

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

**Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli**

**PAPEL DE RAGE E TLR4 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA  
IMUNE INFLAMATÓRIA EM PBMC DE PACIENTES  
DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS. (ESTUDO IN VITRO).**

**ARARAQUARA  
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

**SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI**

**PAPEL DE RAGE E TLR4 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE  
INFLAMATÓRIA EM PBMC DE PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO  
DIABÉTICOS (ESTUDO IN VITRO).**

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

**Orientador:**

Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

**Coorientadora:**

Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

**ARARAQUARA  
2012**

**SABRINA CRUZ TFAILE FRASNELLI**

**PAPEL DE RAGE E TLR4 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE  
INFLAMATÓRIA EM PBMC DE PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO  
DIABÉTICOS (ESTUDO IN VITRO).**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2° Examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

3° Examinador: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araraquara, 26 de março de 2012

## **Dados Curriculares**

**Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli**

**Nascimento:** 21 de agosto de 1983

**Filiação:** Antonio Adilson Frasnelli  
Salma Cruz Tfaile Frasnelli

**2004-2007:** Curso de Graduação em Odontologia pela  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

**2008/2009:** Curso de Especialização em Periodontia pela  
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD  
Regional de São Carlos

**2010/2012:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia,  
Área de Periodontia, Nível Mestrado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara- Unesp

Frasnelli, Sabrina Cruz Tfaile

Papel de RAGE e TLR4 na modulação da resposta imune inflamatória em PBMC de pacientes diabéticos e não diabéticos (estudo in vitro) / Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

85 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

1. Diabetes Mellitus 2. Produtos finais de glicosilação  
3. Receptores Toll-like 4. Linfócitos T Auxiliares-indutores I. Título

# DEDICATÓRIA

## A Deus

Por me guiar, me fortalecer. Por sua presença. Por seu amor. Por tudo que sou.

## Aos meus pais, **Salma e Adilson**

Por todo incentivo e confiança. Por um amor incondicional que me conforta e me fortalece nos momentos mais difíceis e de descrença. Por gestos e palavras de carinho que não me deixam desanimar. E agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida e por ter escolhido vocês como meus pais! Amo muito vocês.

## Ao meu marido, **Diego**

Pelo apoio e incentivo nessa minha trajetória. Por não desistir de mim nem por um só instante e me fazer acreditar que o amanhã sempre será melhor, porque realmente sempre é! Pela paciência e a compreensão da minha ausência em maior parte do tempo dos nossos dias. Por ser a pessoa que eu amo e me completa!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Aos meus **Familiares, em especial minhas tias,**

Por serem tão especiais e pela presença em todos os meus dias. Por todo incentivo e contribuição em todas minhas realizações. Obrigada a todos!

Ao meu orientador **Prof.Dr. Carlos Rossa Junior,**

Por toda paciência, e aprendizado. Pela confiança depositada em mim e pelo aceite da minha orientação. Pela sensibilidade em apontar meus erros, e novos desafios, me ajudando a vencê-los. Obrigada pela contribuição em minha formação científica, acadêmica e pessoal. Minha sincera gratidão e admiração por você!

A minha coorientadora **Profa. Dra. Silvana R. P. Orrico,**

Por todo carinho e apoio nesses anos de convivência. Por todo aprendizado, paciência e compreensão. Pela amizade e oportunidade de me apresentar à pesquisa. Por ser uma pessoa muito especial em minha vida, que contribuiu e fez toda diferença para minha formação.

A minha eterna **Professora Sandra Oliveira,**

Por ter me recebido em seu laboratório com tanto carinho. Por ter confiado em mim e pela oportunidade de trabalhar e me fazer apaixonar pela pesquisa laboratorial. Por me compreender quando mais precisei e pelo incentivo durante todo tempo, minha eterna gratidão e admiração por você. E apesar de

toda minha distância, me conforta saber que posso confiar em você, minha  
amiga professora.

Ao querido **Prof. Dr. José Eduardo Sampaio,**

Por todo carinho durante esses anos de convivência. Por ser este docente que  
levo como exemplo para minha formação. Pela amizade, pela paciência,  
carinho e o respeito compartilhado. É imensa minha admiração por você.

Aos meus amigos: **Marcell e João Antonio,**

Pela amizade, carinho, apoio e colaboração em trabalhos. Pela convivência  
harmoniosa, pela paciência e por todo respeito. Obrigada por vocês fazerem  
parte da minha vida, não apenas contribuindo com a minha formação  
acadêmica, mas por se tornarem pessoas tão importantes e essenciais no meu  
dia-a-dia.

As minhas eternas amigas: **Adriana M. Oguri, Cláudia M. Fontana, Catarina  
Silveira, Maisa Martini, Carla Correa, Raquel Medeiros, Tuca**

Por acreditarem e torcerem por mim mesmo estando tão longe. Por saber que  
posso confiar em vocês sempre, pois sempre estiveram ao meu lado! Amo  
vocês!

Ao **Prof.Dr. João Santana da Silva**, por sua colaboração nesse trabalho e a  
disponibilização de seu laboratório para que fossem realizados alguns  
experimentos. Obrigada pela atenção!

## **AGRADECIMENTOS**

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. **José Cláudio Martins Segalla**, e da Vice-Diretora, Profa. Dra. **Andreia Affonso Barretto Montandon**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (Processo nº2010/06589-8) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, Prof. Dr. **Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **José Eduardo Cezar Sampaio**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, que colaboraram coma minha formação, em especial Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior** e Profa. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, pela orientação e coorientação durante a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Fabiana, Fausto, Felipe, Fernanda, Livia, Luiz, Giovana, Pablo, Rafael**, pela harmoniosa convivência, e pelo carinho de cada um de vocês.

Aos meus queridos amigos de pós-graduação: **Chaíne, Michele, Shelon, Andressa, Telma, Nicole, Sâmia, Sâmara, Guilherme, Jonatas, Mário**, por serem tão especiais e tão importantes para mim. Obrigada pelas inúmeras conversas, risadas, conselhos, apoio, incentivo e tantas outras coisas boas que vocês me ofereceram por todo esse tempo juntos!

Aos colegas da Pós-Graduação: **Alliny, Ana Lúcia, João Paulo, Leila, Lucas, Nicolau, Rodrigo, Rubinho, Rubens, Túlio, Sabrina** pela convivência harmoniosa e companheirismo.

As minhas companheiras de laboratório: **Morgana, Carol, Maíra, Gabriela**, pelo carinho, paciência e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Claudinha, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Ester, Regina Lúcia, Thelma, Toninho**, por todo trabalho e dedicação que contribuíram para a realização desse trabalho. Além disso, pelo carinho e hospitalidade que sempre me trataram! Vocês são muito especiais para mim.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia**, pela gentileza, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas e problemas!

Aos funcionários da Biblioteca, **Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres**, pela atenção e disponibilidade.

Aos **doadores voluntários e a equipe do laboratório São Lucas**, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas de sangue e que com amabilidade compreenderam meu desafio e dividiram esta responsabilidade comigo! Sou muito grata a todos vocês.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

# ***EPÍGRAFE***

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

# SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	12
Lista de Tabelas e Quadros.....	14
Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas .....	15
Resumo .....	17
Abstract .....	19
1 Introdução e Justificativa .....	21
2 Proposição .....	36
3 Material e Método .....	37
3.1 Preparo da albumina sérica glicada (BSA-AGE) .....	37
3.2 Obtenção de amostras de PBMC do sangue periférico dos pacientes voluntários .....	37
3.3 Avaliação de apoptose e viabilidade celular das células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos .....	40
3.4 Avaliação da presença de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> na população mista de PBMC isolada do sangue periférico e modulação do perfil de resposta T auxiliar (Th1/Th2/Th17) .....	43
3.5 Modulação da expressão gênica (RNAm) nas células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos .....	44
3.6 Análise Estatística .....	45
4 Resultado .....	46
5 Discussão .....	66
6 Conclusão.....	79
7 Referências.....	80
8 Anexos.....	85
Anexo 1A - Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Potencial apoptótico em PBMC de indivíduos não diabéticos.

Figura 2 - Potencial apoptótico em PBMC de indivíduos portadores de diabetes tipo 2.

Figura 3 - Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica das PBMCs no período de 24 horas.

Figura 4 - Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica das PBMCs no período de 48 horas.

Figura 5 - Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica das PBMCs no período de 72 horas.

Figura 6 - Avaliação dos tratamentos na indução de morte das PBMCs nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Figura 7 - Avaliação do percentual de linfócitos T auxiliares (CD4+) na população mista de PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 8 - Comparação do percentual de linfócitos T auxiliares (CD4+) na população mista de PBMC, entre indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 9 - Avaliação da proporção de células Th1 (IFN- $\gamma$ +) em PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 10 - Avaliação da proporção de células Th2 (IL-4+) em PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 11 - Avaliação da proporção de células Th17 (IL-17a+) em PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 12 - Proporção entre o padrão de resposta de células CD4+ em indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Figura 13 - Expressão gênica (RNAm) de RAGE avaliada por RT-qPCR em PBMC de indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

Figura 14 - Expressão gênica (RNAm) de CCL3 avaliada por RT-qPCR em PBMC de indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

Figura 15 - Expressão gênica (RNAm) de CCR5 avaliada por RT-qPCR em PBMC de indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

Figura 16 - Expressão gênica (RNAm) de IL-10 avaliada por RT-qPCR em PBMC de indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

Figura 17 - Expressão gênica (RNAm) de TNF- $\alpha$  avaliada por RT-qPCR em PBMC de indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Condições experimentais para a avaliação da proliferação e morte celular

Tabela 2 - Condições experimentais para a avaliação da expressão gênica e polarização da resposta de células T auxiliares

Quadro 1 - Número de sítios de DNA potencialmente reconhecidos por proteínas ligantes ao DNA segundo o gene-alvo considerado

## LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

AGE – *advanced glycation end-products* / produtos finais de glicação avançada

RAGE – *receptor for advanced glycation end-products* / receptor dos produtos finais de glicação avançada

TLR – *toll-like receptors* / receptores semelhantes à Toll

PBMC – *peripheral blood mononuclear cells* / células mononucleares de sangue periférico

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

PI – iodeto de propídio

RT-qPCR – PCR em tempo real

Th – linfócitos T *helpers* (auxiliares)

CCL3 – *Chemokine (C-C motif) ligand 3*

CCR5 – *Chemokine receptor 5*

DM – Diabetes Mellitus

TNF – *tumor necrosis factor* / fator de necrose tumoral

IL- interleucina

VEGF - *vascular endothelial growth factor* / fator de crescimento endotelial vascular

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IFN- $\beta$  – interferon beta

IP-10 – *interferon gamma-induced protein 10*

HMGB1 - *High-mobility group protein B1*

PMA - phorbol myristate acetate

MAMPs - *microbe-associated molecular patterns*

DAMPs - *damage associated molecular pattern*

°C – Grau Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

Frasnelli SCT. Papel de RAGE e TLR4 na modulação da resposta imune inflamatória em PBMC de pacientes diabéticos e não diabéticos (Estudo in vitro) [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## **RESUMO**

Diabetes mellitus se caracteriza pelo acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs) que ativam seu receptor RAGE. Entre as complicações associadas ao diabetes está a modulação da resposta imune, evidenciada pela maior susceptibilidade à infecção em diabéticos. O sistema imune percebe e reage aos microrganismos por meio de receptores de padrões moleculares (receptores semelhantes à Toll, TLRs). Lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) é um dos principais fatores de virulência de microrganismos Gram-negativos e é reconhecido principalmente por TLR4. A hipótese deste trabalho é que a ativação de RAGE e TLR4 por seus ligantes pode resultar em efeito sinérgico na modulação da proliferação, morte celular e expressão de citocinas inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Foram selecionados 7 indivíduos não diabéticos e 6 indivíduos portadores de diabetes tipo 2 para coleta de PBMCs. Estas células foram estimuladas com LPS bacteriano e BSA glicado, isoladamente e combinados, na presença e na ausência de inibidores dos receptores RAGE e TLR4. Proliferação e morte celular foram avaliadas por contagem direta em hemocítômetro e citometria de fluxo, respectivamente. A expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias foi avaliada por RT-qPCR, enquanto a modulação do padrão de resposta imune adaptativa foi estudada por meio de citometria de fluxo. Os resultados mostram

que PBMCs de pacientes portadores de diabetes tendem a ser mais resistentes à indução de morte celular. De um modo geral, a inibição dos receptores RAGE e TLR4 não interfere na atividade metabólica e viabilidade celular em diabéticos e não diabéticos. A expressão gênica de CCL3 e CCR5 não foi regulada pelos receptores RAGE e TLR, sendo discretamente mais elevada em pacientes não diabéticos. A expressão de TNF- $\alpha$  e IL-10 foi regulada por TLR, enquanto a expressão de RAGE foi regulada de forma autócrina pela ativação do próprio RAGE. Observamos uma tendência para maior quantidade de linfócitos T auxiliares em pacientes portadores de diabetes, com desvio para um padrão de resposta Th1. Em geral, PBMCs de diabéticos parecem ser mais resistentes á morte celular e mais responsivas aos estímulos avaliados. Concluimos que não houve sinergismo entre RAGE e TLR na modulação da resposta de PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

**Palavras-Chaves:** Diabetes Mellitus; Produtos Finais de Glicosilação; Receptores Toll-Like; Linfócitos T Auxiliares - Indutores.

