RAGE foram realizados na presença e na ausência de pré-ativação do TCR com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 conjugados à microesferas – ‘beads’ - magnéticas (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, Gibco, Life Tech. Corp., EUA). Após o preparo das células, a suspensão de beads foi agitada em vortex por 30 seg, um volume apropriado foi coletado (razão beads/célula 1:1) e lavado em 1 mL de PBS estéril. Em seguida, as microesferas foram separadas em suporte magnético por 1 min. Após o descarte do sobrenadante, os beads foram ressuspensos em meio de cultura em volume idêntico ao obtido inicialmente da suspensão e adicionado às células, que foram incubadas a 37° C e em atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 24 h.

3.4 Transfecção – experimentos de ganho de função de RAGE

Experimentos de ganho de função de RAGE foram feitos por transfecção transitória das células precursoras utilizando o sistema Neon (Neon Transfection System, Invitrogen, Life Tech. Corp., EUA), que combina eletroporação e transfecção lipídica. Para isso, obtivemos comercialmente o vetor plasmidial de expressão de RAGE (pReceiver - M33, GeneCopoeia, Inc., EUA) contendo a região codificadora correspondente ao variante 1 de RAGE humano (Figura 4). Esse plasmídeo foi amplificado por transformação de bactérias *E. coli* quimicamente competentes obtidas comercialmente (Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells, Invitrogen, Life Tech. Corp., EUA), extraído e purificado utilizando um sistema de colunas de afinidade (QIAGEN Plasmid Mini Kit, QIAGEN Corp., EUA).

Figura 4 – Diagrama do vetor de clonagem plasmidial pReceiver - M33, que codifica o receptor RAGE. A expressão do gene é controlada pelo promotor constitutivamente ativo 'CMV' e a região N-terminal é marcada com o gene-repórter 'eCFP'. A localização da sequência PolyA, após o gene-repórter, assegura que RAGE foi expresso como uma proteína de fusão junto com o peptídeo de marcação.



3.4.1 Transformação bacteriana

Brevemente, 50 μ L da suspensão bacteriana de *Escherichia coli* foram retirados do freezer – 80° C e descongelados lentamente em gelo. Sob condições assépticas, 15 ng do DNA plasmidial (pReceiver - M33) previamente diluído em água livre de nucleases foi adicionado a essas células, que foram mantidas em gelo por 30 min. Em seguida, as bactérias foram submetidas a choque térmico em banho maria a 42° C por 20 seg, e depois colocadas novamente no gelo por 2 min. A suspensão foi transferida para tubos de cultura bacteriológica de 15 mL contendo 950 μ L de meio de cultura S.O.C pré-aquecido e sem antibióticos, e incubada por 1 h a 37° C sob agitação constante (225 rpm).

A viabilidade bacteriana foi constatada após esse período pela discreta turvação do meio. Alíquotas de 20 e 60 μL da suspensão foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar preparado com o antibiótico de seleção ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas placas foram incubadas por 18 h em estufa bacteriológica a 37° C.

3.4.2 Amplificação do plasmídio

5 a 10 colônias bacterianas que cresceram na presença do antibiótico de seleção foram isoladas das placas de Petri e transferidas para tubos de cultura bacteriológicos contendo 4 mL de meio LB broth preparado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas culturas foram incubadas em agitador automático a 225 rpm, por 18 h a 37° C

3.4.3 Purificação do plasmídio

O DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o *kit* QUIAGEN Plasmid Mini Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, ao final do período de incubação para amplificação do DNA plasmidial, as bactérias foram coletadas por centrifugação (6000 xg, 4° C, 15 min) e submetidas à lise. O DNA plasmidial foi extraído utilizando um sistema de colunas de afinidade, depois precipitado em isopropanol e centrifugado a 15000 xg, em temperatura ambiente, por 30 min. Por fim, o pellet de DNA foi lavado com álcool 70% e ressuspenso em 30 μL de tampão Tris-EDTA (T.E), pH 8.0.

O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare, EUA) e armazenado a - 20° C.

3.4.4 Transfecção

Brevemente, as células foram cultivadas em condições de sub-confluência (5×10^5 céls/mL) em meio de cultura suplementado com 10% de FBS inativado por calor, porém sem antibióticos no dia anterior à transfecção. No dia da transfecção, as células foram coletadas por centrifugação e contadas em hemocítômetro segundo o ensaio de exclusão do corante azul de Trypan, verificando viabilidade superior a 90%. Foram utilizadas placas de cultura de 10 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS sem antibióticos, que foram preparadas e mantidas em incubadora de CO₂ até o momento exato da transfecção. Após a verificação da viabilidade celular, as células foram lavadas em PBS livre de cálcio e de magnésio, e ressuspendidas em tampão de transfecção apropriado (tampão 'R') numa densidade final de 2×10^7 céls/mL. Para cada placa, foram utilizados 10 µg de DNA plasmidial, que foi adicionado às células ressuspendidas no tampão 'R'. As condições de eletroporação utilizadas foram otimizadas para a linhagem JM/Jurkat (1400 V/ 20 ms em um único pulso de corrente). Imediatamente após a transfecção, as células foram transferidas para as placas de cultura e incubadas à 37° C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.5 Proliferação e viabilidade celular

Os efeitos da ativação de RAGE sobre a proliferação e a viabilidade celular foram determinados por contagem diferencial de células viáveis e não viáveis, marcadas para integridade de membrana citoplasmática com o corante azul de Trypan 0.4% (Trypan Blue Solution 0,4%, cat. 15250-061, Gibco, Life Tech.

Corp., EUA). Neste ensaio, células viáveis mantêm a integridade de membrana e excluem do citoplasma o corante, enquanto a perda de viabilidade celular associada à perda da integridade da membrana plasmática permite a penetração do corante no citoplasma

Brevemente, 3×10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços e estimuladas com 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA-AGE e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de S100b na presença e na ausência de beads anti-CD3 e anti-CD28. O controle positivo foram células não estimuladas (\emptyset 10%) e a camptotecina (CPT - Camptothecin, cat. C9911, Sigma-Aldrich Co., EUA), 5 μM , foi utilizada como controle negativo para proliferação. Avaliamos ainda a influência da ativação de RAGE com esses dois ligantes (BSA-AGE 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na modulação da apoptose induzida pelo tratamento com camptotecina (5 μM). As avaliações foram feitas após 12, 24, 48 h do tratamento das células. Células transfectadas com vetor de expressão de RAGE utilizadas em experimentos de ganho de função do receptor foram avaliadas nos períodos de 12, 24, 48 e 72 h.

Nesses experimentos, as células foram previamente desinduzidas em meio de cultura apropriado suplementado com 1% de FBS por um período de 24 h. A desindução teve a finalidade de evitar possíveis influências de componentes do soro fetal bovino resistentes à inativação pelo calor (imunoglobulinas, componentes do sistema complemento) e também de proporcionar uma melhor sincronização do ciclo celular. Além disso, a utilização de menor concentração de FBS permite a detecção de discretos efeitos dos ligantes de RAGE na proliferação e viabilidade celular, que poderiam ser completamente sobrepostos pelo potente efeito estimulador de elevadas concentrações de FBS. Nas células transfectadas, esse protocolo não foi utilizado devido ao estresse adicional causado pelo procedimento

de transfecção, e os experimentos de ganho de função foram realizados em meio de cultura contendo 10% de FBS.

O procedimento consistiu na diluição de uma alíquota das culturas na proporção de 1:1 com o azul de Trypan 0,4%, seguida da contagem, em hemocítmetro de Neubauer, tanto das células azuis (mortas) quanto das células normais. A porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células foi calculada para estabelecer o percentual de viabilidade celular. Todas as contagens foram feitas por um mesmo examinador treinado e sem conhecimento dos grupos experimentais.

3.6 Citometria de fluxo – modulação da apoptose

Brevemente, 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de 24 poços e estimuladas com BSA-AGE nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 24 e 72 h, para detecção da fragmentação do DNA (indicativa de apoptose) através do método TUNEL (*Transferase-mediated dUTP nick-end labelling*, ApopTag, Millipore Corp., EUA). Células transfectadas com o vetor de expressão de RAGE foram utilizadas, 24 h depois da transfecção, em experimentos de ganho de função, e avaliadas após 48 h do estímulo com os ligantes de RAGE, correspondendo ao período em que a expressão de RAGE como *transgene* manteve-se em seu maior nível. Em todos os experimentos, os controles negativos foram representados por células não estimuladas e o controle positivo para apoptose utilizado foi o agente indutor de apoptose camptotecina (5 μM). O efeito modulatório da ativação de RAGE na apoptose induzida pela camptotecina (5 μM) também foi avaliado em todos os experimentos.

Ao final de cada período experimental, as células foram coletadas por centrifugação, contadas e ressuspensas em PBS (pH 7.4, livre de cálcio e magnésio) na densidade de 2×10^6 células/mL, fixadas em tampão contendo 2% de paraformaldeído (BD Cytifix, BD Biosciences, EUA). A apoptose foi avaliada, por citometria de fluxo, após a incorporação enzimática de nucleotídeos conjugados à digoxigenina nas terminações 3'-OH livres, presentes nos locais de quebras no DNA. Os fragmentos marcados com o oligômero nucleotídeo- digoxigenina foram incubados com anticorpo anti-digoxigenina, conjugado à fluoresceína (FITC). A marcação do DNA de fita dupla (que possibilita uma avaliação indireta da fase do ciclo celular a partir da quantidade total de DNA) foi realizada com iodeto de propídeo (PI). A leitura das amostras foi feita em citômetro de fluxo (BD FACSVerse, BD Biosciences, EUA) equipado para leitura de PI e FITC (intensidade de fluorescência >620 nm e 530 nm, respectivamente).

3.7 Western blot - modulação dos processos de autofagia e apoptose

A expressão de proteínas representativas dos processos de autofagia (LC3 e p62) e apoptose (p53, Bax, Bcl-2), e da proteína indicativa da ativação de NF- κ B (p50) foi avaliada por Western blot.

Brevemente, 3×10^6 células foram cultivadas em placas de 12 poços e estimuladas com os ligantes de RAGE, BSA-AGE 100 e 200 μ g/mL e S100b 10 μ g/mL, por 10 e 30 min nos experimentos de avaliação da expressão de p50, ou 24 h e 48 h para avaliação das demais proteínas relacionadas aos processos de apoptose e autofagia. Nos experimentos de ganho de função com células

transfectadas, a avaliação foi realizada somente no período de 24 h. O efeito modulatório da ativação de RAGE com os ligantes BSA-AGE 200 µg/mL e S100b 10 µg/mL também foi avaliado na presença de estímulo com o agente indutor de apoptose, camptotecina (5 µM).

Ao final de cada período experimental, os lisados celulares foram preparados com tampão de extração contendo detergente (Cell Lysis Buffer, cat. 9803, Cell Signaling Tech. Inc., EUA) suplementado com inibidores de protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, cat. sc-29131, Santa Cruz Biotech. Inc., EUA) e fosfatase (PhosSTOP, cat. 04906837001, Roche Ltda., Alemanha). Após quantificação pelo método de Bradford (Quick Start Bradford protein 1x dye reagent, cat. 500-0205, Bio-Rad Lab. Inc., EUA), 40 µg de proteína total foi diluída em tampão de amostra contendo SDS e DTT e desnaturados por aquecimento à 95° C por 5 min. A separação eletroforética foi feita em géis descontínuos de poliacrilamida à 12% (100 V constantes por 60 min), seguido de transferência para membranas de PVDF (300 mA constantes por 60 minutos). Após bloqueio de ligações inespecíficas em solução de 5% de leite desnatado em TBS/Tween por 1 h, as membranas foram incubadas com diluições otimizadas dos anticorpos primários (18 h à 4° C sob agitação suave) (Quadro 1), seguida de lavagens em TBS/Tween e incubação com os anticorpos secundários conjugados à HRP (1 h, temperatura ambiente). A detecção das proteínas-alvo foi feita com kit para desenvolvimento de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotech., EUA) seguido de visualização e documentação em tempo real por câmara para quimioluminescência (Chemi-Doc, Bio-Rad, EUA).

Quadro 1 – Quadro informativo dos anticorpos utilizados nas avaliações por Western blot.

ANTICORPO	FABRICANTE	DILUIÇÃO
Anti-LC3 A/B antibody	Abcam (cat. ab58610)	1 µg/mL
Anti-SQSTM1/p62 antibody	Abcam (cat. ab56416)	2 µg/mL
Anti-p53 antibody	Abcam (cat. ab26)	2,5 µg/mL
Anti-Bax antibody	Abcam (cat. ab5714)	2 µg/mL
Anti-Bcl2 antibody	Abcam (cat. ab7973)	1:100
NF-κB p50 (C-19)	Santa Cruz (cat. sc-1190)	0,4 µg/mL
GAPDH Rabbit mAb	Cell Signaling (cat. 2118)	1:1000

3.8 Análise estatística

A análise estatística, quando necessária, consistiu do teste-t não pareado com correção de Welch para variâncias desiguais. Os cálculos foram executados no programa estatístico GraphPad, versão 5.00 (La Jolla, EUA).