Frasnelli SCT. Role of RAGE and TLR4 in modulation of inflammatory immune response in PBMC of diabetic and non-diabetic individuals. (In vitro study)

[Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus is characterized by the progressive accumulation of advanced glycation end-products (AGEs), which bind and activate their membrane-bound receptor (RAGE) on a variety of target cells. Modulation of the immune response is one of the diabetes-associated complications and is reflected on the increased susceptibility of diabetes patients to infections and sepsis. The immune system senses and reacts to microorganisms by pattern-recognition receptors, such as Toll-like receptors (TLRs). Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is a major virulence factor of Gram-negative microorganisms, which is recognized mainly by TLR4. The hypothesis of this study is that of a synergism between activated TLR4 and RAGE that modulates the response of cells of innate and adaptive immunity in the circulation (peripheral blood monocyte cells, PBMCs). PBMCs were collected from 13 volunteers (7 with type 2 diabetes and 6 systemically-healthy controls). The cells were stimulated with bacterial LPS and glycated bovine serum albumin (AGE-BSA), both independently and in association. To study the role of TLR4 and RAGE signaling, these stimulations were performed in the presence and absence of specific inhibitors of RAGE and TLR4. We used direct counting in a hemocytometer and flow cytometry, respectively, to assess cell proliferation and

death. The expression of selected cytokines and receptors was studied by RT-qPCR, whereas the effect of these stimuli on the modulation of T helper-type response was determined by flow cytometry. We observed increased cell survival in PBMCs from diabetic patients. Inhibition of RAGE and TLR4 had no marked effect on cell proliferation, metabolic activity and survival. Gene expression of CCL3 (MIP-1alpha) and CCR5 was discretely higher in PBMCs from non-diabetic patients and was not affected by RAGE or TLR4 signaling. Expression of TNF- $\alpha$  and IL-10 was regulated by TLR, whereas RAGE gene expression was regulated in autocrine fashion by activation of the RAGE receptor. A greater proportion of CD4+ lymphocytes was observed in diabetic patients, which also showed a trend toward a shift to Th1-response. Overall, PBMC from diabetes patients were more resistant to apoptosis and less responsive to the TLR4 and RAGE ligands used. We conclude that there is no synergism between TLR4 and RAGE on the modulation of PBMC cell proliferation, apoptosis and gene expression.

Keywords: Diabetes Mellitus; Advanced Glycation End Products; Toll - Like Receptors; T-lymphocytes Auxiliary – Inductors.

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente o diabetes e suas complicações são a principal causa do aumento da morbidade e mortalidade nos Estados Unidos com substancial impacto nos gastos na área de saúde pública <sup>18</sup>. Em 2007, por exemplo, estes custos econômicos associados às hospitalizações, consultas aos serviços de emergências, consultas médicas, medicações e redução da capacidade produtiva destes pacientes eram na ordem de US\$ 174 bilhões <sup>2</sup>. A incidência e prevalência do diabetes aumentam significativamente a cada ano, e por conseqüência aumentam os custos sociais e econômicos. Em 2010, as estimativas sugeriam 23,6 milhões de pessoas nos EUA com diabetes, 7,8% do total da população. Destes, 17,9 milhões eram diagnosticados e 5,7 milhões não diagnosticados <sup>2</sup>. No Brasil, o tratamento do diabetes também aumenta os custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e para sociedade. Estes custos elevados estão associados ao tempo da doença, nível de cuidados, presença de complicações crônicas, os quais sugerem a necessidade de implementação de programas e recursos de saúde voltados para a prevenção primária do diabetes e suas complicações <sup>4</sup>.

Essa desordem metabólica pode afetar os sistemas funcionais de diversos órgãos do corpo resultando em sérias complicações as quais podem ser classificadas em micro e macrovasculares <sup>18</sup>. Complicações microvasculares envolvem neuropatia, retinopatia e nefropatia. As macrovasculares estão associadas às doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, e complicações vasculares periféricas, envolvidas nos processos de gangrena, levando muitas vezes à amputação de membros <sup>18</sup>.

Os componentes biológicos da defesa do hospedeiro que podem ser prejudicados pelo diabetes têm sido alvo de muitos estudos, principalmente em relação à resposta imune inata, em particular os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). Alterações na imunidade adaptativa são menos estudadas, mas as evidências existentes indicam um desvio no padrão de resposta hiperinflamatória, característico do perfil Th1/Th17<sup>73</sup>. A adesão de PMNs ao endotélio vascular é aumentada no diabetes<sup>17</sup>, no entanto, a transmigração desses leucócitos é prejudicada de forma proporcional ao aumento na concentração dos AGEs<sup>16</sup>. Alterações tanto na quimiotaxia quanto na capacidade bactericida das células PMNs têm sido mostradas em pacientes com diabetes tipo 1 e 2, sugerindo a maior susceptibilidade à infecção nesses pacientes<sup>17</sup>. Tais alterações geralmente estão associadas a fatores como a influência genética, fatores imunológicos, metabolismo e complicações degenerativas em função do diabetes<sup>17</sup>.

A resposta imune tem papel etiológico no diabetes tipo 1 que é uma condição com características 'auto-imunes', uma vez que pode resultar do ataque de linfócitos T às células beta produtoras de insulina do pâncreas<sup>55</sup>. No diabetes tipo 2, a resposta imune também pode ter papel etiológico, uma vez que a elevação dos níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios, como IL-6 e proteína C-reativa, estão associados a maior risco de desenvolvimento do diabetes, com evidências que o estado hiperinflamatório associado à obesidade pode causar a resistência à insulina<sup>86</sup>. Assim, é recíproca a influência que o diabetes pode ter na resposta imune do hospedeiro (menor resistência à infecção nesses pacientes<sup>73</sup>, com a inibição da função de

polimorfonucleares, agravamento de alterações nervosas e vasculares, aumento da severidade e extensão das doenças periodontais), e que a modulação da resposta imune/inflamatória pode ter sobre o diabetes (tanto em sua etiologia/estabelecimento, quanto na manutenção e descontrolo metabólico).

Para melhor organização do texto e dos conceitos e evidências que justificam e embasam este trabalho, passamos a considerar aspectos específicos nos subtópicos a seguir:

### ***Principais mecanismos biológicos das complicações associadas ao diabetes: a influência do eixo AGE/RAGE***

O diabetes não controlado se caracteriza pela elevação da glicemia, que interage com diversas proteínas circulantes do plasma e resulta na formação dos produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end-products*, AGE). Estes AGEs podem exercer inúmeros efeitos biológicos e seu acúmulo foi demonstrado em rins<sup>72</sup>, placas ateroscleróticas<sup>27</sup>, coração<sup>13</sup> e outros sítios acometidos por complicações associadas ao diabetes. A relação causal entre o aumento de AGEs e as complicações do diabetes foi demonstrada em modelos animais em que a inibição dos AGEs reduziu significativamente o processo de aterosclerose em animais com diabetes induzido sem, no entanto, afetar o controle da glicemia<sup>27</sup>.

AGEs exercem seus efeitos pela ligação com seu receptor de membrana, RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*). Este receptor é capaz de interagir com diversos ligantes distintos, agindo como um receptor de reconhecimento de padrões moleculares, semelhante aos

receptores envolvidos na resposta imune inata <sup>71</sup>. Seu papel na modulação da resposta imune/inflamação é demonstrado pelo seu envolvimento em diversas condições inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e doenças inflamatórias dos rins e intestinos <sup>8</sup>, além de servir como receptor de adesão de leucócitos às células endoteliais, promovendo o recrutamento e extravasamento destas células aos tecidos. No periodonto, a expressão de RAGE foi demonstrada no endotélio e nas camadas basais e espinhosas do epitélio do sulco, associada à inflamação. Além disso, a expressão gênica de RAGE foi significativamente maior no epitélio de pacientes com diabetes <sup>43</sup>.

A interação AGE-RAGE resulta na ativação de diversas vias de sinalização intracelular, sendo as mais relevantes para a expressão de mediadores inflamatórios a via do fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF-kB) e as quinases protéicas ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), incluindo a kinase N-terminal c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK), kinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular-regulated kinase*, ERK) e p38 <sup>40</sup>. Formas truncadas de RAGE, como RAGE solúvel (sRAGE) e RAGE endógeno (es-RAGE), podem atuar como “falsos receptores” e neutralizar as ações de AGEs <sup>42</sup>. As diferentes isoformas de RAGE se caracterizam por alterações nos domínios extracelulares da proteína. Apesar de carregarem todos os domínios extracelulares, essas formas heterogêneas de RAGE são desprovidas de domínios transmembrana e intracitoplasmático e podem antagonizar a sinalização de RAGE *in vitro* e *in vivo* <sup>48</sup>.

A relevância dos efeitos biológicos mediados por este receptor foi demonstrada em modelo murino de doença periodontal associada ao diabetes,

em que o bloqueio de RAGE inibiu a expressão de citocinas inflamatórias e a reabsorção óssea alveolar associada à doença <sup>49</sup>. A inibição do receptor RAGE pode estar associada a diminuição de células imunes e inflamatórias como os linfócitos T CD4<sup>+</sup> levando à supressão de algumas doenças como encefalite e diabetes autoimune (tipo 1) e também uma menor incidência nas rejeições de enxertos <sup>48</sup>.

O papel central do eixo AGE/RAGE é de estimulação da resposta imune, como demonstrado por estudos in vitro, em que o tratamento com AGEs aumentou a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e VEGF por monócitos <sup>56, 67, 74</sup>, de metaloproteases de matriz (MMP)-1, -3, -13, TNF- $\alpha$ , iNOS e Cox-2/PGE2 por condrócitos <sup>68, 69</sup>, de IL-6 e proteína quimioatraente de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) por fibroblastos <sup>60</sup>, além de inibir a proliferação, produção de colágeno tipo I, atividade de fosfatase alcalina e induzir apoptose em osteoblastos <sup>30</sup>. Já em fibroblastos gengivais, o estímulo com AGE inibiu a produção de colágeno tipos I e III <sup>78</sup>. Avaliações mais amplas dos efeitos de AGEs em macrófagos murinos utilizando arrays focados para detecção de citocinas inflamatórias relatam que o estímulo com AGE-BSA (albumina sérica bovina glicada) resultou em indução significativa de IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1, e que a cinética de indução destas citocinas foi semelhante à observada após estímulo com LPS (realizado separadamente, como controle positivo) <sup>6</sup>. Os autores não observaram regulação de IL-10, IL-12 ou interferon- $\gamma$  após estímulo com AGE-BSA ou LPS. Microarrays focados foram utilizados na avaliação dos efeitos de AGE-BSA e AGE-lisozima em fibroblastos dérmicos humanos, demonstrando a modulação significativa de 16 de 127 genes

avaliados, incluindo inibição da expressão de colágeno tipos I e III, de outros genes relacionados à adesão celular (fibronectina, decorin, integrinas) e aumento da expressão de MMP-9. Porém, apesar de certo consenso na literatura em relação aos efeitos pró-inflamatórios da ativação do eixo AGE/RAGE, há uma variabilidade nas vias de sinalização intracelular ativadas e mesmo nos efeitos biológicos desta ativação (por exemplo, proliferação celular, apoptose e expressão gênica) segundo o tipo celular e tipo/forma de preparo do AGE utilizado <sup>102, 104</sup>. Mesmo in vivo, devido à heterogeneidade estrutural e bioquímica dos AGEs, é provável que nem todos os AGEs interajam com RAGE. Consistente com este papel da ativação da resposta imune inata pela interação AGE-RAGE, animais com deleção do gene que codifica a expressão de RAGE foram mais resistentes à colite experimentalmente induzida <sup>1</sup>, à morte por choque séptico <sup>57</sup> e às infecções microbianas sistêmicas <sup>64</sup>. Além disso, como já dito anteriormente, o eixo AGE-RAGE pode modular células T CD4<sup>+</sup> e aumentar significativamente a expressão de RNAm RAGE em células T induzidas para um fenótipo Th1 em comparação às células T induzidas para o fenótipo Th2 <sup>15</sup>, suportando um papel de RAGE em eventos precoces na resposta imune, associados à polarização da inflamação para o padrão Th1.

***Padrão de resposta predominante (Th1, Th2 e Th17) e modulação da expressão de citocinas inflamatórias associadas ao diabetes***

Estudos em animais indicam que tanto o estabelecimento quanto a manutenção do quadro diabético é relacionado a um desequilíbrio dos subtipos de linfócitos T, provocando um desvio do padrão de resposta para um perfil

hiperinflamatório, o qual pode resultar da modulação dos padrões de resposta da imunidade adaptativa.

Pacientes com diabetes tipo 2 em tratamento (Hb1Ac médio 7.2%) apresentam elevação na proporção de linfócitos T (CD3+) e linfócitos T auxiliares (CD4+), mas não de linfócitos T citotóxicos (CD8+) em comparação à pacientes não diabéticos <sup>22</sup>. O padrão de citocinas presentes no sangue periférico de pacientes com síndrome metabólica pré-diabetes (envolvendo obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão) demonstrou que tanto citocinas associadas ao perfil Th1 quanto Th2 estavam elevadas em comparação a pacientes sistemicamente saudáveis, incluindo: IL-12, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-13 <sup>92</sup>. Estes dados demonstram que a resposta imune já apresenta alteração mesmo antes do estabelecimento do diabetes.

As células T auxiliares-17 são uma subclasse de células T auxiliares, relativamente nova, originadas sob condições de polarização diferentes das células Th1 e Th2 <sup>90</sup>. Em pacientes portadores de diabetes tipo 2 são encontrados maiores níveis plasmáticos de IL-6, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , citocinas capazes de induzir esta polarização da resposta de linfócitos T para o padrão hiperinflamatório Th17 <sup>39</sup>.

A modulação da resposta adaptativa em direção a um perfil hiperinflamatório também pode envolver a redução das células T regulatórias (Tregs, o 'freio' natural da inflamação na resposta adaptativa). Esta possibilidade é suportada pelo achado de menor número de Tregs no tecido adiposo de animais com resistência à insulina associado à obesidade, em comparação a animais com peso normal <sup>25</sup>. Além da redução da presença de

Tregs, o tecido adiposo de animais obesos com resistência à insulina apresentava maior proporção de células Th1, e a transferência de células Th2 foi capaz de eliminar a resistência à insulina<sup>101</sup> demonstrando a relevância da imunidade adaptativa, em especial do perfil de resposta e polarização de linfócitos T para o diabetes.

No diabetes tipo 1, caracterizado por uma doença autoimune, trabalhos mostram níveis de citocinas Th1 mais elevados, principalmente os níveis de IFN- $\gamma$ <sup>28</sup>. Células mononucleares de sangue periférico coletadas de 11 pacientes diabéticos tipo 1 e 9 pacientes saudáveis e estimuladas com proteínas *heat shock* (Hsp60 AA437–460) e GAD65 como peptídeo Hsp60 (Hsp60 AA394–408), foram avaliadas em um estudo com objetivo de determinar os níveis de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-13), bem como determinar se há uma mudança no sentido Th1 ou Th2 da resposta imune. Essas proteínas podem estar envolvidas na modulação do desenvolvimento do diabetes. Os resultados comparando os pacientes diabéticos e saudáveis, mostraram um desvio significativo para resposta Th1 em DM tipo 1 após estímulo Hsp60 AA437–460, assim como uma diminuição de IL-13<sup>93</sup>.

O DM tipo 1 autoimune tradicionalmente era reconhecido como uma doença mediada por citocinas associadas ao perfil de resposta Th1, como IFN- $\gamma$ ; porém, a resposta Th17 parece ter um papel central no processo inflamatório e nas desordens autoimunes<sup>28</sup>. A possível relação dos linfócitos Th17 com o desenvolvimento de diabetes tipo 1 autoimune foi demonstrada em modelos animais de diabetes induzido nos quais foi verificado um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-18, IFN- $\gamma$  e IL-17. De forma interessante, a concentração de IL-17

estava positivamente associada com a severidade das lesões das células  $\beta$  pancreáticas<sup>28</sup>.

Outras doenças inflamatórias crônicas têm sido associadas à modulação de citocinas Th17, como artrite reumatóide, asma, lúpus eritematoso<sup>7</sup>. Uma doença inflamatória crônica fortemente associada ao diabetes é a periodontite crônica, assim como outros tipos de doença periodontal (DP) e perda dentária. Na literatura os trabalhos são muito controversos em relação ao perfil de resposta adaptativa predominante na periodontite. Alguns estudos, verificaram que o padrão de citocinas detectadas em tecidos periodontais acometidos por periodontite crônica apresentavam um discreto desvio para o padrão Th1, apresentando níveis mais elevados das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2<sup>29, 46, 95</sup>. Há relatos também de elevados níveis de citocinas relacionadas ao perfil Th1 no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica, quando comparado ao fluido gengival de pacientes sem doença periodontal<sup>53, 81</sup>. Outros trabalhos demonstram um predomínio de citocinas associadas ao perfil de resposta Th2 em tecidos periodontais doentes<sup>24, 26, 50</sup>, e um trabalho que não verificou predominância do perfil Th1 ou Th2<sup>44</sup>.

Estudos transversais<sup>33, 59, 65</sup> mostram uma alta prevalência da doença periodontal tanto no diabetes tipo 1 como no tipo 2. Além disso, essa associação tem sido encontrada, e principalmente relacionada ao fator de controle glicêmico<sup>34, 38, 89</sup>. Diabéticos não compensados apresentam maior extensão e severidade de DP<sup>73</sup>. Efeitos deletérios ocasionados pela atuação eixo AGE-RAGE podem estar associados à patogênese e progressão da

periodontite <sup>12</sup>, em particular pela modulação da interação microbiota-hospedeiro.

### ***Atuação de RAGE e TLR4 na modulação da ativação, diferenciação e apoptose de linfócitos T e monócitos***

RAGE atualmente é considerado como um receptor multiligante para moléculas cujas concentrações estão aumentadas em pacientes diabéticos <sup>31</sup>. Esse receptor tem papel crucial na resposta imune inata e na propagação da inflamação <sup>31</sup>. Sugere-se que RAGE também exerça influência na resposta imune adaptativa, entretanto, o papel desse receptor em células T ainda não é bem conhecido. RAGE atua na diferenciação de células Th1 e a expressão de RNAm de RAGE é maior em células Th1 em comparação às Th2. Esta influência de RAGE na resposta adaptativa é demonstrada in vivo em modelo de diabetes induzido em que tanto animais geneticamente deficientes em RAGE, quanto os animais tratados com antagonista de RAGE e submetidos a transplante de ilhotas de Langerhans, apresentaram redução na taxa de diabetes recorrente e um maior tempo na funcionalidade destes transplantes, sugerindo que a inibição de RAGE pode ter aplicação terapêutica no diabetes por modulação da resposta imune adaptativa <sup>15</sup>.

O sistema imunológico se desenvolveu para responder não apenas aos agentes patogênicos, mas também aos sinais liberados a partir do dano e morte celular. As proteínas HMGB1 são capazes de se ligarem ao DNA nuclear, e são liberadas quando algumas citocinas são estimuladas “passivamente” durante a morte celular. Elas são o protótipo do padrão molecular associado a danos (DAMP) capaz de ativar a imunidade inata e têm

sido implicadas em várias doenças inflamatórias. As HMGB1 podem estar associadas a outras moléculas incluindo os receptores *Toll-like* e citocinas, e podem participar da ativação de outras células através do engajamento diferencial com múltiplos receptores de membrana como TLR2, TLR4 e RAGE<sup>87</sup>. A ativação de RAGE por crescente disponibilidade de ligantes, como HMGB1, durante a hiperglicemia denota a hipótese de amplificação da resposta auto-imune como no diabetes tipo 1.

Receptores *Toll-like* (TLRs) são receptores transmembrana que participam do reconhecimento de patógenos iniciando a resposta imune inata<sup>88</sup>. TLR2 e TLR4 podem reconhecer componentes da parede celular bacteriana, tais como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e lipopeptídeos. A ativação desses receptores nas células imunes inatas promove um aumento na produção de citocinas, quimiocinas e na regulação de outras moléculas de superfície<sup>88</sup>.

Em pacientes portadores de diabetes tipo 1, observa-se o aumento na expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos do sangue periférico, bem como maior expressão das proteínas adaptadoras relacionadas aos TLRs (MyD88 e Trif) e maior ativação de NF- $\kappa$ B. Estas alterações se correlacionam com significativo aumento na produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  por monócitos, encontrado em pacientes diabéticos<sup>19</sup>.

A influência destes receptores da resposta imune inata no diabetes foi confirmada em modelo animal de diabetes induzido, e constatou-se significativa atenuação da resposta imune associada ao diabetes em animais geneticamente deficientes para TLR4. O estado de ativação de NF- $\kappa$ B e

também os níveis de diversas citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, KC/IL-8, IP-10, MCP-1 e IFN- $\beta$  foram reduzidos nos animais TLR4 $^{-/-}$ . A relevância da sinalização via TLR para a resposta imune neste modelo experimental de diabetes é indicada também pelo fato de que nos animais-controle 'selvagens' (wild-type), observou-se aumento da expressão de TLR4 com a indução de diabetes <sup>20</sup>.

De forma similar, existe evidência do envolvimento sinérgico da sinalização via TLR no estabelecimento e progressão da aterosclerose em modelo de animais hipercolesterolêmicos com deficiência de apolipoproteína E ( $^{-/-}$ ), uma vez que a deficiência na expressão de TLR4 ocasionou uma redução no tamanho da lesão, conteúdo lipídico e infiltração de macrófagos em ratos <sup>66</sup>. Estes dados são particularmente importantes quando se considera que a aterosclerose (e outras alterações vasculares) é uma das principais complicações associadas ao diabetes e que os pacientes portadores de diabetes usualmente apresentam dislipidemia.

Apesar destas evidências do papel da sinalização via TLR no diabetes, há escassez de informações sobre a existência de integração de sinais dos receptores TLRs e RAGE. A interação da sinalização via TLR e RAGE é indicada pelo fato de PBMC de pacientes com diabetes tipo 2 produzirem mais IL-6 e TNF- $\alpha$  em resposta à estímulo com LPS do que PBMC de pacientes não diabéticos. Esta potencialização da produção de mediadores inflamatórios foi atenuada pela inibição de TLR4 e RAGE previamente ao estímulo com LPS, sugerindo que os sinais gerados por ambos receptores convergem para as

mesmas vias de sinalização, relevantes para a regulação da expressão destes genes inflamatórios <sup>100</sup>.

Esta interação sinérgica de RAGE com TLRs também é verificada em estudos do processo aterosclerótico associado à dislipidemia (duas condições também associadas ao diabetes). A sinalização via RAGE pode ser ativada por AGE-LDL, mas não se sabe se este é o único receptor ativado. O estímulo com AGE-LDL em macrófagos e em células endoteliais pode também ativar TLR4 e levar à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6. Da mesma forma, o AGE-BSA tem a capacidade de ativação de RAGE e TLR4, resultando em um aumento da produção de IL-6 nessas mesmas células, indicando sinergismo e interação dos sinais gerados por estes receptores <sup>36</sup>.