4 RESULTADO

4.1 Eficiência da transfecção/ eletroporação

Para avaliarmos a relevância de RAGE na biologia de linfócitos T, foram realizados experimentos de ganho de função, nos quais induzimos a superexpressão desse receptor com o objetivo de comparar as respostas dessas células com células normais, não transfectadas e que apresentam uma baixa expressão basal de RAGE. A eficiência da transfecção foi verificada após 24 h pela detecção da expressão do gene-repórter (*enhanced cyan fluorescent protein*, eCFP) nas células transfectadas em microscópio de fluorescência invertido (Figura 5). Além disso, verificamos a expressão protéica de RAGE como transgene nas células transfectadas por Western Blot, após 24, 48 e 72 h (Figura 6).

Figura 5 – Imagens representativas das condições de transfecção/ eletroporação selecionadas para a linhagem de linfócitos T (JMt). As imagens foram obtidas por imunofluorescência utilizando o filtro para FITC, que possibilita a visualização da expressão de GFP pelas células efetivamente transfectadas. A maior eficiência (estimada em 25 a 30%) foi obtida com 1400 V/ 20 ms em um único pulso de corrente. Imagens obtidas utilizando a objetiva de 4 X (magnificação total 40 X).

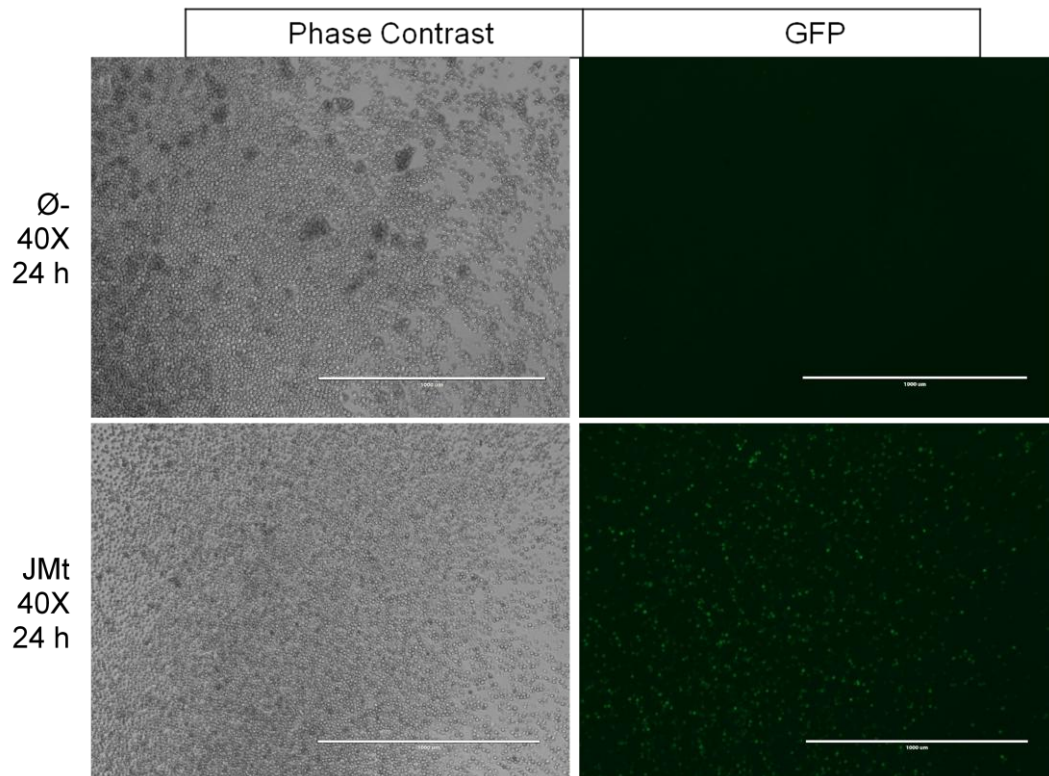
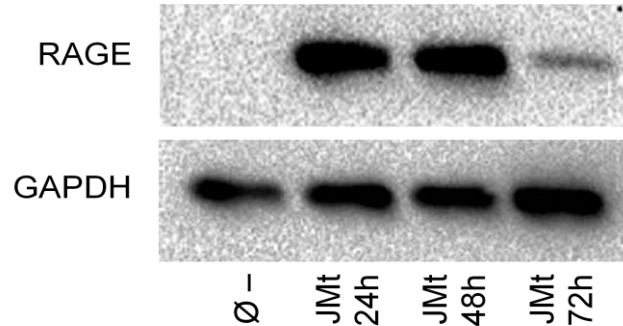


Figura 6 – A transfecção com vetor plasmidial de RAGE aumentou significativamente a expressão protéica desse receptor em comparação com células controle (\emptyset -), que não foram transfectadas.



4.2 Avaliação da proliferação e viabilidade de linfócitos T (JM/Jurkat) após estímulo com ligantes de RAGE - Objetivo específico 1

Para avaliar os efeitos dos ligantes de RAGE na proliferação e viabilidade celular, foi realizada a contagem direta das células em hemocítômetro segundo o ensaio de exclusão do corante azul de Trypan..

Verificamos que o estímulo com esses ligantes não modularam a proliferação (Figura 7) ou a viabilidade (Figura 8) das células nos períodos e nas concentrações utilizadas, quer seja com ou sem pré-estímulo/pré-ativação com anticorpos para CD3/CD28.

- Efeito em células com superexpressão do receptor:

Em células transfectadas, foi observada uma discreta tendência de aumento na proliferação (Figura 9) e na viabilidade celular (Figura 10) após o

tratamento com os ligantes de RAGE, sobretudo mediante a pré-ativação das células.

Figura 7 – A e B, Curva de crescimento de células JM/Jurkat sem (A) ou com pré-ativação com beads anti-CD3 e anti-CD28 (B) nos períodos de 12, 24, 48 h. As células foram tratadas com os ligantes de RAGE: BSA-AGE 100 $\mu\text{g/mL}$, BSA-AGE 200 $\mu\text{g/mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g/mL}$. Camptotecina 5 μM (CPT) foi utilizada como controle negativo para proliferação e células não estimuladas com os ligantes de RAGE e cultivadas em meio contendo 10% de FBS ($\emptyset 10\%$) foram utilizadas como controle positivo (indutor de proliferação). Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

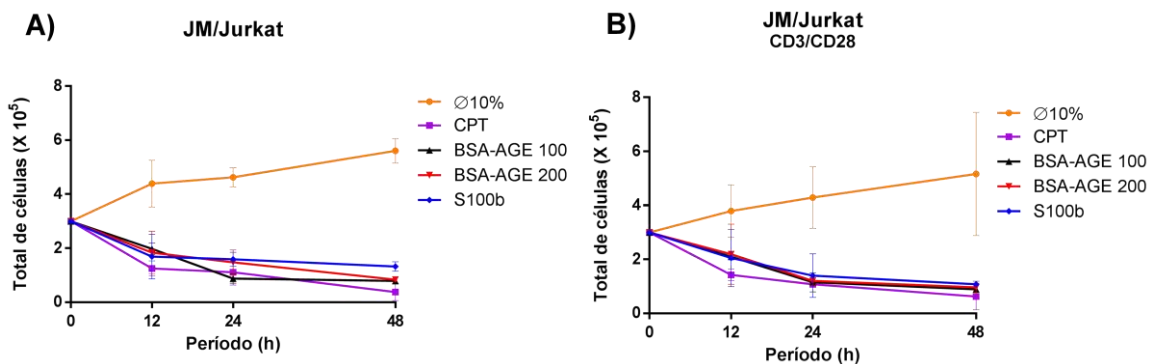


Figura 8 – A e B, Curva de viabilidade celular determinada pelo método de exclusão de azul de Trypan. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

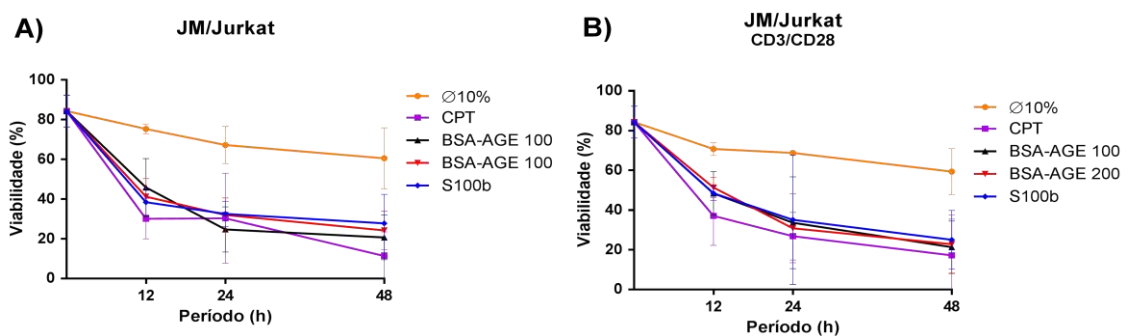


Figura 9 – A e B, Curva de crescimento de células JM/Jurkat transfectadas com vetor plasmidial para expressão de RAGE (JM/Jurkat t). Células sem (A) ou com pré-ativação com beads anti-CD3 e anti-CD28 (B) foram tratadas com os ligantes de RAGE: BSA-AGE 100 $\mu\text{g/mL}$, BSA-AGE 200 $\mu\text{g/mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g/mL}$. Camptotecina 5 μM (CPT) foi utilizada como controle negativo para proliferação e células não estimuladas como controle positivo ($\emptyset 10\%$). A proliferação foi avaliada após 12, 24, 48 e 72 h do tratamento. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

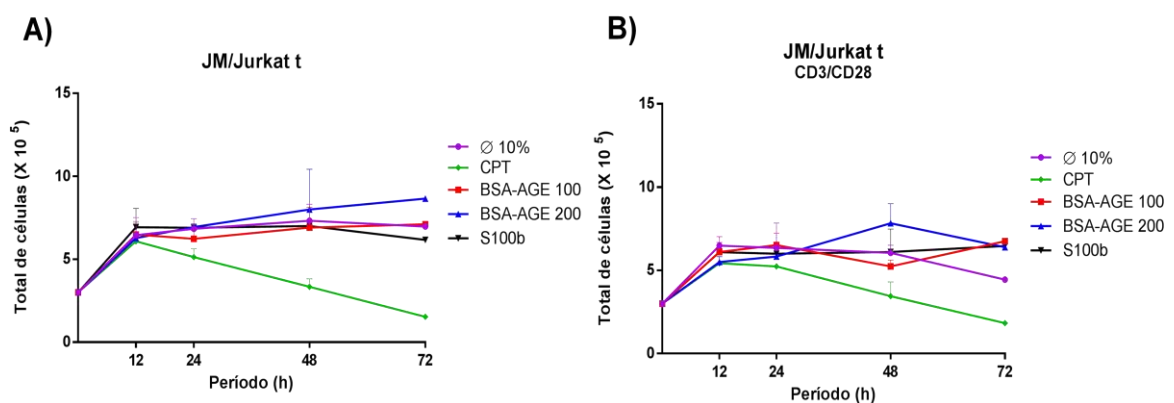
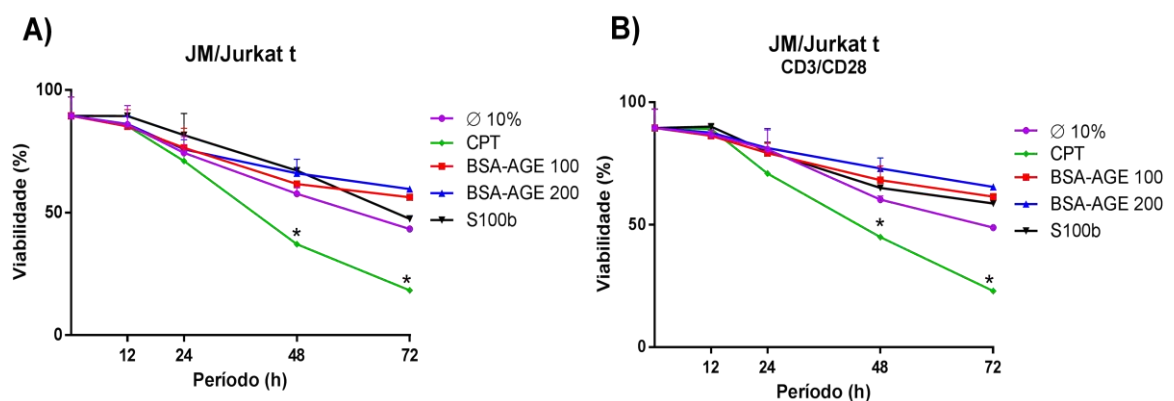


Figura 10 – A e B, Curva de viabilidade de células transfectadas (JM/Jurkat t) determinada pelo método de exclusão com azul de Trypan. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle positivo ($\emptyset 10\%$) (Teste-t não pareado com correção de Welch para variâncias desiguais).