### ***Expressão de receptores e quimiocinas CCR5 e CCL3 na modulação da resposta imunológica inata e adaptativa***

*Chemokine receptor 5* (CCR5) foi inicialmente reconhecido como um co-receptor utilizado pelo vírus HIV para entrada nas células imunes, porém suas funções na resposta do hospedeiro vem sendo expandidas e atualmente é considerado de grande relevância em diversos processos inflamatórios, como a aterosclerose <sup>41</sup>. Recentemente, sua relevância na progressão da doença periodontal foi demonstrada em modelo in vivo em que a utilização de inibidor bioquímico (met-RANTES) resultou em significativa redução do infiltrado inflamatório e da reabsorção do osso alveolar <sup>80</sup>.

*Chemokine (C-C motif) ligand 3* (CCL3) também conhecida como proteína inflamatória de macrófago 1-alfa (MIP-1 $\alpha$ ) interage com os receptores de quimiocinas CCR1 e CCR5, sendo produzida primariamente por monócitos

e linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados <sup>85</sup>. CCL3 tem função quimiotática para monócitos e linfócitos, com elevada expressão em sítios inflamados <sup>54</sup>, inclusive no fluido gengival de pacientes com doença periodontal em comparação ao fluido de pacientes periodontalmente saudáveis <sup>97</sup>. A presença de CCL3 na saliva de pacientes acompanhados longitudinalmente por 9 meses se correlacionou com a presença de *A. actinomycetemcomitans* no biofilme subgengival e com o desenvolvimento clínico de periodontite agressiva, sugerindo que os níveis desta quimiocina podem ser utilizados como um possível marcador diagnóstico/indicador de risco. Em modelos animais, a indução de doença periodontal experimental por infecção com *A. actinomycetemcomitans* é acompanhada por significativo aumento da expressão de CCL3 nos tecidos periodontais e, subsequentemente, aumento da migração de células CCR1<sup>+</sup> e CCR5<sup>+</sup>. No entanto neste mesmo estudo, o fato de animais geneticamente deficientes em CCL3 apresentarem severidade de doença periodontal semelhante à observada em animais 'normais' indica que esta quimiocina não é essencial para a inflamação e progressão da doença periodontal, possivelmente porque sua ausência pode ser compensada pela expressão das quimiocinas CCL4 e CCL5 que também são ligantes de CCR1 e CCR5 <sup>79</sup>. Além disso, foi demonstrado que CCL3 também media a migração de neutrófilos para o sítio de inflamação por meio da indução da expressão de TNF- $\alpha$  e leucotrieno B4 (LTB4) <sup>77</sup>, indicando que esta quimiocina tem papel tanto na modulação da resposta imune inata quanto adaptativa. Assim, considerando sua influência na doença periodontal e no processo aterosclerótico, ambas situações relacionadas ao diabetes, bem como a carência de informações relativas à

regulação de CCL3 e seu receptor CCR5 no diabetes, propomos avaliar a regulação da expressão gênica destes receptores em PBMC de diabéticos e pacientes saudáveis na presença e ausência de estímulos de RAGE e TLR4.

## 2 PROPOSIÇÃO

Considerando as evidências do papel do eixo AGE-RAGE na modulação da resposta imune inata e adaptativa, nossa hipótese principal é de um sinergismo na ativação do eixo AGE-RAGE e TLR em células mononucleares do sangue periférico (representativas da resposta imune inata e adaptativa), potencializando a expressão de citocinas inflamatórias e exacerbando o processo inflamatório característico em pacientes portadores de diabetes tipo 2. Nosso objetivo é descrever a modulação do perfil de expressão de citocinas inflamatórias e a polarização da resposta de linfócitos T em resposta à ativação independente e simultânea de RAGE e TLR4. Para atingir este objetivo, propomos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Determinar os efeitos do eixo AGE/RAGE, associado ou não à ativação de TLR, na proliferação e morte celular de PBMC de pacientes diabéticos e não diabéticos.
- 2) Descrever os efeitos do eixo AGE/RAGE na expressão das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-10, da quimiocina CCL3 e dos receptores CCR5 e RAGE por PBMC de pacientes diabéticos e não-diabéticos estimulados por LPS bacteriano, associado ou não à ativação de RAGE.
- 3) Avaliar os efeitos do eixo AGE/RAGE na diferenciação de linfócitos T CD4+ e na modulação do perfil de resposta T auxiliar (Th1, Th2 ou Th17) associado ou não à ativação de TLR, em pacientes diabéticos e não-diabéticos.

## **3 MATERIAL E MÉTODO**

### **3.1 Preparo da albumina sérica glicada (BSA-AGE)**

A albumina sérica bovina – fração V (BSA) foi diluída em PBS (pH 7.4) numa concentração de 50 mg/mL e subsequentemente 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 remanescente após esta incubação foi removida por extensa diálise (12 h) em PBS livre de Cálcio e Magnésio, pH 7.4. O controle desta reação foi preparado em paralelo da mesma forma, exceto pela adição de 0.5 M de glicose no período de 8 semanas de incubação. O BSA-controle e BSA-AGE foram aliquotados e armazenados em geladeira (+ 4°C) após confirmação da glicação por avaliação da absorbância em 405 nm em espectrofotômetro e verificação de absorbâncias acima de 3.0 nas amostras de BSA-AGE e inferior a 0.1 nas amostras de BSA-controle. Este protocolo foi realizado de acordo com o trabalho de Valencia et al.<sup>98</sup> (2004).

### **3.2 Obtenção de amostras de PBMC do sangue periférico dos pacientes voluntários**

Foram selecionados 6 pacientes de ambos os sexos (4 mulheres e 2 homens) que concordaram em participar como doadores voluntários do sangue periférico, todos diabéticos tipo 2 diagnosticados há mais de 5 anos com pobre controle metabólico (HbA1c > 8.5%) e idade variando entre 38 e 51 anos. Todos estes pacientes são portadores de doença periodontal, participantes em um projeto de pesquisa clínica em andamento no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, FOAr-UNESP e com aspectos éticos desta coleta de sangue

periférico de acordo com protocolo n°35/09 previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da FOAr-UNESP (Anexo 1A) para esta pesquisa clínica. Esses pacientes foram selecionados de acordo com a ficha de anamnese pertinente ao projeto de pesquisa mencionado acima. Os dados clínicos avaliados para a seleção foram: ausência de dislipidemia, nível de HbA1c, medicações utilizadas, BMI, parâmetros clínicos periodontais. Também foi coletado sangue periférico de 7 pacientes 'controle' (2 homens e 5 mulheres), não diabéticos e sem dislipidemia com idade variando entre 30 e 49 anos com mínima experiência e atividade de doença periodontal. Estes pacientes-controle voluntários incluíram os pesquisadores envolvidos no projeto e outros doadores selecionados com base nos critérios de saúde sistêmica e periodontal e faixa etária.

Foi coletado em média 24 mL de sangue periférico de cada doador, em tubos vacutainers contendo EDTA, e esse sangue foi diluído em HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution 1X - Gibco) na proporção 1:1. Esse sangue diluído foi colocado vagarosamente sobre a fase de Ficoll na proporção 1:2 de sangue em um tubo tipo falcon. Foi realizada a centrifugação (condições de centrifugação: 1600 rpm, 40 min, +18°C, aceleração ajustada para '2', sem desaceleração) em gradiente de densidade (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare), e as células PBMC separadas (população mista de PBMC, sem separação de linfócitos T e monócitos) foram contadas e plaqueadas em meio RPMI (RPMI Medium 1640, Gibco/Cat. n°23400-021) suplementado com antibióticos e soro fetal bovino (FBS) a 1% (experimentos de produção de citocinas, citometria de fluxo e sinalização intracelular) ou 10% (experimentos de proliferação e morte celular).

As amostras obtidas (células para citometria e RNA total) foram aliquotadas e armazenadas em freezer (-80°C). A distribuição dos tratamentos para as amostras de PBMC coletadas de pacientes diabéticos e sistemicamente saudáveis foi realizada segundo o tipo de experimento planejado e está representada nas Tabelas 1 e 2.

Esse protocolo foi realizado de acordo com o Bøyum et al. <sup>11</sup>(1968).

Todos os tratamentos indicados em “**estímulos**” foram realizados na presença e na ausência dos “**inibidores**”. Esses inibidores foram adicionados 30 minutos antes de serem realizados os tratamentos (estímulos).

Tabela 1 - Condições experimentais para a avaliação da proliferação e morte celular

Experimento	Estímulos (concentração)	Inibidores (concentração)	Quantidade de células	Períodos (horas)
<b>MTS</b>	CONTROLE	anticorpo neutralizante para RAGE (4 µg/mL)	1 x 10 <sup>5</sup> céls/mL	24,48,72
	DOXORRUBICINA (10µM)		Placas de 96 poços (0.1mL/poço)	
<b>Azul de trypan</b>	LPS – <i>E. coli</i> (1 µg/mL)	LPS de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (20 µg/mL)	1 x 10 <sup>5</sup> céls/mL	24,48,72
	BSA-AGE (200 µg/mL)		Placas de 48 poços (0.5mL/poço)	
	LPS – <i>E. coli</i> (1 µg/mL) + BSA-AGE (200 µg/mL)			

Tabela 2 - Condições experimentais para a avaliação da expressão gênica e polarização da resposta de células T auxiliares

Experimento	Estímulos (concentração)	Inibidores (concentração)	Quantidade de células	Período
CITOMETRIA E RT-qPCR	CONTROLE	anticorpo neutralizante para RAGE (4 µg/mL)	1 x 10 <sup>6</sup> céls/mL	6 horas
	PMA (50ng/mL)			
	LPS – <i>E. coli</i> (1 µg/mL)	LPS de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (20 µg/mL)	Placas de 48 poços (0.5mL/poço)	
	BSA-AGE (200 µg/mL)			
	LPS – <i>E. coli</i> (1 µg/mL) + BSA-AGE (200 µg/mL)			

Os reagentes utilizados foram:

- Anticorpo de RAGE: abcam<sup>®</sup> n° de catálogo ab89911/ Lot 940019
- LPS de *R. sphaeroides* (RS-LPS) InvivoGen Lot #RLS-3201
- LPS de *E.coli* Sigma-Aldrich Lot 2880-10MG
- PMA Sigma-Aldrich Lot # P1585
- Doxorrubicina Sigma-Aldrich Lot #060M1181V

### 3.3 Avaliação de apoptose e viabilidade celular das células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos

#### Anexina V

O inibidor de transporte protéico Brefeldin A foi acrescentado às culturas (10 µg/mL) nas últimas 3 horas do período experimental de 6 h para os estímulos descritos na Tabela 2 (citometria). As células foram coletadas por centrifugação (250 g, 5 min, temp. ambiente) e congeladas em solução de 90% FBS/10% DMSO no freezer -80°C até o momento de realização do ensaio, quando foram

descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e resuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% FBS para marcação com anexina conjugada à biotina e incubação com o corante de DNA (iodeto de propídeo), segundo as instruções do fornecedor dos reagentes utilizados. A citotoxicidade foi determinada por ensaio de duas cores em citometria de fluxo, por meio de incubações seqüenciais em Anexina-V conjugada à biotina seguida de incubação em streptavidina conjugada à FITC em solução contendo 50 µg/mL de iodeto de propídeo (PI). Assim, foi possível determinar a presença de células em estágio inicial de apoptose (Anexina V-positivas e PI-negativas) de células em estágios tardios de apoptose (Anexina-V-positivas e PI-positivas). A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Canto, BD Biosciences) no Laboratório de Imunologia Aplicada da FMRP-USP. Os dados foram analisados com o software FlowJo.

Esse protocolo foi realizado de acordo com a utilização do kit (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II, BD Biosciences), segundo as instruções do fabricante.

## **MTS**

A morte celular por apoptose pela via intrínseca foi avaliada por meio da determinação dos efeitos dos tratamentos na função mitocondrial utilizando kit comercialmente disponível (Cell Titer 96 Aqueous; Promega Corp.) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit avalia a viabilidade celular através da redução do componente tetrazolium em formazan por enzimas desidrogenases presentes em células metabolicamente ativas gerando um composto com pico

absorbância de luz visível em 490 nm. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células resuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS foram plaqueadas em cada poço de placas de cultura de 96 poços, estimuladas, da forma descrita pela Tabela 1 acima, pelos períodos de 24, 48, 72 horas. Ao final destes períodos, 20  $\mu$ L do reagente contendo o sal de tetrazolium (MTS) era adicionado a cada poço, incubado por 2 horas e os resultados eram obtidos através da medição da absorbância a 490 nm em um leitor de microplacas (ELX 600, Biotek). O número de células viáveis nos poços estimulados foi estimado em relação aos respectivos controles negativos em cada período experimental.

### **Azul de trypan**

No método azul de trypan, a viabilidade celular é avaliada através da penetração do corante em células mortas, caracterizadas pela descontinuidade da parede celular. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células resuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS foram plaqueadas em cada poço de placas de cultura de 48 poços, estimuladas, da forma descrita pela tabela 1 acima, no entanto, não foi realizado o tratamento com os inibidores (LPS de *R. sphaeroides* e anticorpo para RAGE). Os períodos de estímulo foram de 24, 48, 72 horas. O procedimento constituiu da diluição da amostra na proporção de 1:1 com o azul de trypan 0.4% (Invitrogen Corp.), e após 2 minutos de incubação foi realizada a contagem diferencial em hemocitômetro, determinando o número de células azuis (mortas) e células não coradas

(normais/viáveis). Em seguida foi calculada a porcentagem de células mortas sobre o número de células totais.

### **3.4 Avaliação da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na população mista de PBMC isolada do sangue periférico e modulação do perfil de resposta T auxiliar (Th1/Th2/Th17)**

Após isolamento de PBMC do sangue periférico, foi feita contagem para avaliação das células viáveis (experimento de exclusão de azul de Trypan) em hemocitômetro para confirmar que a viabilidade de células era igual ou superior à 95%. As células foram, então, plaqueadas em placas de 48 poços, 0.5 mL de volume com  $1 \times 10^6$  células por poço em meio RPMI suplementado com 1% de FBS. Após 4 horas de plaqueamento, as células foram estimuladas (estímulos descritos na Tabela 2). Três horas após o estímulo foi adicionado inibidor de transporte protéico (Brefeldin A, 10 ug/mL) e após mais 3 horas (total de 6 h de estímulo), as células foram coletadas e centrifugadas (250 g / 5 min, RT). Após a centrifugação as amostras foram resuspendidas em meio de congelamento (90% FBS + 10% DMSO) e submetidas à congelamento lento (-1°C/ min) até -80°C onde permaneceram armazenadas por cerca de 6 a 8 semanas. Para a realização da citometria de fluxo as células congeladas foram transportadas em gelo seco até Ribeirão Preto (laboratório do Prof. João Santana da Silva, FMRP-USP). Foi realizado o descongelamento dessas células e as mesmas foram resuspendidas em meio RPMI+10% FBS pré-aquecido. As células foram coletadas por centrifugação (250 g, 5 min, RT), fixadas em paraformaldeído 2% (Cytotfix, BD Biosciences) por 20 minutos e permeabilizadas em tampão

contendo saponina (Cytoperm, BD Biosciences) por 15 minutos a 4°C. Após lavagem em PBS, foi realizada a marcação com um coquetel de anticorpos conjugados à diferentes fluoróforos:  $\alpha$ CD4-PERCP-Cy5.5,  $\alpha$ IL17A-PE,  $\alpha$ IFN-gama-FITC e  $\alpha$ IL-4-APC, com as células já resuspendidas em tampão de marcação contendo saponina para manter a permeabilização. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Canto, BD Biosciences) no laboratório de Imunologia Aplicada da FMRP-USP, considerando um mínimo de 10.000 eventos/amostra. Os dados foram analisados com o software FlowJo.

Este protocolo foi realizado de acordo com o kit (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping kit, BD Biosciences), segundo as instruções do fabricante.

### **3.5 Modulação da expressão gênica (RNAm) nas células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos**

Após a separação das células PBMC, estas foram contadas, resuspendidas em meio RPMI contendo 1% de FBS e plaqueadas  $1 \times 10^6$  células por poço em placas de 48 poços. Após 4 horas de plaqueamento as células foram estimuladas (por 6 horas) de acordo com a Tabela 2 acima. Após o período de estímulo, estas células foram coletadas e a extração de RNA foi realizada pelo kit RNAqueous® Kit (Ambion Inc, Applied Biosystems) e quantificadas em espectrofotômetro de microvolumes (NanoVue, GE Healthcare), considerando uma relação A260/A280 entre 1.8 e 2.1 como indicativa da pureza do RNA obtido. O cDNA foi sintetizado com a utilização do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do

fabricante. O PCR tempo real foi realizado utilizando reagentes TaqMan Fast e pares de primers e sonda pré-desenhados e otimizados (TaqMan Fast Gene Expression Assays, Applied Biosystems) para detecção dos seguintes genes-alvo: RAGE, CCL3 e CCR5, IL-10 e TNF- $\alpha$ , além do gene constitutivo GAPDH utilizado para normalização dos resultados. Esta reação foi feita em termocicladora StepOne Plus (Applied Biosystems) e os resultados analisados pelo método  $\Delta(\Delta Ct)$  utilizando o software da própria termocicladora para quantificação relativa da expressão dos genes-alvo após normalização para o gene constitutivo.

### **3.6 Análise estatística**

Médias e desvios-padrão foram obtidos a partir dos dados dos experimentos utilizando células dos diferentes pacientes em cada grupo (diabéticos e não diabéticos). Estas médias foram comparadas, dentro do mesmo grupo (entre os diferentes estímulos e condições experimentais) ou entre grupos (numa mesma condição experimental/estímulo) utilizando o teste t não pareado de Student. Para efeito destas comparações, cada condição experimental (estímulo), bem como os resultados após um mesmo estímulo nos diferentes grupos (diabéticos e não-diabéticos) foram considerados eventos independentes. Estas comparações e gráficos foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5, sempre utilizando um nível de significância de 95% ( $p < 0.05$ ).

## **4 RESULTADO**

### **Avaliação de apoptose e viabilidade celular das células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos**

#### **Anexina-V**

Para avaliação da modulação da apoptose de PBMC de pacientes portadores de diabetes e não diabéticos, utilizamos um ensaio para detecção de Anexina-V e incorporação de iodeto de propídio (PI). Os resultados indicam que o tratamento com BSA-AGE associado ou não LPS *E. coli*, induz baixo percentual de apoptose (precoce e tardia) tanto nas células PBMC do grupo diabetes como no grupo controle. Esse baixo percentual de apoptose se mantém inalterado na presença dos inibidores de RAGE e TLR4 em ambos os grupos, suportando a noção de que a ativação dos receptores não tem papel relevante na apoptose destas células. Apenas nas células estimuladas com PMA foi observado maior percentual de apoptose tardia/ morte celular, principalmente no grupo controle. Neste estímulo, os resultados mostram que as células do grupo diabetes tendem a ser mais resistentes à apoptose (Figuras 1 e 2).

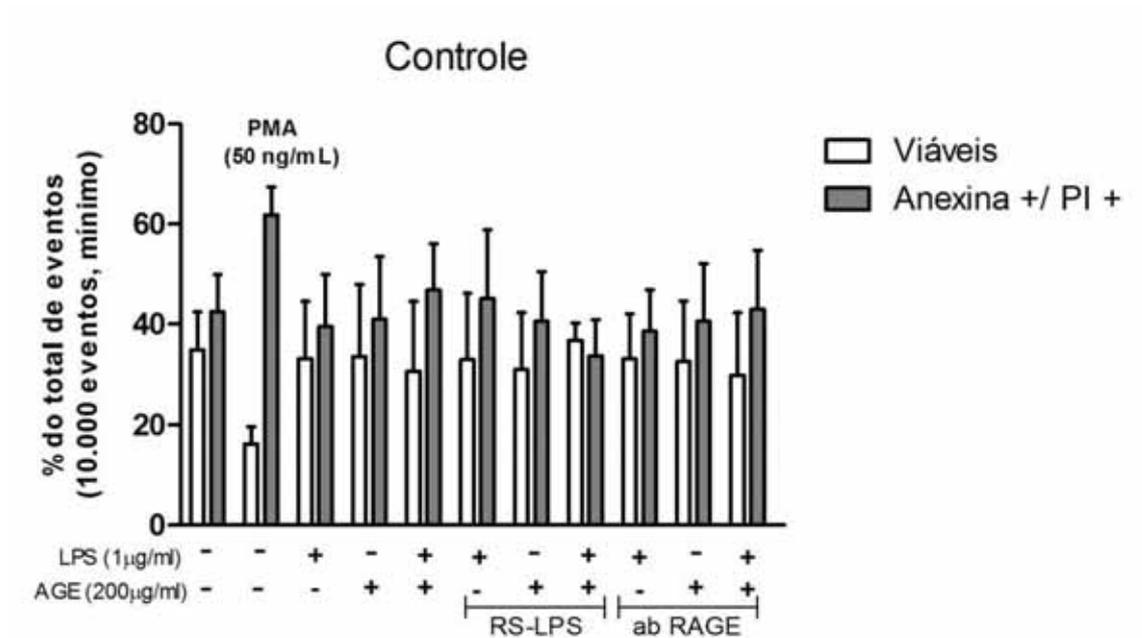


FIGURA 1 – Gráfico representativo do potencial apoptótico em PBMC de pacientes não diabéticos. Avaliação do percentual de células viáveis (representada pela barra branca) e percentual de células em processo de apoptose tardia/necrose celular (representada pela barra cinza) nas diferentes condições experimentais: controle, PMA (50ng/mL), LPS *E.coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL) isolados ou associados, na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL).

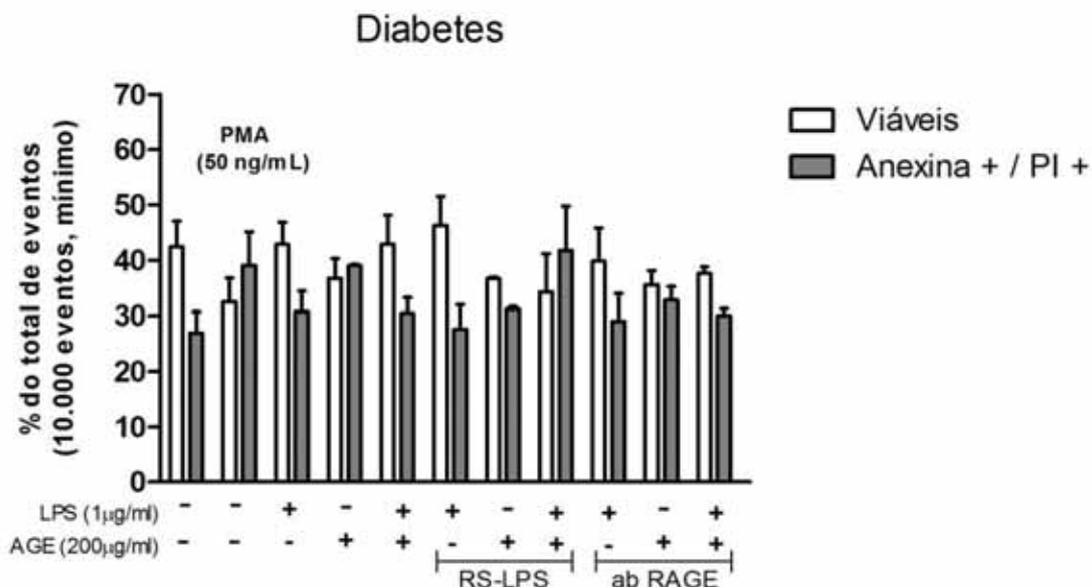


FIGURA 2 - Gráfico representativo do potencial apoptótico em PBMC de pacientes portadores de diabetes tipo 2. Avaliação do percentual de células viáveis (representada pela barra branca) e percentual de células em processo de apoptose tardia/necrose celular (representada pela barra cinza) nas diferentes condições experimentais: controle, PMA (50ng/mL), LPS *E.coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL) isolados ou associados, na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL).