4.3 Avaliação da influência de RAGE na apoptose induzida de linfócitos T (JM/Jurkat) – Objetivo específico 1

Células de linhagem de linfócitos T (Jurkat/JM) com e sem pré-estímulo do TCR foram tratadas com BSA-AGE (200 µg/mL) e S100b (10 µg/mL) com o objetivo de investigar a capacidade desses ligantes de RAGE de influenciar, positiva ou negativamente, a proliferação e a viabilidade dessas células quando cultivadas na presença do agente anti-proliferativo e citotóxico, camptotecina (CPT). As avaliações foram realizadas após 12, 24, 48 h por contagem diferencial de células viáveis e não viáveis, em hemocitômetro, com o corante azul de Trypan (Figuras 11 e 12). Ainda não foi possível realizar esses experimentos em células com expressão aumentada de RAGE devido ao estresse excessivo causado pelo procedimento de transfecção.

Novamente, os resultados indicam que o estímulo com os ligantes de RAGE não influenciam a resposta proliferativa de linfócitos T à camptotecina. Com relação à viabilidade, também não foi observada diferença em nenhum dos períodos avaliados.

Figura 11 – A e B, Curva de proliferação de células JM/Jurkat sem (A) ou com pré-ativação com beads anti-CD3 e anti-CD28 (B) tratadas com os ligantes de RAGE, BSA-AGE 200 $\mu\text{g/mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g/mL}$, na presença de camptotecina 5 μM (CPT). Células não estimuladas e mantidas em meio de cultura suplementado com 1% de FBS (\emptyset 1%) foram utilizadas como controle positivo. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

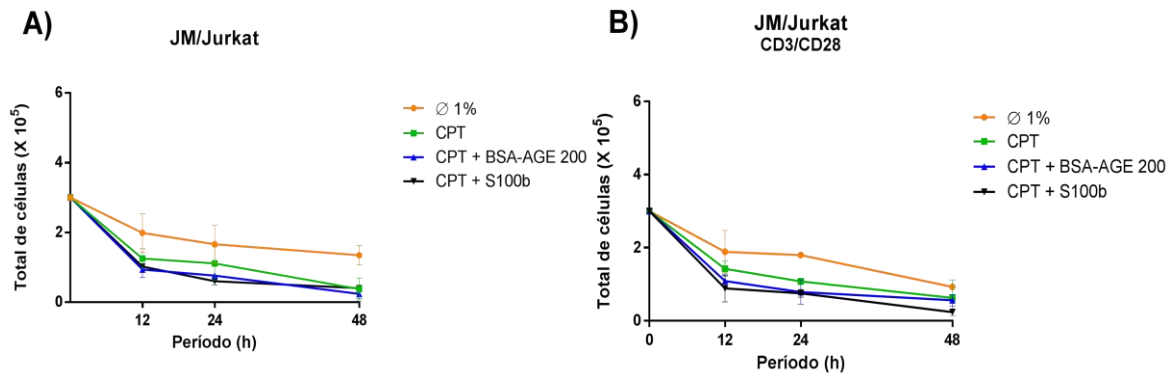
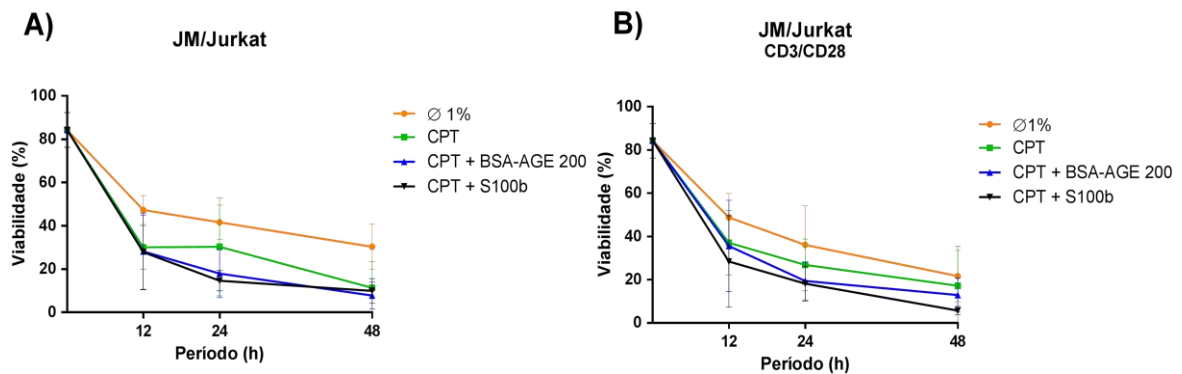


Figura 12 – A e B, Curva de viabilidade das células determinada pelo ensaio com azul de Trypan. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



4.4 Avaliação da apoptose de linfócitos T (JM/Jurkat) após estímulo de RAGE – Método TUNEL - Objetivo específico 2

Foi utilizado o ensaio de TUNEL para detectar, por citometria de fluxo, a fragmentação do DNA (indicativa de apoptose) e avaliar o efeito da ativação de RAGE na modulação da apoptose. Esse método permitiu ainda a observação do efeito desses estímulos sobre a cinética do ciclo celular, possibilitando a determinação concomitante do percentual de células em apoptose nas fases G1 e S/G2. Os estímulos foram feitos por 24 h e 72 h e (Figuras 13 e 14), em células transfectadas (Figura 15), após 24 h da transfecção e mantidos por 48 h, correspondente ao período de máxima expressão do transgene.

A exposição das células aos ligantes de RAGE parece reduzir a apoptose, efeito que pode ser observado de forma mais marcante no período de 72 h. Além disso, o potencial proliferativo das células parece ser afetado de maneira positiva, verificado pelo aumento na proporção de células nas fases S/G2 tratadas com os ligantes em comparação com o controle não tratado.

De maneira geral, 24 h após o estímulo com os ligantes de RAGE, a resposta das células pré-ativadas não diferiu das células que não receberam esse pré-tratamento, isto é, observamos uma pequena redução na apoptose e um leve aumento do potencial de proliferação celular. Por outro lado, no período de 72 h, observamos um aumento da apoptose mediante a exposição aos ligantes de RAGE, sobretudo o S100b. Nesse período, verificamos uma menor influência dos tratamentos no potencial proliferativo das células.

É interessante notar que o tratamento com o ligante S100b resultou em um efeito bifásico sobre a apoptose, que variou de acordo com o estado de ativação das células: enquanto em períodos iniciais verificamos um discreto aumento, em períodos tardios ocorreu uma atenuação da apoptose. Uma resposta contrária foi observada em células que receberam pré-ativação.

- Efeito em células com superexpressão do receptor

Ainda que os ligantes de RAGE não tenham afetado a apoptose de maneira acentuada, observamos que exerceram um efeito na quantidade de DNA das células, tanto aquelas que não receberam pré-tratamento como nas transfectadas e pré-ativadas, indicando a relevância desse estímulo sobre o ciclo celular.

Figura 13 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células de linhagem de linfócitos T (JM/Jurkat) 24 h (A) e 72 h (B) após o estímulo com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b $\mu\text{g}/\text{mL}$). O eixo X (PE-A) determina o conteúdo de DNA nas células pela incorporação do iodeto de propídeo, indicando a fase do ciclo em que as células se encontram (G1 - à esquerda; S/G2 - à direita); eixo Y indica o percentual de células em apoptose. A somatória dos dois quadrantes superiores indica o percentual total de células apoptóticas nos diferentes estágios do ciclo celular. Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.

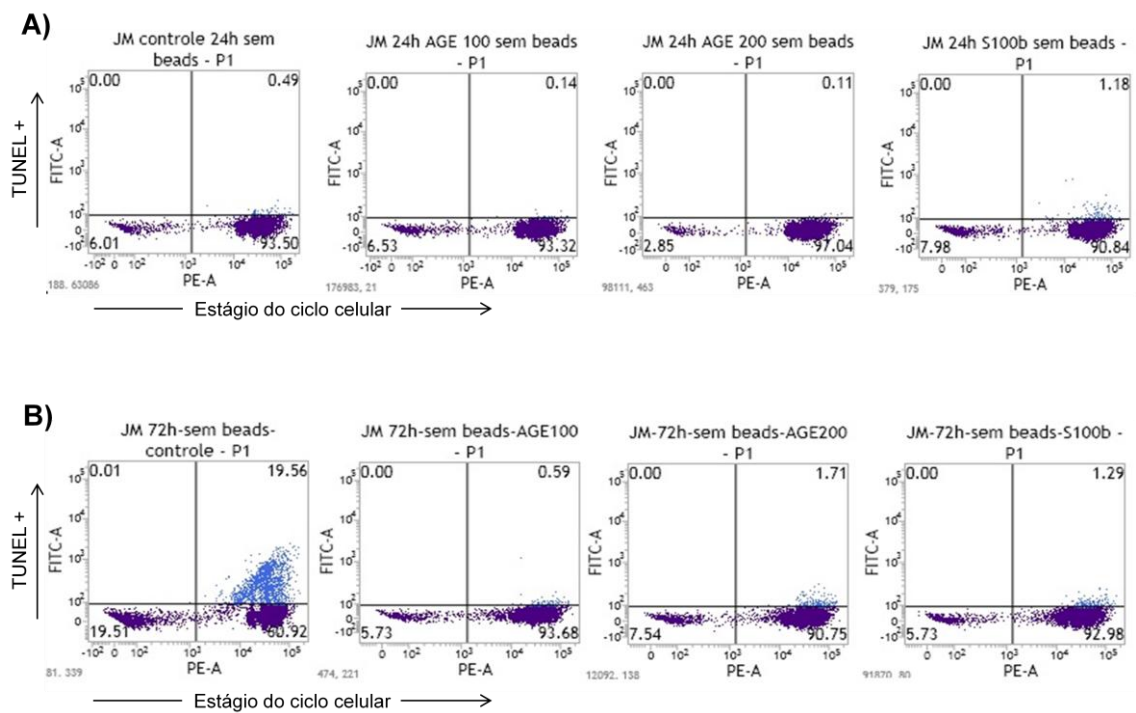


Figura 14 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células de linhagem de linfócitos T pré-ativadas com beads anti-CD3/ anti-CD28 (JM/Jurkat CD3/CD28) e estimuladas com os ligantes de RAGE por 24 h (A) e 72 h (B). O eixo X (PE-A) determina o conteúdo de DNA nas células pela incorporação do iodeto de propídeo, indicando a fase do ciclo em que as células se encontram (G1 - à esquerda; S/G2 - à direita); eixo Y indica o percentual de células em apoptose. A somatória dos dois quadrantes superiores indica o percentual total de células apoptóticas nos diferentes estágios do ciclo celular. Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.