## MTS

Para avaliação dos efeitos dos tratamentos na viabilidade celular foram realizados testes de MTS e azul de trypan (apoptose via intrínseca e processo final de morte celular, respectivamente) divididos em 3 períodos: 24, 48 e 72 horas. No experimento de MTS, ao final de cada período, a função mitocondrial foi avaliada utilizando um kit comercial (Cell Titer 96 Aqueous; Promega Corp.), que avalia a função mitocondrial através da atividade de enzimas desidrogenases presentes em células metabolicamente ativas. Os resultados mostram que no período de 24 horas, as células tratadas com LPS *E. coli* e BSA-AGE, ou a associação de ambos, apresentaram aumento significativo na atividade metabólica em ambos os grupos (controle e diabetes). Curiosamente,

a inibição dos receptores TLR4 e RAGE não influenciou a modulação da atividade metabólica por estes estímulos. O mesmo ocorre no período de 48 horas e apesar de ambos os grupos mostrarem atividade metabólica significativamente aumentada com estímulos de LPS *E. coli* e BSA-AGE isolados e associados, PBMC de indivíduos não diabéticos mostram uma atividade metabólica superior. Entretanto, no período de 72 horas, a inibição do receptor RAGE diminuiu de forma significativa a atividade metabólica nas células que foram tratadas com BSA-AGE em PBMC de indivíduos não diabéticos. Além disso, os estímulos com BSA-AGE isolado e associado ao LPS *E. coli* continuou aumentando a atividade metabólica nestas células de forma significativa quando comparado às células que não receberam algum tipo de tratamento (células controle). Não observamos, no entanto, efeito sinérgico entre os estímulos de TLR4 e RAGE. O grupo diabetes, nesse mesmo período, não mostrou diferenças significativas na atividade metabólica celular entre diferentes tipos de tratamento. As células PBMC de ambos os grupos apresentaram resistência à apoptose, até mesmo pelo controle positivo de estímulo apoptótico (Doxorrubicina) (Figuras 3, 4 e 5).

## A) Controle

## B) Diabetes

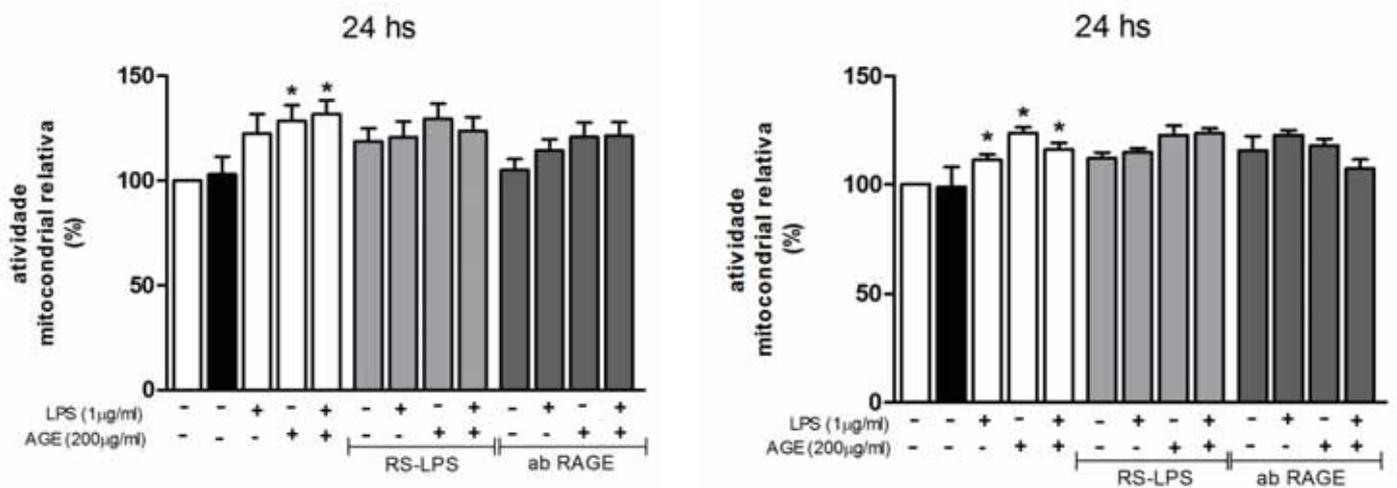
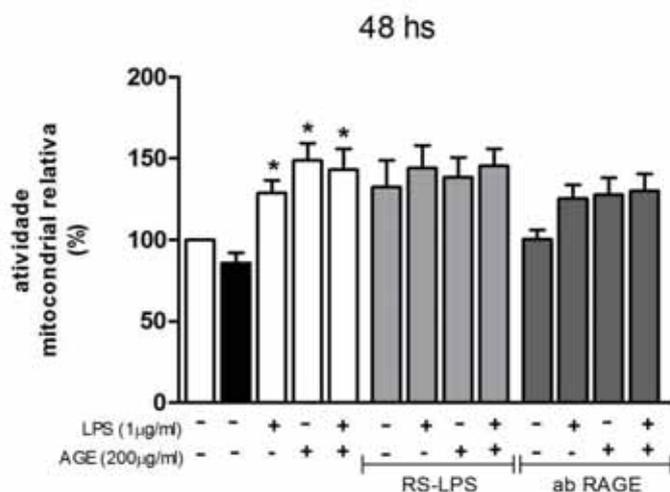


FIGURA 3 – Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica celular, em ambos os grupos, no período de 24 horas. Os tratamentos foram realizados com LPS *E. coli* (1µg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200µg/mL) na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo ( $p < 0.05$ ).

A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorrubicina (10µM).

## A) Controle



## B) Diabetes

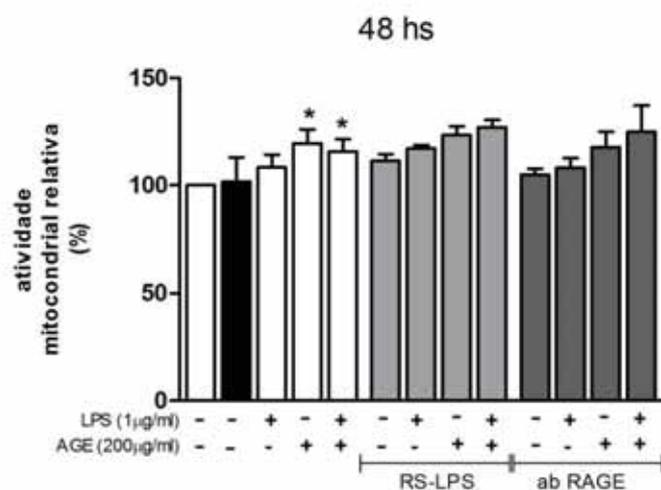


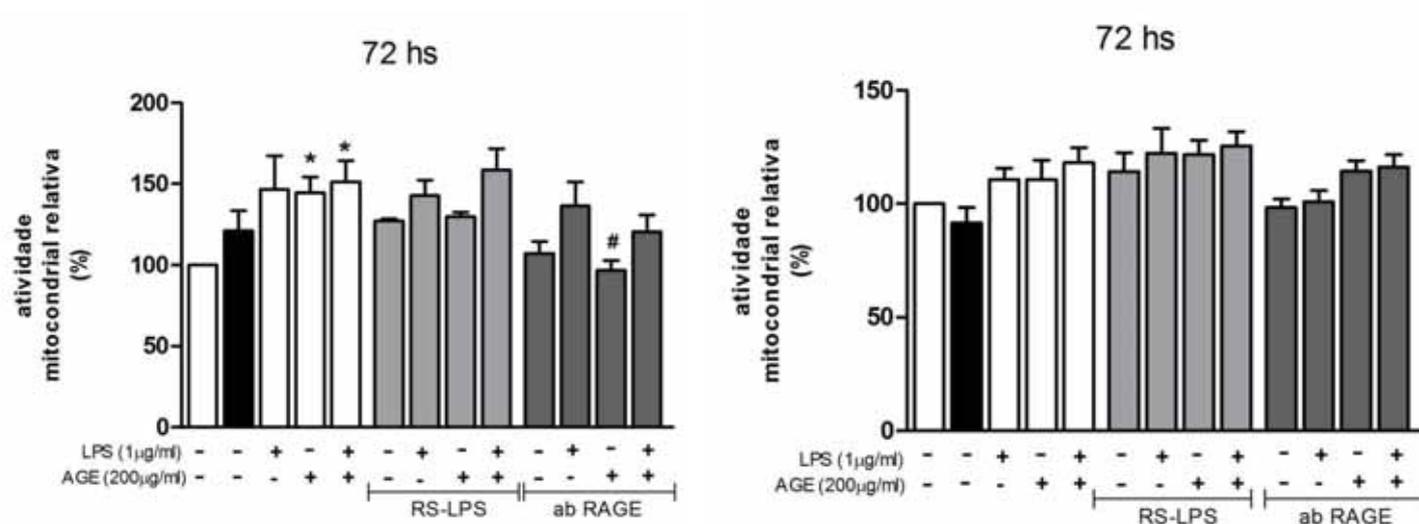
FIGURA 4 – Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica celular, em ambos os grupos, no período de 48 horas. Os tratamentos foram realizados com LPS *E. coli* (1µg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200µg/mL) na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo ( $p < 0.05$ ).

A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorubicina (10µM).

## A) Controle

## B) Diabetes



**FIGURA 5** – Avaliação dos tratamentos na atividade metabólica celular, em ambos os grupos, no período de 72 horas. Os tratamentos foram realizados com LPS *E. coli* (1µg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200µg/mL) na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL).

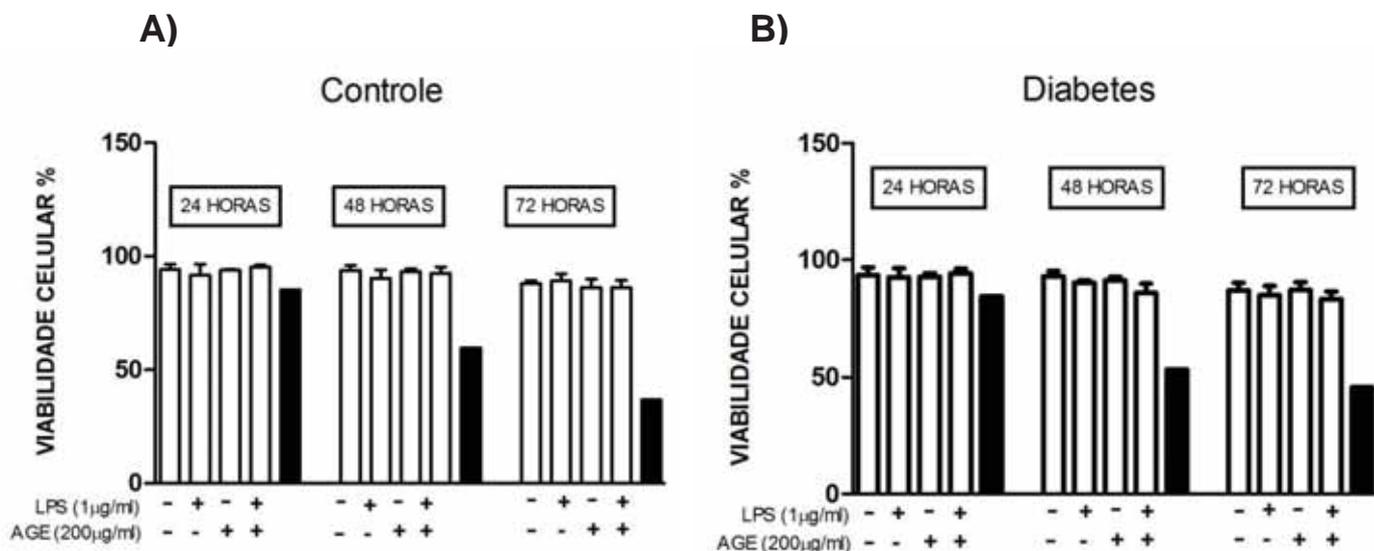
(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo ( $p < 0.05$ ).

(#) Diferenças significativas quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo. ( $p < 0.05$ ). A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorubicina (10µM).

## Azul de trypan

No experimento com azul de trypan, ao final de cada período, as amostras foram diluídas 1:1 com o reagente (Azul de trypan 0.4%, Invitrogen Corp) e a viabilidade celular foi avaliada pela contagem em hemocitômetro de células coradas (não viáveis) e não coradas (viáveis). Os resultados mostram que a viabilidade celular no grupo controle e no grupo diabetes, praticamente se manteve constante nos 3 períodos, na presença ou ausência de LPS *E. coli* e BSA-AGE isolados ou associados. A doxorubicina utilizada como controle positivo de estímulo apoptótico foi capaz de reduzir a viabilidade celular das

PBMC provenientes de indivíduos portadores de diabetes e indivíduos não diabéticos, em todos os períodos do experimento (24,48 e 72 horas) (Figura 6).



**FIGURA 6** – Avaliação dos tratamentos na indução de morte, indicada pela descontinuidade da parede celular e coloração das células no ensaio de azul de trypan, nos períodos de 24,48 e 72 horas. Os tratamentos foram realizados com LPS *E. coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL), isolados ou associados. A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorrubicina (10µM).

### Avaliação da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na população mista de PBMC isolada do sangue periférico e modulação do perfil de resposta T auxiliar (Th1/Th2/Th17)

Para que fosse possível a avaliação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e das proporções celulares Th1, Th2 e Th17 na população mista de PBMC, em ambos os grupos, foi realizada a marcação das células T com um coquetel de anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos: αCD4-PERCP-Cy5.5 (marcação de superfície) e αIL17A-PE, αIFN-gama-FITC, αL-4-APC (marcações intracelulares) - (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping kit, BD Biosciences). Os

resultados indicam uma tendência para maior quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4+) em PBMC de indivíduos diabéticos em comparação aos indivíduos não diabéticos (Figura 7). No grupo diabetes, o tratamento com PMA resultou na redução significativa do percentual de células CD4+, quando comparado as células não estimuladas (Figura 8).

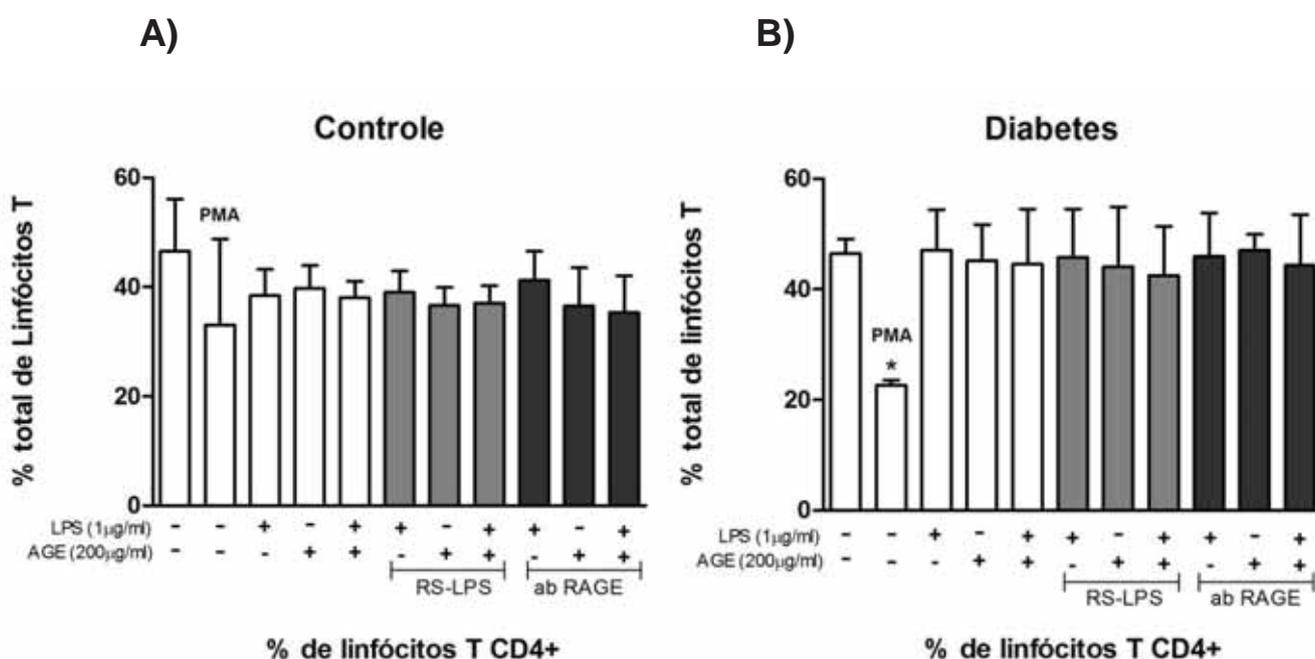


FIGURA 7 - Avaliação do percentual de linfócitos T auxiliares (CD4+) em PBMC de pacientes controles (não diabéticos) e de pacientes portadores de diabetes tipo 2, segundo o estímulo, isolado e associado, de LPS *E.coli* (1µg/mL), BSA-AGE (200µg/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL), RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL) e estímulo com PMA (50ng/mL). As barras indicam a média e o desvio padrão do percentual de células CD4+, segundo o estímulo realizado.

(\*) Diferença significativa quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

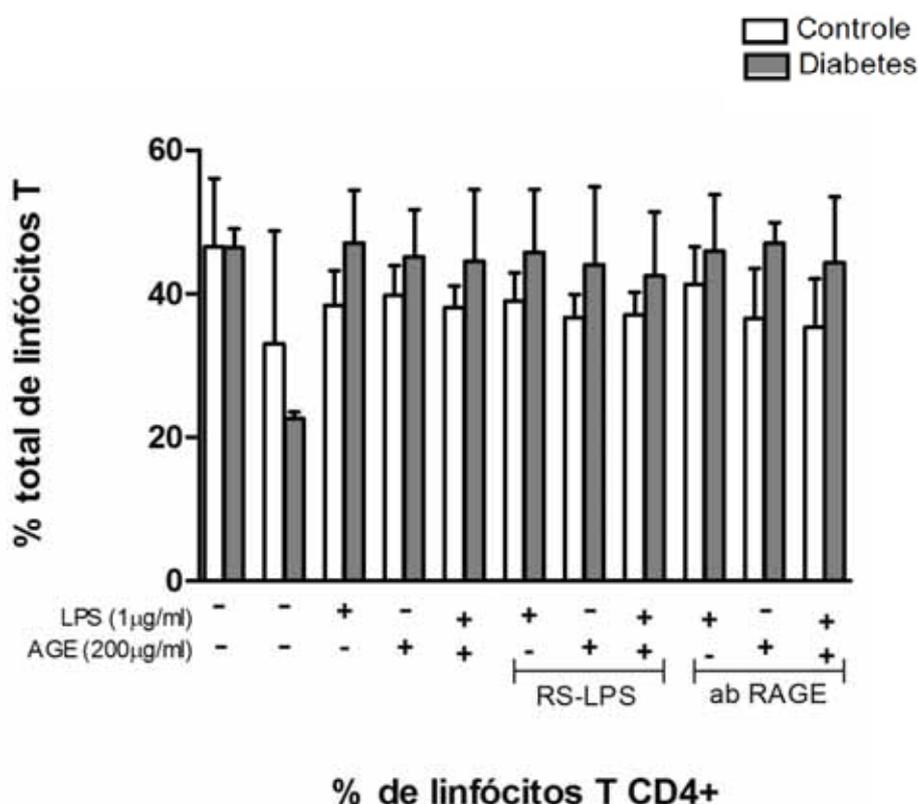


FIGURA 8 – Comparação do percentual de linfócitos T auxiliares (CD4+), entre o grupo controle e o grupo diabetes, na população mista de PBMC, segundo o estímulo, isolado e associado, de LPS *E. coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL), na presença e ausência dos inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL), RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL) e estímulo com PMA (50ng/mL). As barras indicam a média e o desvio padrão do percentual de células CD4+, segundo o estímulo realizado. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A marcação intracelular de citocinas avaliada em células T CD4+ tanto no grupo controle como no grupo diabetes, para caracterização do padrão de resposta predominante (Th1, Th2 e Th17) indicou que o tratamento com PMA e com BSA-AGE aumentou de maneira significativa a proporção de células Th1 (células IFN- $\gamma$ +) quando comparadas àquelas células que não receberam qualquer tipo de tratamento. Entretanto, no grupo diabetes, esse aumento na proporção de Th1 foi observado apenas com a inibição dos receptores TLR e

RAGE, associado ao tratamento com LPS *E. coli* e BSA-AGE respectivamente, quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo (Figura 9).

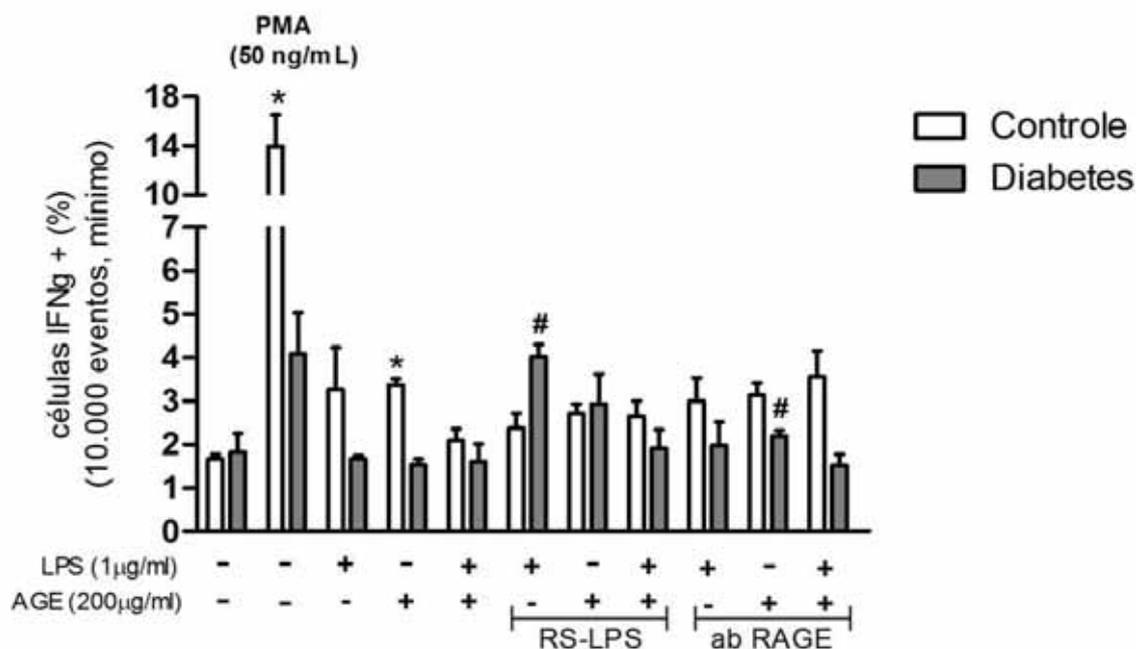


FIGURA 9 – Avaliação da proporção de células Th1 (células IFN- $\gamma$  +) através da marcação intracelular por anticorpo conjugado a fluoróforo ( $\alpha$ IFN-gama-FITC). Aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Tratamentos realizados: LPS *E. coli* (1 $\mu$ g/mL) e BSA-AGE (200 $\mu$ g/mL), isolados ou associados, na presença e ausência dos inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20 $\mu$ g/mL), RAGE (ab-RAGE, 4 $\mu$ g/mL) e estímulo com PMA (50ng/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

(#) Diferenças significativas quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

O aumento significativo na proporção das células Th2 (células IL-4+) foi observado no grupo não diabético com os tratamentos de PMA e BSA-AGE. A inibição do receptor TLR4 associado ao estímulo de BSA-AGE também fez aumentar de maneira significativa a proporção de células Th2. No grupo

diabetes, essa proporção aumentada de células Th2 só foi significativa através do bloqueio de TLR associado ao tratamento com BSA-AGE (Figura 10).