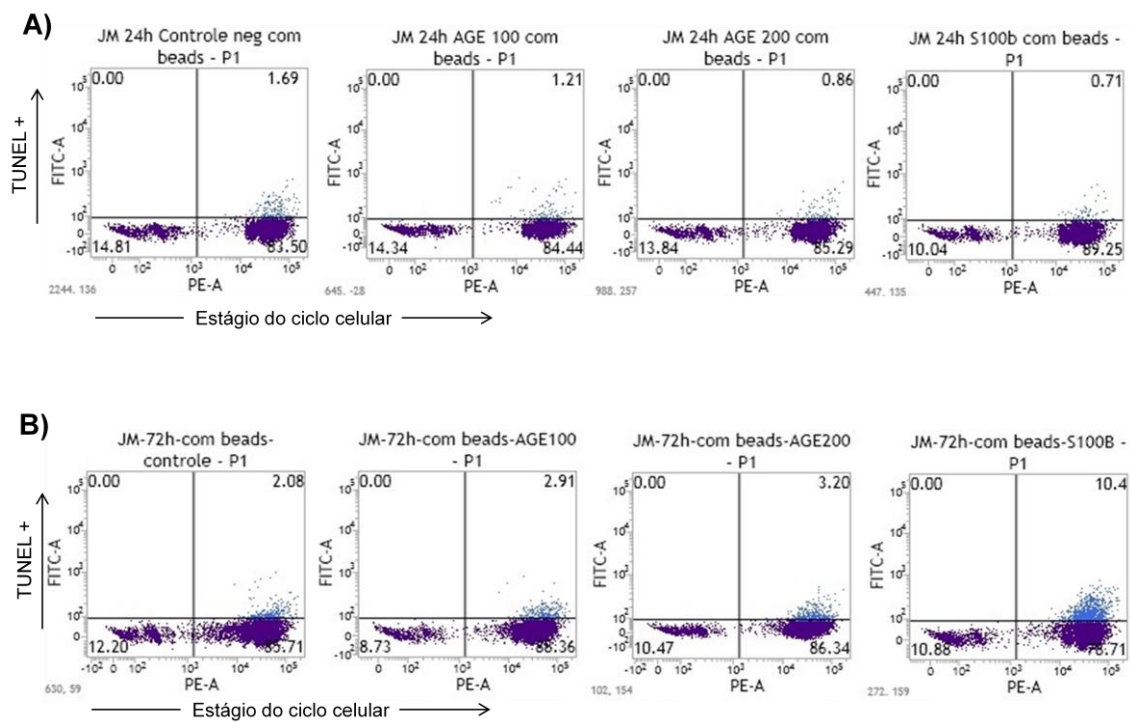
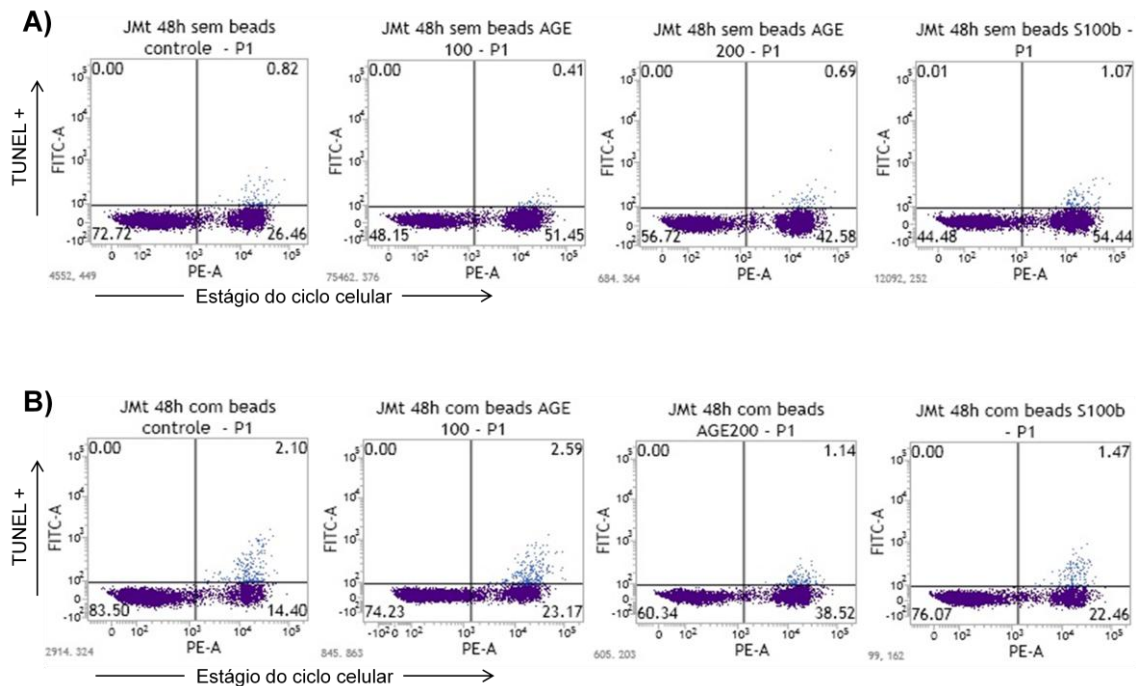


Figura 15 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células de linhagem de linfócitos T transfectadas (JM/Jurkat t) com o vetor de expressão de RAGE e estimuladas com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BSA-AGE 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) ou pré-estimuladas com anticorpos para CD3/CD28 (JM/Jurkat t CD3/CD28) e estimuladas com os ligantes de RAGE (B) por 48 h. Nos dot-blots, os quadrantes inferiores esquerdos indicam a proporção de células na fase G1 e os quadrantes inferiores direitos a proporção de células nas fases S/G2; o dois quadrantes superiores indicam o percentual de células apoptóticas, segundo as fases do ciclo celular (G1 e S/G2). Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.



4.5 Avaliação da influência do estímulo de RAGE na apoptose induzida de linfócitos T (JM/Jurkat) – Método TUNEL - Objetivo específico 2

Para determinar o impacto de RAGE na apoptose celular induzida, utilizamos novamente o ensaio de TUNEL para observar o efeito do co-tratamento dos ligantes BSA-AGE 200 µg/mL e S100b 10 µg/mL na presença de camptotecina (CPT).

No período inicial, observamos a tendência dos ligantes de potencializar o efeito anti-proliferativo da camptotecina, o que pode ser verificado pelo aumento na proporção de células na fase G1 do ciclo celular. Além disso, o tratamento com BSA-AGE (mas não com S100b) reduziu o efeito pró-apoptótico da camptotecina, sobretudo no período de 24 h (Figuras 16).

Por outro lado, mediante a pré-ativação das células (Figuras 17), verificamos que, em comparação com o controle (camptotecina isoladamente), a exposição aos ligantes de RAGE aumentou a proporção de células nas fases S/G2, indicando uma inibição da resposta anti-proliferativa induzida pela camptotecina. Observamos ainda que, com a ativação das células, o efeito pró-apoptótico dessa substância é potencializado pelos ligantes de RAGE, em contraste ao verificado nas células sem ativação por CD3/CD28.

- Efeito em células com superexpressão do receptor:

De modo geral, observamos que a transfecção das células reduziu expressivamente seu potencial proliferativo e que o tratamento com os ligantes de RAGE na presença de camptotecina potencializou esse efeito, de forma similar aos

efeitos dos ligantes de RAGE em células não estimuladas e não transfectadas, em especial no período de 24 h (Figura 18). Nessas células, o tratamento com os ligantes de RAGE não resultou em efeitos marcantes na apoptose, com discreta atenuação dos efeitos apoptóticos da camptotecina em células tratadas com BSA-AGE, tanto na presença quanto na ausência de ativação por CD3/CD28. De forma interessante, este discreto efeito atenuador da apoptose por BSA-AGE foi acompanhada pela redução na proporção de células na fase S/G2 do ciclo celular, sugerindo que este efeito inibidor da apoptose envolve a modulação direta do mecanismo primário de ação da camptotecina, que é justamente a interferência na progressão do ciclo celular.

Figura 16 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células de linhagem de linfócitos T (JM/Jurkat) tratadas com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de camptotecina (5 μM) nos períodos de 24 h (A) e 72 h (B). O eixo X (PE-A) determina o conteúdo de DNA nas células pela incorporação do iodeto de propídeo, indicando a fase do ciclo em que as células se encontram (G1 - à esquerda; S/G2 - à direita); eixo Y indica o percentual de células em apoptose. A somatória dos dois quadrantes superiores indica o percentual total de células apoptóticas nos diferentes estágios do ciclo celular. Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.

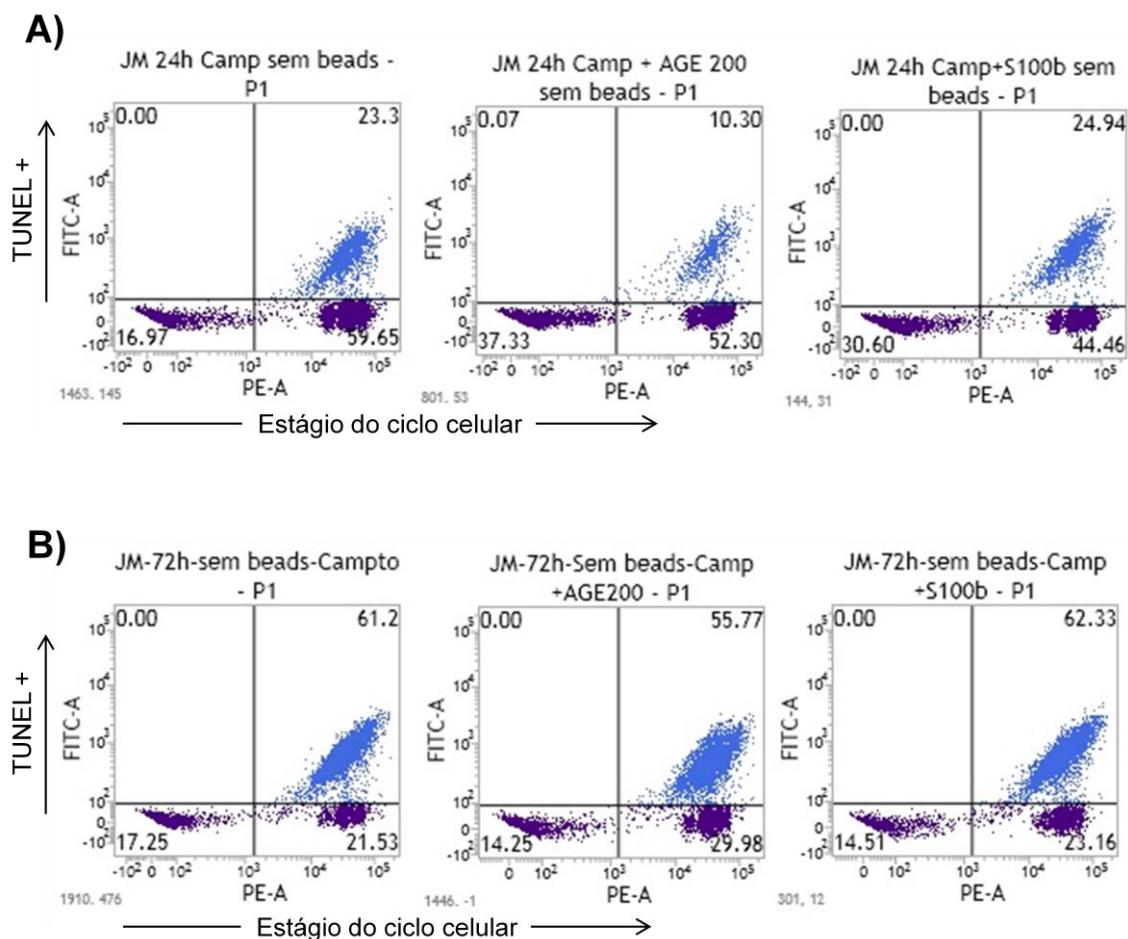


Figura 17 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células pré-ativadas com beads anti- CD3/CD28 e tratadas com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de camptotecina (5 μM) nos períodos de 24 h (A) e 72 h (B). O eixo X (PE-A) determina o conteúdo de DNA nas células pela incorporação do iodeto de propídeo, indicando a fase do ciclo em que as células se encontram (G1 - à esquerda; S/G2 - à direita); eixo Y indica o percentual de células em apoptose. A somatória dos dois quadrantes superiores indica o percentual total de células apoptóticas nos diferentes estágios do ciclo celular. Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.

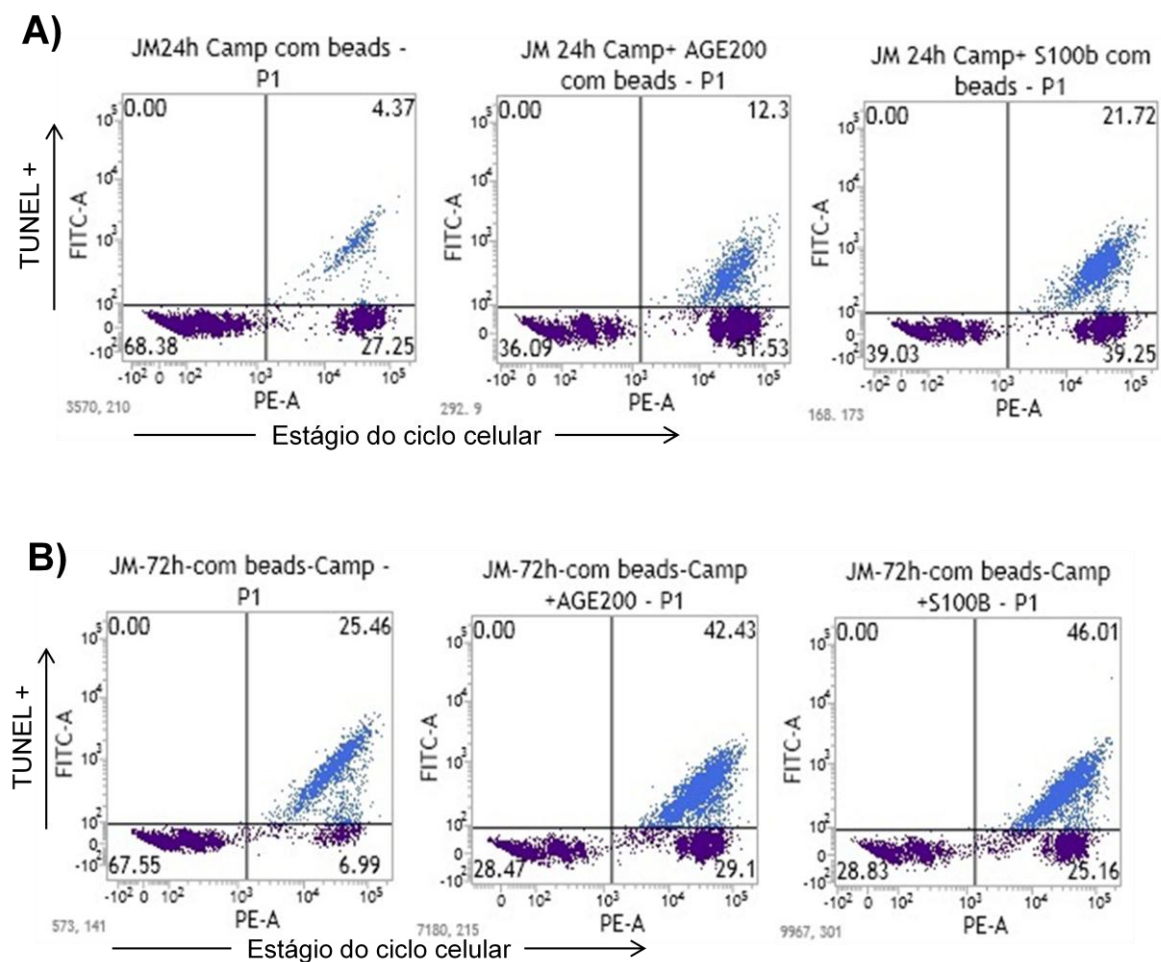
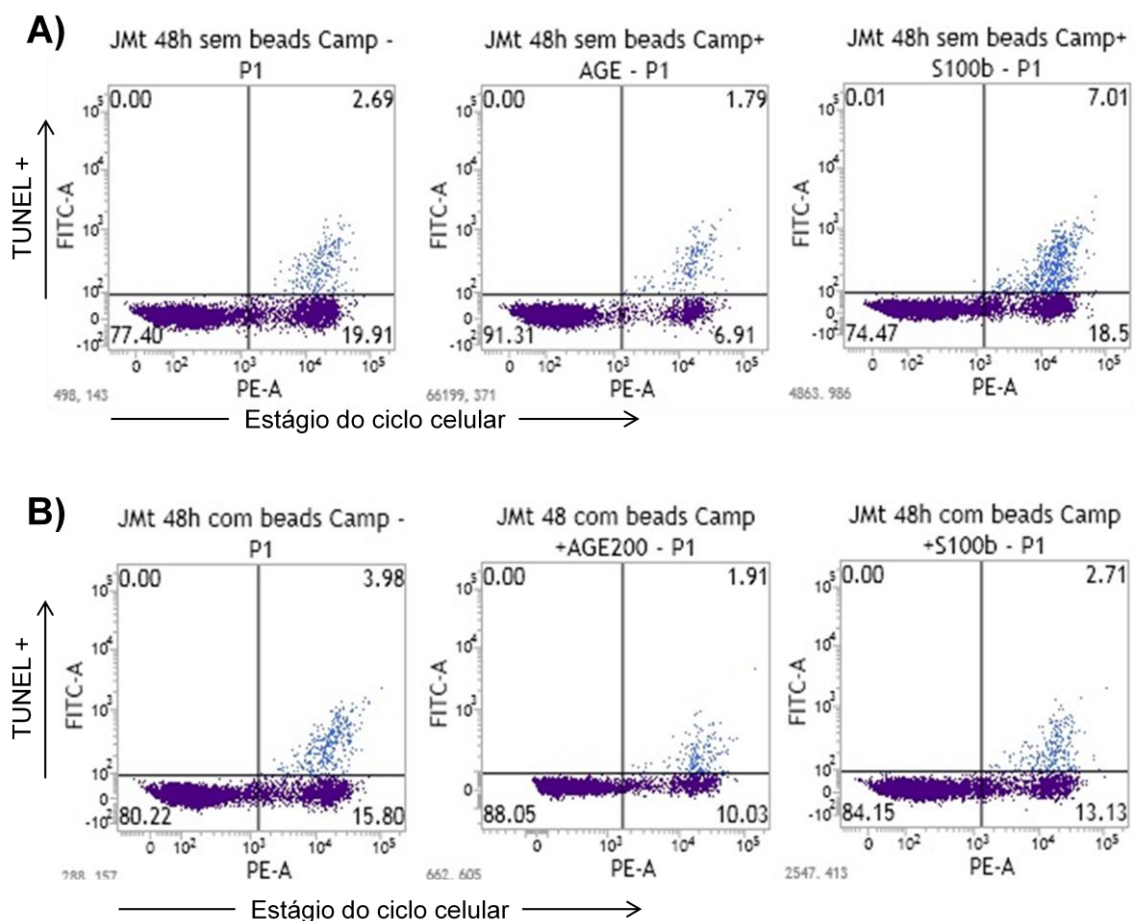


Figura 18 – A e B, Detecção de apoptose pelo método TUNEL em células de linhagem de linfócitos T transfectadas para expressão de RAGE (JM/Jurkat t) e expostas aos ligantes BSA-AGE 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na presença de camptotecina (5 μM) no período de 48 h. Em 'A', os dados das células não ativadas, e em 'B' os dados das células pré-ativadas com anticorpos para CD3/CD28. O eixo X (PE-A) determina o conteúdo de DNA nas células pela incorporação do iodeto de propídeo, indicando a fase do ciclo em que as células se encontram (G1 - à esquerda; S/G2 - à direita); eixo Y indica o percentual de células em apoptose. A somatória dos dois quadrantes superiores indica o percentual total de células apoptóticas nos diferentes estágios do ciclo celular. Os dot-blots são representativos de dois experimentos independentes com aquisição de 30,000 eventos no gate indicado pelo protocolo do experimento.



4.6 Modulação da expressão de proteínas relacionadas aos processos de apoptose e autofagia - Objetivos específicos 2 e 3

A modulação da expressão protéica de p53, Bcl2 e Bax, e das proteínas relacionadas ao processo de autofagia, p62 e LC3, foi avaliada, por Western Blot, 24 e 48 h após o estímulo com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100 µg/mL e BSA-AGE 200 µg/mL e S100b 10 µg/mL) e após o co-estímulo dos ligantes (BSA-AGE 200 µg/mL e S100b 10 µg/mL) na presença de camptotecina (5 µM).

Ao longo dos períodos experimentais, é possível observar em células com ou sem pré-ativação (Figuras 19), uma tendência de aumento na autofagia, demonstrada pela redução na expressão de p62 e aumento de LC3 entre os períodos de 24 e 48 h. Além disso, verificamos um aumento na expressão de Bcl2 e redução de Bax, sugerindo uma diminuição do processo de apoptose e evidenciando, portanto, um mecanismo duplo de citoproteção. Por outro lado, é notável o aumento na expressão de p53, sobretudo nas células que receberam pré-ativação, o que, paradoxalmente, indicaria uma tendência de aumento da apoptose. O estímulo com os agonistas de RAGE parece ter tido pouca influência nesse processo.

A presença de camptotecina foi associada à redução na expressão de LC3, p53 e Bax e aumento de Bcl2, principalmente no período de 48 h. Esse resultado provavelmente reflete o mecanismo ação desse composto, que, ainda que não seja completamente conhecido, parece estar relacionado à interferência simultânea e negativa no processo de autofagia e na progressão do ciclo celular. O estímulo com os agonistas de RAGE, particularmente o BSA-AGE em células sem

pré-ativação, atenuaram a inibição de LC3 (autofagia) e p53 (progressão no ciclo celular) induzida pela camptotecina, o que pode estar relacionado à atenuação da apoptose associada ao tratamento com camptotecina nessas células.

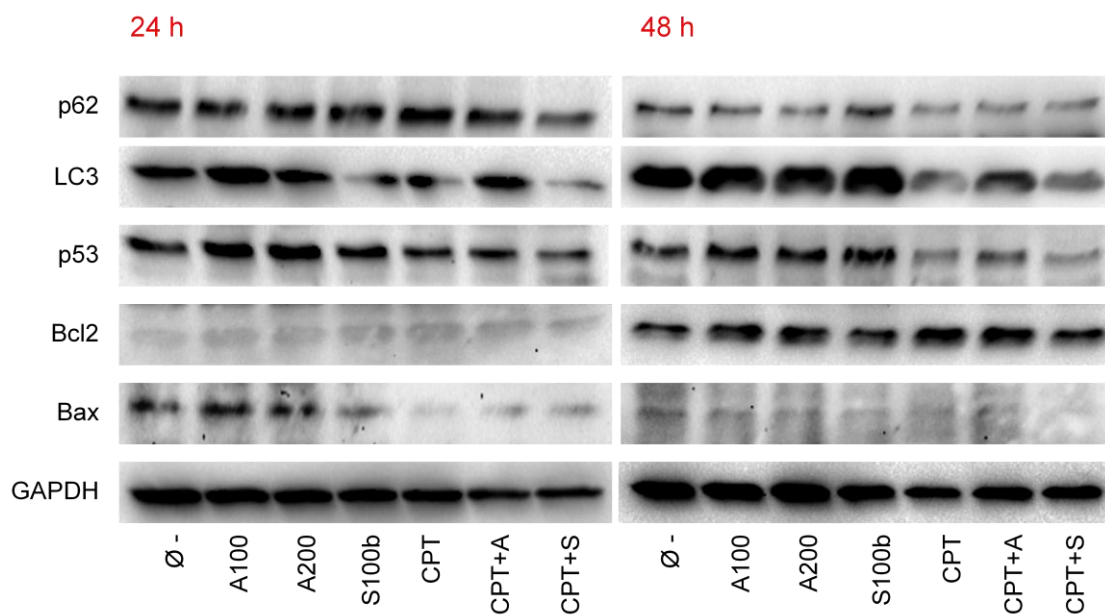
O aumento da expressão de p53 em células pré-ativadas com anticorpos para CD3/CD28 pode estar relacionada à atenuação da proliferação celular observada em outros experimentos. O estímulo com os ligantes de RAGE manteve o efeito de 'resgatar' parcialmente a expressão de p53 e LC3, em especial o BSA-AGE no período de 48 h.

- Efeito em células com superexpressão do receptor:

Em células com expressão aumentada de RAGE (Figura 20), a redução de LC3 e de p53 provocada pela camptotecina se tornou mais evidente, indicando que uma maior disponibilidade desse receptor potencializa a resposta a esse composto. Entretanto, diferente das células não transfectadas, os ligantes de RAGE não atenuaram esse efeito.

Figura 19 – A e B, Modulação da expressão de proteínas representativas dos processos de autofagia (p62 e LC3) e apoptose (p53, Bcl2 e Bax) por células de linhagem de linfócitos T (JM/Jurkat) após estímulo com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na ausência e na presença de camptotecina 5 μM (CPT), nos períodos de 24 h e 48 h. Em ‘A’, células não ativadas e em ‘B’ células pré-ativadas com anticorpos para CD3/CD28. As imagens representativas dos resultados de três experimentos independentes.

A) JM/Jurkat



B) JM/Jurkat CD3/CD28

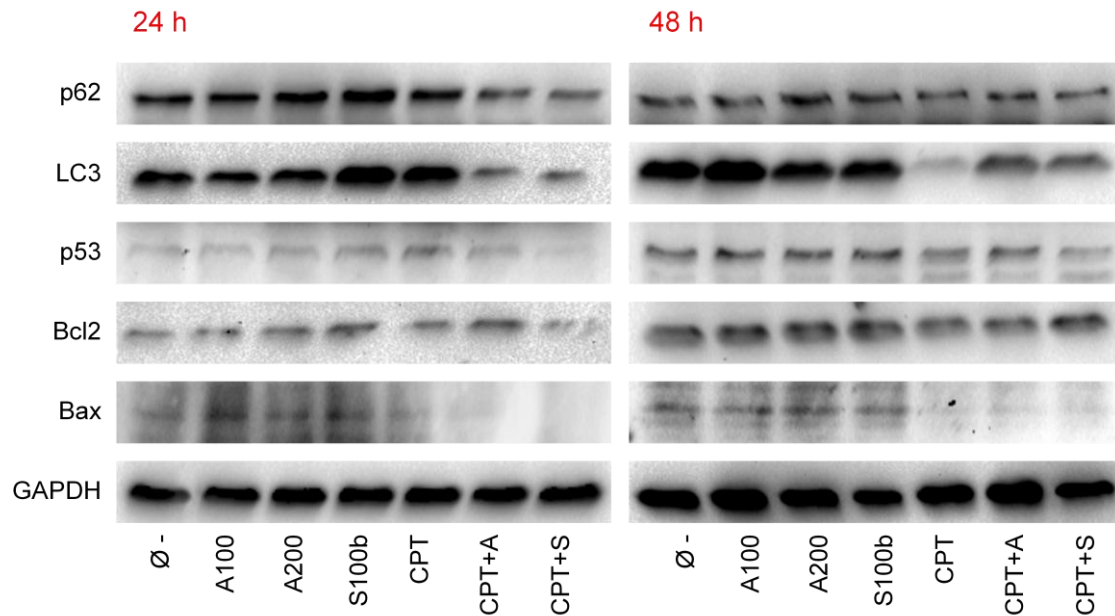
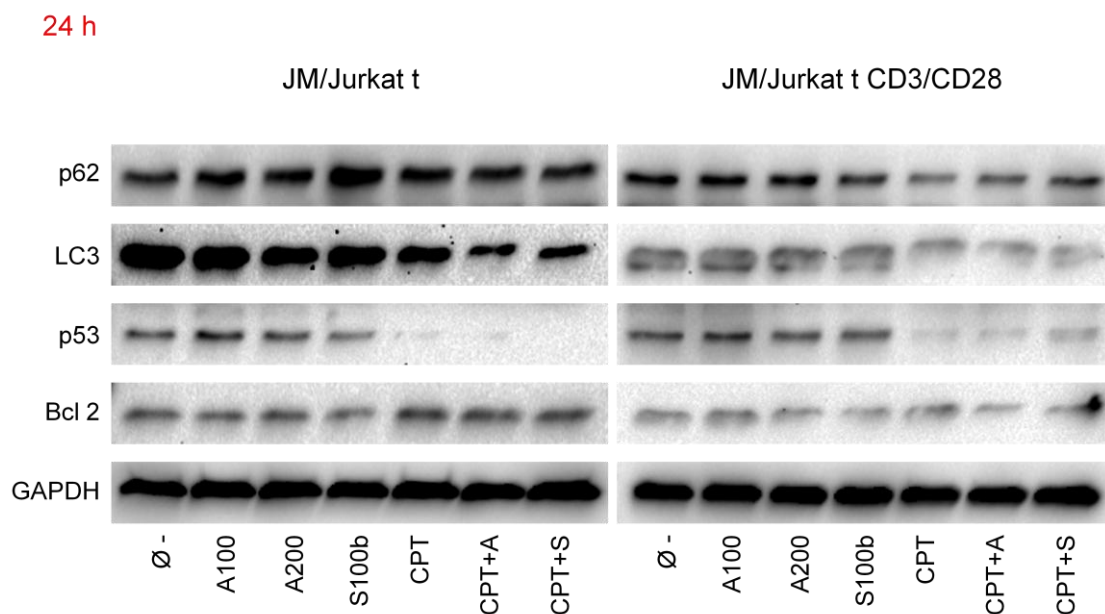


Figura 20 - Modulação da expressão de proteínas representativas do processo de autofagia (p62 e LC3) e de apoptose (p53 e Bcl2) por células transfectadas para expressão de RAGE, pré-ativadas (JM/Jurkat t CD3/CD28) e não pré-ativadas (JM/Jurkat t), estimuladas com os ligantes de BSA-AGE 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e S100b 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na ausência e na presença de camptotecina 5 μM (CPT), no período de 24 h.



4.7 Modulação da ativação de NF- κ B em linfócitos T (JM/Jurkat) após estímulo com ligantes de RAGE - Objetivo específico 4

Evidências indicam que NF- κ B é uma das principais vias de sinalização ativadas a partir de ativação de RAGE. Por isso, avaliamos a modulação da expressão da proteína p50, subunidade desse fator de transcrição, por Western Blot, após o estímulo com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100, 200 μ g/mL e S100b 10 μ g/mL). Esses experimentos também foram realizados associando o estímulo de RAGE (BSA-AGE 200 μ g/mL e S100b 10 μ g/mL) com a camptotecina 5 μ M (CPT). As avaliações foram realizadas nas células com e sem pré-ativação e em dois períodos, de 10 e 30 min (Figura 21). Experimentos em células com superexpressão de RAGE ainda serão realizados.

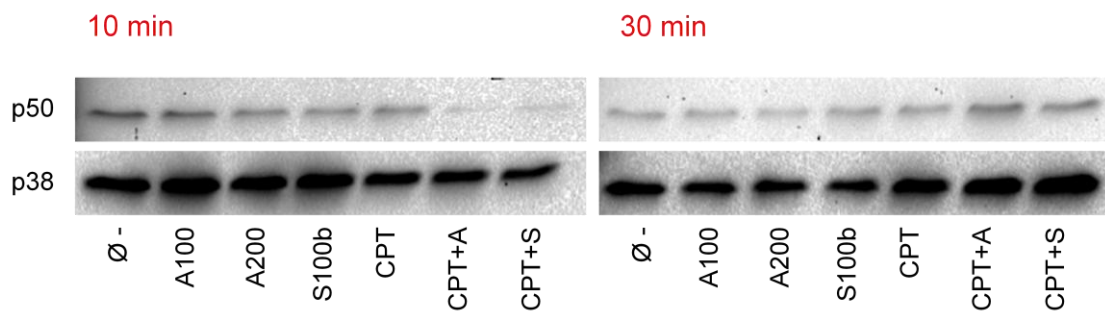
Os resultados indicam que a ativação de NF- κ B pelos agonistas de RAGE ocorreu de forma discreta, notadamente em células pré-ativadas com anticorpos para CD3/CD28 e estimuladas com 200 μ g/mL de BSA-AGE e 10 μ g/mL de S100b. Este efeito discreto pode estar associado à baixa expressão endógena deste receptor nessas células. Ao contrário das células não pré-ativadas, mediante o estímulo do TCR, verificamos uma maior expressão de p50 no período de 30 min, indicando uma ativação tardia do fator de transcrição nessa condição. Nessas células, os ligantes de RAGE, BSA-AGE 200 μ g/mL e S100b, induziram uma maior expressão de p50 no período de 30 min.

A presença de camptotecina não afetou a ativação de NF- κ B, mas o tratamento com os ligantes acentuou essa ativação no período de 30 min nas células sem pré-tratamento. Já em células pré-ativadas, a inibição da expressão de

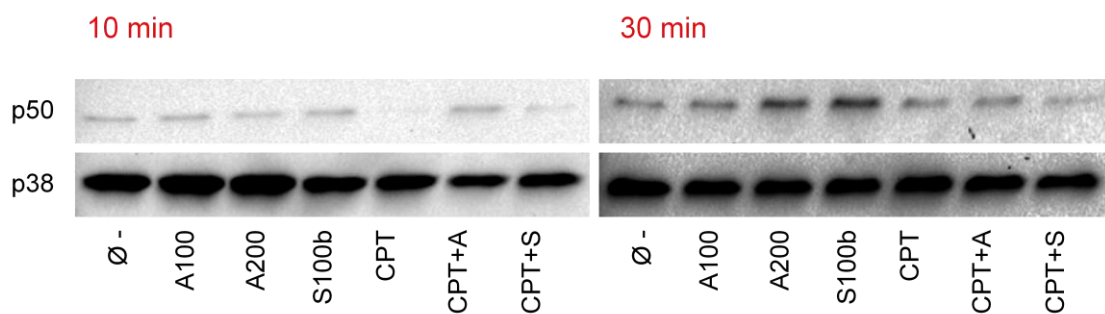
p50 tornou-se mais evidente, especialmente no período de 10 min. Nessa condição, os ligantes de RAGE, sobretudo o BSA-AGE, tiveram um notável efeito de “resgate” da ativação desse fator de transcrição.

Figura 21 - Modulação da ativação de NF- κ B (expressão proteica de p50) por células de linhagem de linfócitos T não pré-ativados (JM/Jurkat) e pré-ativados (JM/Jurkat CD3/CD28), estimulados com os ligantes de RAGE (BSA-AGE 100, 200 μ g/mL e S100b 10 μ g/mL), na ausência e na presença de camptotecina 5 μ M (CPT), nos períodos de 10 e 30 min. Imagens representativas dos resultados de dois experimentos independentes.

JM/Jurkat



JM/Jurkat CD3/CD28



5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, buscamos avaliar o papel da ativação de RAGE na resposta imune adaptativa através da avaliação de seus efeitos na modulação da proliferação, da apoptose e da autofagia de linfócitos T. Verificamos que a exposição aos ligantes de RAGE não afetou a proliferação e a viabilidade celular espontaneamente ou na presença de estímulo com camptotecina, composto que inibe a proliferação celular e induz a apoptose. Embora de forma discreta, em células transfectadas transitoriamente para superexpressão de RAGE, observamos uma tendência de aumento da proliferação e da viabilidade, sobretudo em células pré-ativadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. O efeito dos ligantes na modulação da apoptose espontânea e induzida pela camptotecina variou a depender do tipo e concentração do ligante, do estado de ativação das células e do período experimental avaliado. O tratamento com os agonistas de RAGE em células transfectadas não afetou diretamente a apoptose, mas resultou em um marcante efeito na quantidade de DNA presente nas células, indicando que a principal resposta ao estímulo com os agonistas de RAGE está sobre a dinâmica do ciclo celular. Não observamos mudanças marcantes na expressão de proteínas indicativas do processo de apoptose, Bcl2, Bax e p53, e de autofagia, p62 e LC3, após o estímulo com BSA-AGE e com S100b. No entanto, verificamos que, na presença de camptotecina, esses estímulos atenuaram os efeitos inibitórios desse composto sobre a expressão de LC3 e p53, tanto em células pré-ativadas como não pré-ativadas. Finalmente, observamos que os ligantes de RAGE não modularam a ativação de NF- κ B; entretanto, diante do tratamento com camptotecina, o BSA-AGE produziu um notável efeito de “resgate” desse fator de transcrição.

Estudos recentes demonstraram a expressão de RAGE em células T, ainda que em proporções menores em comparação a outras células do sistema imune como monócitos/macrófagos, granulócitos e células dendríticas (Kierdorf, Fritz⁴⁵, 2013). Moser et al⁶⁴. (2007) observaram que a expressão desse receptor aumentava durante a ativação inicial de linfócitos T isolados de camundongos, sendo expresso em níveis reduzidos em células *naive* e mais elevados em células T de memória. Em consonância com esses achados, Dumitriu et al.¹⁸ (2005) verificaram que o estímulo com HMGB1 secretado por células dendríticas agia, via RAGE, sobre células T pré-ativas mas não células imaturas, sugerindo a importância desse receptor em fases finais da ativação de linfócitos T e também na reativação de células de memória. Akirav et al.² (2012) observaram que a expressão de RAGE em linfócitos T humanos, isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis, aumentava 25 vezes após a ativação do TCR e exposição ao ligante S100b.

Não detectamos a expressão de RAGE em nível protéico na linhagem de linfócitos T que utilizamos (JM/Jurkat), quer seja em células com ou sem ativação prévia, ou após o tratamento com os ligantes BSA-AGE e S100b. Nesse sentido, os experimentos de ganho de função, em que utilizamos células transfectadas transitoriamente com plasmídios codificando a expressão de RAGE sob o controle de um promotor constitutivamente ativo (citomegalovirus, CMV), tiveram como objetivo amplificar as respostas decorrentes da ativação do receptor, permitindo uma avaliação mais clara de seus efeitos. É importante esclarecer que essa linhagem foi estabelecida a partir do sangue periférico de um indivíduo com leucemia de células T e, portanto, a interpretação dos resultados encontrados deve levar em consideração o fato de se tratar de células tumorais.

A expressão de RAGE em linfócitos T parece ser importante para expansão clonal após o reconhecimento de um antígeno (Yan et al.¹⁰⁵, 2010). Ensaios com cultura mista de linfócitos mostraram que o bloqueio do receptor pela adição de sRAGE ou de anticorpos anti-RAGE IgG inibia a proliferação dessas células, efeito que foi atenuado na presença de anticorpos para CD3 e CD28 (Moser et al.⁶⁵, 2007). Posteriormente, esses resultados foram corroborados por outro estudo desse grupo, que utilizou o modelo de linfócitos T transgênico OT-II (linfócitos T CD4+ com TCR específico para o peptídeo ovalbumina – OVA) (Moser et al.⁶⁴, 2007). Eles demonstraram que células deficientes para expressão de RAGE apresentavam uma taxa de proliferação significativamente menor em resposta à ovalbumina em comparação com células RAGE^{+/+}.

Nos experimentos de contagem diferencial, não observamos mudanças significativas na taxa de crescimento celular após o estímulo com doses elevadas dos ligantes BSA-AGE e S100b, mesmo em células pré-ativadas. Entretanto, detectamos uma tendência de aumento na proliferação em células com superexpressão de RAGE, o que pode ser relevante se considerarmos o tempo reduzido de duplicação da linhagem JM/Jurkat. Cabe também ressaltar que a comparação desses resultados com aqueles encontrados em outros estudos deve levar em consideração diferenças de metodologia adotada para avaliação da proliferação celular.

Poucos estudos analisaram a viabilidade celular de linfócitos T após o estímulo com os ligantes de RAGE. Um trabalho que avaliou a morte celular de linfócitos T (JM/Jurkat) expostos a diversas concentrações de BSA-AGE (50, 100, 200 e 400 µg/mL) obteve uma curva dose-resposta decrescente à medida que se aumentava a concentração de BSA-AGE, alcançando uma redução em torno de

50% na viabilidade celular na concentração de 200 µg/mL em comparação ao grupo controle (Hung et al.³³, 2010). Não encontramos outros trabalhos na literatura corroborando esses resultados. Além disso, as análises desse estudo foram realizadas 5 dias após os estímulos, o que poderia justificar as diferenças encontradas em nossos resultados.

Nas avaliações por citometria de fluxo, a principal consequência da exposição aos ligantes de RAGE foi observada na quantidade de DNA das células, indicando uma influência importante sobre o ciclo celular. Esta resposta parece contraditória aos dados de proliferação dos experimentos de contagem diferencial. No entanto, podem indicar um efeito dos ligantes na progressão entre as fases G1 e S, sem que as células necessariamente alcancem a mitose efetiva (que seria detectada no experimento de avaliação da proliferação celular por contagem direta), sugerindo uma modulação de componentes regulatórios do ciclo celular como complexos ciclina-quinase (p. ex. ciclina E-Cdk2), ou proteínas como p21 e/ou p53.

A observação das respostas de linfócitos T mediante a pré-ativação é importante por refletirem de maneira mais próxima o comportamento dessas células in vivo. Os anticorpos contra CD3 são o elemento central para isso, já que enviam o primeiro sinal para ativação/expansão celular ao complexo receptor da célula T (TCR). O sinal co-estimulatório é enviado pelo anticorpo anti-CD28, necessário para maturação da sinapse imunológica, resultando em uma maior eficiência desse processo (Li, Kurlander⁵⁵, 2010). Entretanto, essa ativação pode representar um estresse adicional, além de interferir com aspectos da biologia celular como o ciclo celular. Evidências mostraram que a sinalização através do complexo TCR/CD3 pode inibir temporariamente o ciclo celular ou mesmo induzir a apoptose em algumas linhagens de linfócitos T (Takahashi et al.⁸⁹, 1989; Janssen et al.³⁸, 1991).

Zhu, Anasetti¹¹² (1995) demonstraram que a ativação de células da linhagem JM/Jurkat com anticorpos anti-CD3 bloqueava transitoriamente essas células na fase G1/S, sendo observada uma retomada da síntese de DNA somente após 48 h. Esses achados se assemelham aos que encontramos nas avaliações por citometria de fluxo, em que a proporção de células nas fases S/G2 inicialmente é reduzida com a pré-ativação das células, sendo retomada no período de 72 h.

O aumento na quantidade de DNA após o tratamento com os ligantes foi um achado consistente, embora com intensidades diferentes, em células transfectadas e não-transfectadas, o que levanta a possibilidade de que esses ligantes podem atuar através de outros receptores de superfície. De fato, estudos recentes mostraram que RAGE pode cooperar funcionalmente com outros PRRs (Ibrahim et al.³⁶, 2013). Está bem estabelecido que RAGE e alguns membros da família de receptores TLR possuem ligantes em comum, incluindo HMGB1 (Yu et al.¹⁰⁷, 2006; Ivanov et al.³⁷, 2007), S100A8/A9 (Vogl et al.⁹³, 2007) e o peptídeo A β (Liu et al.⁵⁸, 1997). Ainda não estão claras quais condições determinam a preferência de cada ligante por um dos seus receptores, ou mesmo o tipo de relação que será estabelecida entre este outro receptor e RAGE – sinergismo ou antagonismo. No entanto, fatores como o tipo celular, características do meio externo, concentração e o estado molecular do ligante e/ou do receptor parecem ser relevantes para isso.

Estudos mostraram que, ainda que RAGE seja um importante mediador da sinalização desencadeada por S100b, ele não é o único receptor capaz de se ligar a essa proteína. Foi demonstrado que o estímulo com S100b pode exercer efeitos independentes de RAGE sobre micróglia e mioblastos (Adami et al.¹, 2004; Sorci et al.⁸⁰, 2004; Riuzzi et al.⁷⁷, 2011). Além disso, von Bauer et al.⁹⁶

(2013) verificaram que esse ligante pode interagir com o receptor CD166/ALCAM, atuando de maneira compensatória a RAGE na ativação de NF- κ B no contexto de processos inflamatórios mediados por S100b, como a reação de hipersensibilidade do tipo tardio (*delayed-type hypersensitivity*, DTH).

Não foram encontrados na literatura relatos sobre possíveis efeitos RAGE-independentes de AGES. Foi demonstrado que o BSA-AGE preparado in vitro pela incubação da albumina sérica bovina (BSA) em altas doses de glicose apresenta uma elevada afinidade por RAGE ($K_D = 50$ nM) (Schmidt et al.⁷⁸, 1992), o que explica a resposta das células com superexpressão do receptor à esse ligante. Novos experimentos devem ser realizados no sentido de explicar os efeitos observados nas células não transfectadas.

Escolhemos como controle positivo para apoptose e para avaliação da influência da ativação com os ligantes de RAGE na apoptose induzida, o tratamento das células com camptotecina. Esse composto é reconhecido por seu potente efeito antiproliferativo e citotóxico, tendo aplicação terapêutica como agente antitumoral (Slichenmeyer et al.⁷⁹, 1993; Dancey, Eisenhauer¹⁵, 1996). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima topoisomerase I (topo I), cuja função é produzir quebras em uma das cadeias do DNA durante sua replicação, permitindo o giro da cadeia quebrada sobre a cadeia intacta. Nesse processo, a camptotecina se liga ao complexo DNA-topo I, resultando em quebras irreversíveis no DNA e na indução da morte celular por apoptose (Liu et al.⁵⁷, 2000). Observamos que o estímulo com esse composto causou um aumento na proporção de células na fase G1, além de ter induzido a morte por apoptose nas fases S/G2. Esses achados estão de acordo com aqueles descritos por Johnson et al.⁴⁰ (1997), que investigaram os efeitos da camptotecina na linhagem JM/Jurkat.

Observamos que os efeitos dos ligantes de RAGE na modulação da apoptose espontânea e induzida pela camptotecina variaram a depender do período avaliado, do estado de ativação da célula e do ligante utilizado. Essas diferenças podem estar relacionadas, em parte, às condições celulares: em períodos iniciais, as células estão metabolicamente mais ativas e em proliferação intensa, por isso o percentual de células apoptóticas é menor; já em períodos tardios, embora continuem proliferando, já há um esgotamento de nutrientes do meio e alterações nas condições de pH do microambiente, que resultam em aumento natural da apoptose. Também podem indicar que os ligantes BSA-AGE e S100b podem, sob condições diferentes, exercer efeitos distintos e até opostos na apoptose dessas células.

Resultados conflitantes desse tipo foram observados por outros pesquisadores em diversos tipos celulares. Huttunen et al.³⁵ (2000) mostraram que o S100b tinha um efeito duplo sobre a linhagem de células neurais N18. Enquanto concentrações nanomolares induziam crescimento neural, concentrações micromolares desse ligante levavam a apoptose celular. Na linhagem de neuroblastoma LAN-5, o tratamento com doses nanomolares de S100b neutralizou a neurotoxicidade do peptídeo A β , já doses micromolares tiveram um efeito aditivo sobre a toxicidade dessa proteína (Businaro et al.⁶, 2006). Ao contrário do S100b, os AGES compreendem uma classe heterogênea de compostos que apresentam diferenças quanto a capacidade de ligação ou grau de afinidade a RAGE (Takahashi et al.⁸⁸, 2009). Provavelmente por esse motivo, não encontramos relatos semelhantes na literatura sobre a ação específica do BSA-AGE.

Na avaliação da expressão de proteínas relacionadas aos processos de apoptose e autofagia, detectamos entre os períodos de 24 e 48 h, um aumento

na expressão de LC3 e redução de p62, indicando uma tendência de aumento da autofagia ao longo do tempo, o que pode ser decorrente da tentativa de adaptação metabólica das células às condições de esgotamento de nutrientes do meio. Verificamos também um aumento na expressão de Bcl2 e redução de Bax, sugerindo um mecanismo duplo de citoproteção. Paradoxalmente, é notável o aumento na expressão de p53, sobretudo nas células que receberam pré-ativação, o que, indicaria uma tendência de aumento da apoptose. Esse achado pode ser entendido, em parte, pelo fato de que a autofagia e a apoptose são processos catabólicos funcionalmente relacionados, que podem ser desencadeados por estímulos iguais e que possuem componentes regulatórios em comum, podendo ser mutuamente excludentes ou não, sendo possível a ocorrência de ambos a depender do contexto celular (Maiuri et al.⁶⁰, 2007).

Na presença de camptotecina, verificamos uma redução na expressão de Bax e aumento de Bcl2, que podem ser resultado de uma tentativa de adaptação a esse fator adicional de estresse celular. Porém, um achado mais intrigante foi a redução na expressão de p53 na presença desse composto. Esse fator de transcrição é classicamente descrito como um supressor de tumor e indutor de apoptose. Esse resultado pode ser parcialmente devido ao mecanismo de ação da camptotecina, que causa perturbações no ciclo celular (Johnson et al.⁴⁰, 1997). Mas, evidências sugerem ainda que p53 pode assumir um papel positivo na sobrevivência celular em resposta a condições de estresse fisiológico, resultando, inclusive, em estímulo à autofagia (Zeng et al.¹⁰⁸, 2007).

Observamos que a expressão de p53 foi parcialmente resgatada pelo tratamento com os agonistas de RAGE, sobretudo o BSA-AGE, o que pode explicar os dados encontrados nos experimentos de citometria, em que verificamos uma

atenuação marcante da inibição do ciclo celular associada ao tratamento com camptotecina quando as células foram também estimuladas com os ligantes de RAGE. Efeito de resgate semelhante foi verificado na expressão de p50, ressaltando a importância desse ligante na ativação de NF- κ B por essas células.

Assim, podemos concluir que o papel de RAGE na modulação da proliferação, apoptose e autofagia da linhagem de células T JM/Jurkat é discreto e depende das condições experimentais (estado de ativação, tempo em cultura). Especulativamente, é tentador sugerir que, *in vivo* (p. ex. em um indivíduo com diabetes não compensada), o acúmulo de AGES pode afetar o comportamento de linfócitos T *naive* e efetores de maneiras distintas e, conseqüentemente, influenciar a resposta imune adaptativa de modos diferentes. No entanto, há que se considerar a complexidade desse sistema, em que diversos outros tipos celulares estão envolvidos, além de co-ativadores derivados de microorganismos (PAMPs) ou do próprio hospedeiro (DAMPs), os quais também podem exercer efeitos sobre RAGE e sobre outros receptores.

6 CONCLUSÃO

Em resposta a hipótese principal desse trabalho, concluímos que a ativação de RAGE modula de forma discreta a biologia de linfócitos T. Entretanto, esses efeitos modulatórios sofrem grande influência de condições experimentais, tais como a natureza e a concentração do ligante, o estado de ativação celular e o período de cultura.

A partir dos resultados observados e considerando os objetivos específicos que foram propostos, também concluímos que:

- A ativação de RAGE tende a aumentar a proliferação e a reduzir a morte de linfócitos T, sobretudo após a pré-ativação das células.

- O estímulo com BSA-AGE e S100b produzem efeitos distintos sobre a apoptose espontânea e induzida de linfócitos T, ora inibindo, ora aumentando a depender da concentração e do ligante utilizado, do estado de pré-ativação das células e do período experimental avaliado. A expressão de proteínas indicativas do processo de apoptose, Bcl2, Bax e p53 não é regulada por esses ligantes; entretanto, na presença de camptotecina, esses estímulos atenuam os efeitos inibitórios desse composto sobre a expressão de p53.

- Os ligantes de RAGE não modulam a expressão das proteínas características do processo de autofagia LC3 e p62 em células T. No entanto, eles reduzem o efeito inibitório da camptotecina na expressão de LC3.

- A ativação de NF- κ B não é diretamente regulada pela exposição aos ligantes de RAGE, mas, na presença de camptotecina, o BSA-AGE produz um efeito de “resgate” desse fator de transcrição.

REFERÊNCIAS*

1. Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R. S100b-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1742 (1- 3): 169-77.
2. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt M, et al. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One*. 2012; 7(4): e34698.
3. American Diabetes Association (US). Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. *Diabetes Care*. 2008; 31 (3): 596- 615.
4. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for glycation end products. *J Mol Med*. 2005; 83 (11): 876- 86.
5. Brune M, Müller M, Melino G, Bierhaus A, Schilling T, Nawroth PP. Depletion of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) sensitizes towards apoptosis via p53 e p73 posttranslational regulation. *Oncogene*. 2013; 32 (11): 1460-8.
6. Businaro R, Leone S, Frabrizi C, Sorci G, Donato R, Lauro GM, et al. S100b protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res*. 2006; 83 (5): 897-906.
7. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counter-receptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 2003; 198 (10): 1507-15.
8. Chen J, Song M, Yu S, Gao P, Yu Y, Wang H, et al. Advanced glycation endproducts alter functions and promote apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation endproducts mediate overpression of cell oxidant stress. *Mol Cell Biochem*. 2010; 335 (1- 2): 137–46.
9. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai DD, et al. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 4272- 8.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas de Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Chen Y, Yan SS, Colgan J, Zhang HP, Luban J, Schmidt AM, et al. Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol*. 2004; 173 (2): 1399- 405.
11. Clynes R, Moser B, Yan SF, Ramasary R, Herold K, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr Mol Med*. 2007; 7 (8): 743-51.
12. Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*. 1998; 25 (2): 112- 24.
13. Cowie CC, Rust KF, Ford ES, Eberhardt MS, Byrd-Holt DD, Li C, et al. Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006. *Diabetes Care*. 2009; 32 (2): 287-94.
14. D'Agati V, Schmidt AM. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6 (6): 352- 60.
15. Dancey J, Eisenhauer EA. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. *Br J Cancer*. 1996; 74 (3): 327-38.
16. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*. 1997; 14 (1): 29- 34.
17. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001; 33 (7): 637-68.
18. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol*. 2005; 174 (12): 7506-15.
19. Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, et al. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (10): 5296- 301.
20. Engelgau MM, Geiss LS, Saaddine JB, Boyle JP, Benjamin SM, Gregg EW, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Ann Intern Med*. 2004; 140 (11): 945- 50.

- 21.** Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, et al. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2010; 24 (4): 1043- 55.
- 22.** Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36 (12): 625- 32.
- 23.** Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium- regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 370 (1): 1- 5.
- 24.** Ge J, Jia Q, Liang C, Luo Y, Huang D, Sun A, et al. Advanced glycosylation end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25 (10): 2157- 63.
- 25.** González I, Romero J, Rodríguez BL, Pérez-Castro R, Rojas A. The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. *Immunobiology.* 2013; 218 (5): 790- 7.
- 26.** Goodwin G, Rabbani A, Nicolas P, Johns E. The isolation of the high mobility group non-histone chromosomal protein HMG 14. *FEBS Lett.* 1977; 80 (2): 413- 6.
- 27.** Griffin WS, Sheng JG, McKenzie JE, Royston MC, Gentleman SM, Brumback RA, et al. Life-long overexpression of S100b in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 1998; 19 (5): 401–5.
- 28.** Han SH, Kim YH, Mook-Jung I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of action. *Mol Cells.* 2011; 31 (2): 91- 7.
- 29.** Heizmann CW, Ackermann GE, Galichet A. Pathologies involving the S100 proteins and RAGE. *Subcell Biochem.* 2007; 45: 93- 138.
- 30.** Heymann D. Autophagy: a protective mechanism in response to stress and inflammation. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006; 7 (5): 443-50.
- 31.** Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (12): 923- 34.
- 32.** Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* 2008; 22 (5): 1572- 80.

- 33.** Hung LF, Huang KY, Yang DH, Chang DM, Lai JH, Ho LJ. Advanced glycation end products induce T cell apoptosis: involvement of oxidative stress, caspase and the mitochondrial pathway. *Mech Ageing Dev.* 2010; 131 (11- 12): 682-91.
- 34.** Hu P, Lai D, Lu P, Gao J, He H. ERK e Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product- induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* 2012; 29 (4): 613-8.
- 35.** Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000; 275 (51): 40096- 105.
- 36.** Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol.* 2013; 56 (4): 739-44.
- 37.** Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR-9 mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007; 110 (6): 1970-81.
- 38.** Janssen O, Wesselborg S, Heckl-östreicher B, Pechhold K, Bender A, Schondelmaier S, et al. T cell receptor/CD3- signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells. *J Immunol.* 1991; 146 (1): 35-9.
- 39.** Jin Q, Chen H, Luo A, Ding F, Liu Z. S100A14 stimulates cell proliferation and induces cell apoptosis at different concentrations via receptor for advanced glycation end products (RAGE). *PLoS ONE.* 2011; 6(4): e19375.
- 40.** Johnson N, Ng TTC, Parkin JM. Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis. *Leuk Res.* 1997; 21 (10): 961-72.
- 41.** Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ.* 2010; 17 (4): 666-76.
- 42.** Kang R, Loux T, Tang D, Schapiro NE, Vernon P, Livesey KM, et al. The expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (18): 7031-6.
- 43.** Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh HJ. RAGE regulates autophagy and apoptosis following oxidative injury. *Autophagy.* 2011; 7 (4): 442-4.

44. Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CEH. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol*. 2011; 238 (1-2): 1-11.
45. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013; 94 (1): 55- 68.
46. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. The diabetes control and complications trial: the gift that keeps giving. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5 (10):537- 45.
47. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 2008; 79 (8): 1527- 34.
48. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N ϵ -(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*. 1999; 274 (44): 31740- 9.
49. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, et al. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure*. 2010; 18 (10): 1342- 52.
50. Konishi H, Nakatsuka M, Chekir C, Noguchi S, Kamada Y, Sasaki A, et al. Advanced glycation end products induce secretion of chemokines and apoptosis in human first trimester trophoblasts. *Hum Reprod*. 2004; 19 (9): 2156- 62.
51. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793 (6): 993- 1007.
52. Lee BW, Chae HY, Kwon SJ, Park SY, Ihm J, Ihm SH. RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic β - cells via oxidative stress. *Int J Mol Med*. 2010; 26 (6): 813- 8.
53. Li DS, Warnock GL, Tu HJ, Ao Z, He Z, Lu H, et al. Do immunotherapy and beta cell replacement play a synergistic role in the treatment of type 1 diabetes? *Life Sci*. 2009; 85 (15- 16): 549- 56.
54. Li G, Liang X, Lotze MT. HMGB1: the central cytokine for all lymphoid cells. *Front Immunol*. 2013; 4:68. doi: 10.3389/fimmu.2013.00068.
55. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD-8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med*. 2010; 8:104.

- 56.** Li YM, Baviello G, Vlassara H, Mitsuhashi T. Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. *J Immunol Methods*. 1997; 201 (2): 183- 8.
- 57.** Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 922: 1-10.
- 58.** Liu Y, Dargusch R, Schubert D. Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237 (1): 37-40.
- 59.** Loske C, Neumann A, Cunningham AM, Nichol K, Schinzel R, Riederer P, et al. Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress. *J Neural Transm*. 1998; 105 (8- 9): 1005- 15.
- 60.** Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (9): 741-52.
- 61.** Mahali S, Raviprakash N, Raghavendra PB, Manna SK. Advanced glycation end products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway: involvement of Ca²⁺ mediated by interleukin-8 protein. *J Biol Chem*. 2011; 286 (40): 34903-13.
- 62.** Meloche J, Paulin R, Courboulin A, Lambert C, Barrier M, Bonnet P, et al. RAGE-dependent activation of the oncoprotein Pim1 plays a critical role in systemic vascular remodeling processes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31 (9): 2114–24.
- 63.** Mooradian AD. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: current management guidelines. *Arch Intern Med*. 2003; 163 (1): 33- 40.
- 64.** Moser B, Desai DD, Downie MP, Chen Y, Yan SF, Herold K, et al. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contribute to antigen-specific cellular expansion in vivo. *J Immunol*. 2007; 179 (12): 8051- 8.
- 65.** Moser B, Szabolcs MJ, Ankersmit HJ, Lu Y, Qu W, Weinberg A, et al. Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation. *Am J Transplant*. 2007; 7 (2): 293-302.
- 66.** Mrak RE, Griffin WS. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22 (6): 915–22.

- 67.** Mu L, Zhang Y, Sun B, Wang J, Xie X, Li N, et al. Activation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) exacerbates experimental autoimmune myasthenia gravis symptoms. *Clin Immunol.* 2011; 141 (1): 36-48.
- 68.** Müller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, et al. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 2001; 20 (16): 4337-40.
- 69.** Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992; 267 (21): 14998- 5004.
- 70.** Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100b modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (6): 4037-42.
- 71.** Nishizawa Y, Koyama H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end- products and cardiovascular disease in end-stage renal disease. *J Ren Nutr.* 2008; 18 (1): 76- 82.
- 72.** Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, et al. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100b. *EMBO J.* 2007; 26 (16): 3868- 78.
- 73.** Park L, Raman K, Lee KJ, Lu Y, Ferran Jr. LJ, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998; 4 (9): 1025-31.
- 74.** Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23 (1): 3- 13.
- 75.** Popa I, Ganea E, Petruscu SM. RAGE over AGEs and DAMPS. *Rom J Biochem.* 2012; 49 (2): 195- 210.
- 76.** Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001; 286 (3): 327- 34.
- 77.** Riuzzi F, Sorci G, Donato R. S100b protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *J Cell Sci.* 2011; 124 (14): 2389-400.

- 78.** Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 1992; 267 (21): 14987- 97.
- 79.** Slichenmeyer WJ, Rowinsky EK, Donehower RC, Kaufmann SH. The current status of camptothecin analogs as anticancer agents. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85 (4): 271-91.
- 80.** Sorci G, Riuzzi F, Agneletti AL, Marchetti C, Donato R. S100b causes apoptosis in a myoblast cell line in a RAGE-independent manner. *J Cell Physiol.* 2004; 199 (2): 274-83.
- 81.** Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giamanco I, Donato R. Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100b via RAGE binding. *Mol Cell Biol.* 2004; 24 (11): 4880- 94.
- 82.** Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833 (1): 101-9.
- 83.** Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, et al. RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med.* 2009; 7:17. doi: 10.1186/1479-5876-7-17.
- 84.** Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care.* 1993; 16 (2): 434- 44.
- 85.** Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, et al. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2009; 82 (2): 371- 81.
- 86.** Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi M, Kawashima M, Yamamoto H, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 (3): R69.
- 87.** Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 (1): 97-104.

- 88.** Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, et al. Advanced glycation end products subspecies- selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330 (1): 89- 98.
- 89.** Takahashi S, Maecker HT, Levy R. DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line. *Eur J Immunol.* 1989; 19 (10): 1911-9.
- 90.** Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol.* 2010; 190 (5): 881-92.
- 91.** Thomas JO. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29 (Pt 4): 395-401.
- 92.** Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the U.S. adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30 (3): 182- 92.
- 93.** Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med.* 2007; 13 (9): 1042-9.
- 94.** Volz HC, Seidel C, Laohachewin D, Kaya Z, Müller OJ, Pleger ST, et al. HMGB1: the missing link between diabetes mellitus and heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2010; 105 (6): 805- 29.
- 95.** Volz HC, Laohachewin D, Seidel C, Lasitschka F, Keilbach K, Wienbrandt AR, et al. S100A8/A9 aggravates post- ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. *Basic Res Cardiol.* 2012; 107 (2): 250.
- 96.** von Bauer R, Oikonomou D, Sulaj A, Mohammed S, Hotz-Wagenblatt A, Gröne HJ, et al. CD166/ALCAM mediates proinflammatory effects of S100b in delayed type hypersensitivity. *J Immunol.* 2013; 191 (1): 369- 77.
- 97.** Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12 (7): 439- 52.
- 98.** Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, et al. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2006; 185 (1): 70-7.

- 99.** Whiteley L, Padmanabhan S, Hole D, Isles C. Should diabetes be considered a coronary heart disease risk equivalent? : results from 25 years of follow-up in the Renfrew and Paisley survey. *Diabetes Care*. 2005; 28 (7): 1588- 93.
- 100.** Wild CA, Bergmann C, Fritz G, Schuler P, Hoffmann TK, Lotfi R, et al. HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int Immunol*. 2012; 24 (8): 485- 94.
- 101.** Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008; 3 (283): 27255- 69.
- 102.** Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signaling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal*. 2013; 25 (11): 2185-97.
- 103.** Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol*. 2011; 186 (5): 3248- 57.
- 104.** Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996; 382 (6593): 685-91.
- 105.** Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*. 2010; 106 (5):842-53.
- 106.** Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, Furtado G, Chen X, Yan SF, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med*. 2003; 9 (3): 287- 93.
- 107.** Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. Hmgb1 signals through Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006; 26 (2): 174-9.
- 108.** Zeng X, Yan T, Schupp JE, Seo Y, Kinsella TJ. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (4): 1315-21.
- 109.** Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2008; 283 (51): 35507- 16.

- 110.** Zhao LM, Su XL, Wang Y, Li GR, Deng XL. KCa3.1 channels mediate the increase of cell migration and proliferation by advanced glycation endproducts in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Lab Invest.* 2013; 93 (2): 159-67.
- 111.** Zhou LL, Cao W, Xie C, Tian J, Zhou Z, Zhou Q, et al. The receptor for advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products- induced podocyte apoptosis. *Kidney Int.* 2012; 82 (7): 759-70.
- 112.** Zhu L, Anasetti C. Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T cells. *J Immunol.* 1995; 154 (1): 192-200.

ANEXO

UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara

**DECLARAÇÃO**

DECLARO, para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado "**Modulação da proliferação, apoptose e autofagia de linfócitos T por RAGE**" não foi submetido a Comitê de Ética em Pesquisa pelo fato de não envolver o uso de animais experimentais ou seres humanos. A linhagem celular utilizada neste projeto foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, do Depto. de Biologia Celular e Agentes Biopatogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Essa linhagem foi estabelecida há mais de 30 anos, sendo atualmente de domínio da comunidade científica e amplamente utilizada por pesquisadores em todo o mundo. Assim, trata-se de uma pesquisa totalmente realizada in vitro e que não apresenta comprometimento de aspectos éticos.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Responsável pelo projeto

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

Rua Humaitá, 1680 - Centro

Araraquara - SP 14801-903

fone: (16) 33016509 - e-mail: crossajr@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 21 de março de 2014

Lígia Araujo Barbosa