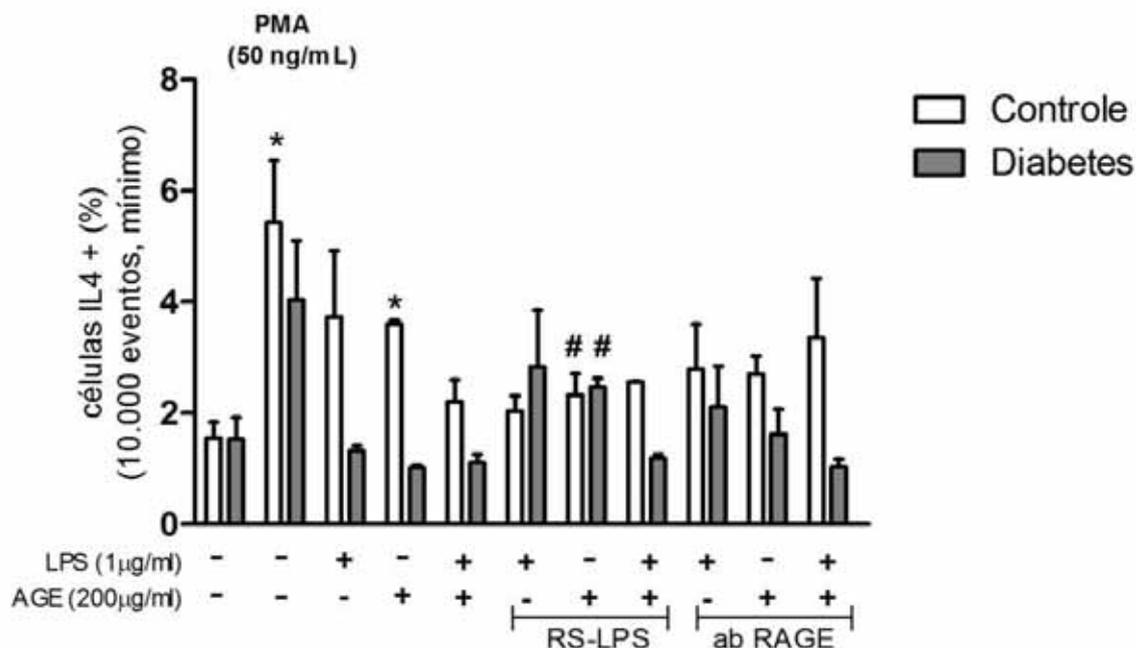


FIGURA 10 – Avaliação da proporção de células Th2 (células IL-4 +) através da marcação intracelular por anticorpo conjugado a fluoróforo ( $\alpha$ IL-4-APC). Aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Tratamentos realizados: LPS *E.coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL), isolados ou associados, na presença e ausência dos inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL), RAGE (ab-RAGE, 4µg/mL) e estímulo com PMA (50ng/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

(#) Diferenças significativas quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

A proporção de células Th17 (células IL-17A+) aumentou de maneira significativa em ambos os grupos com estímulo de PMA. Somente no grupo diabetes, o bloqueio de ambos receptores TLR4 e RAGE associados

respectivamente com os tratamentos LPS *E. coli* e BSA-AGE, provocou um aumento significativo na proporção de células Th17 (Figura 11).

As células dos pacientes diabéticos mostraram uma tendência para predominância de resposta Th1, representada na Figura 12.

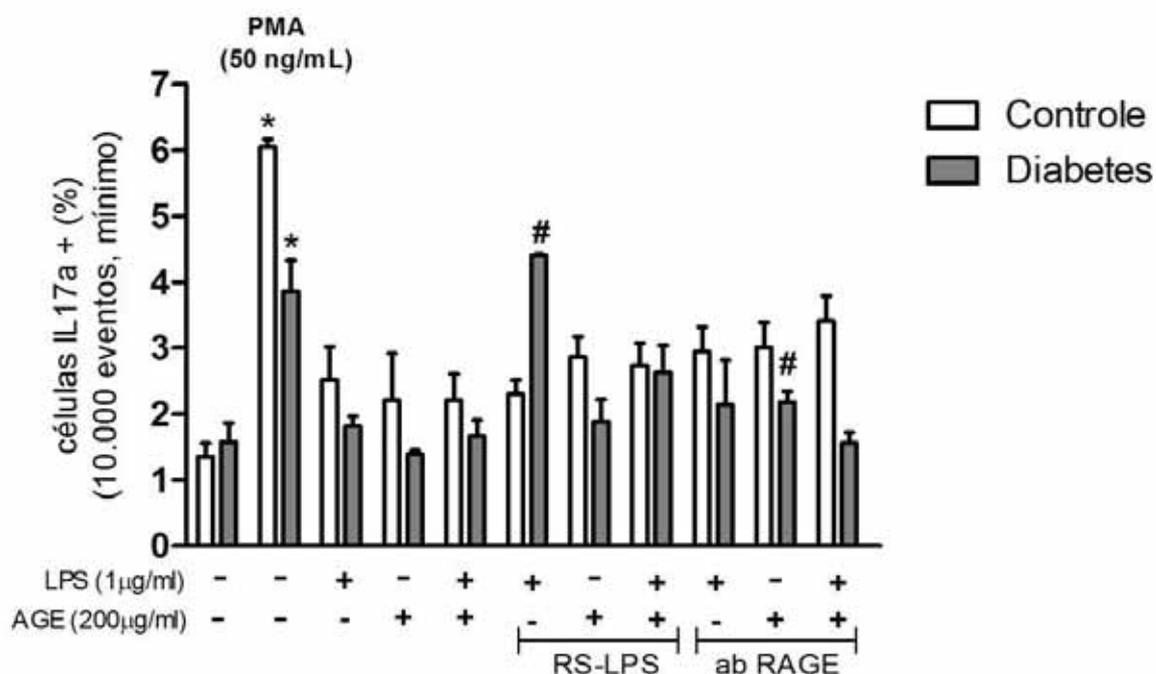


FIGURA 11 – Avaliação da proporção de células Th17 (células IL-17a +) através da marcação intracelular por anticorpo conjugado a fluoróforo ( $\alpha$ IL17A-PE). Aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo. Tratamentos realizados: LPS *E.coli* (1µg/mL) e BSA-AGE (200µg/mL), isolados ou associados, na presença e ausência dos inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20µg/mL), RAGE (ab-RAGE 4µg/mL) e estímulo com PMA (50ng/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

(#) Diferenças significativas quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

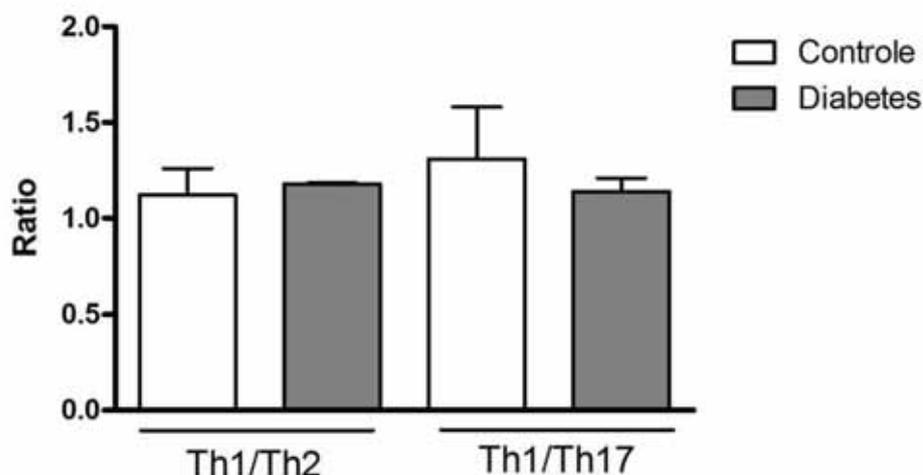


FIGURA 12 - Proporção entre o padrão de resposta de células CD4+ em indivíduos diabéticos tipo 2 e não diabéticos. A razão entre o percentual de células Th1 (CD4+/IFN $\gamma$ +) e Th2 (CD4+/IL4+) e entre células Th1 e Th17 (CD4+/IL17A+) foi calculado a partir dos resultados da análise por citometria de fluxo em PBMC não estimulados. Nota-se discreto desvio, sem significância estatística, para o perfil Th1 (CD4+/IL4+) em diabéticos.

### **Avaliação na modulação da expressão gênica (RNAm) nas células PBMC de indivíduos diabéticos e não diabéticos**

#### **RAGE**

A modulação da expressão gênica foi avaliada nas células PBMC de ambos os grupos após 6 horas de estímulo. Os resultados mostram que o estímulo isolado de BSA-AGE aumenta significativamente a expressão gênica de RAGE no grupo não diabético. O uso do anticorpo para bloquear a sinalização via RAGE demonstrou que esta indução ocorre por mecanismo autócrino, dependente da ativação do receptor RAGE. No grupo diabetes, apenas as células tratadas com PMA apresentaram uma diminuição na expressão gênica de RAGE. O estímulo com LPS e a ativação de TLR4 não exerceu influência na expressão de RNAm de RAGE em indivíduos diabéticos e não-diabéticos (Figura 13).

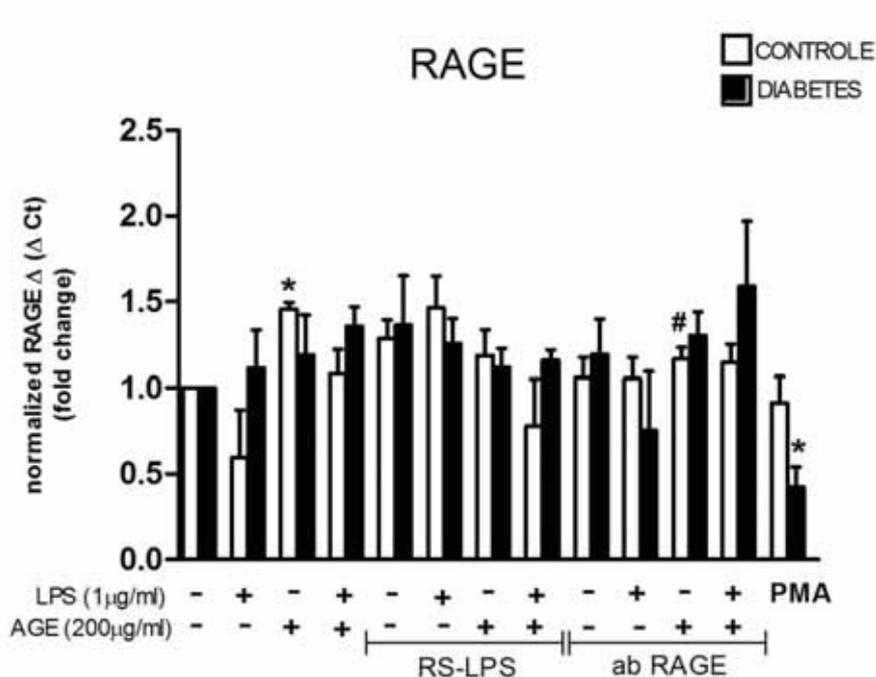


FIGURA 13 – Expressão gênica (RNAm) de RAGE avaliada por RT-qPCR em PBMC isoladas em amostras de sangue periférico de pacientes sistemicamente saudáveis (controle) e portadores de diabetes tipo 2 (grupo diabetes). Tratamentos realizados com LPS *E. coli* (1  $\mu$ g/mL) associado ou não à BSA-AGE (200  $\mu$ g/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20  $\mu$ g/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4  $\mu$ g/mL).

(\*) Diferenças significativas quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

(#) Diferença significativa quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

### CCL3

O estímulo com LPS induziu a expressão da quimiocina CCL3, também conhecida como MIP-1 $\alpha$ , porém esta indução ocorreu de forma significativamente mais potente em PBMC de indivíduos não diabéticos. A associação dos estímulos LPS e BSA-AGE não teve efeito sinérgico em nenhum dos grupos. De fato em PBMC de indivíduos não diabéticos a magnitude da indução de RNAm de CCL3 foi atenuada pela ativação concomitante de RAGE. Apenas em PBMC de diabéticos a expressão induzida

pelos estímulos LPS e BSA-AGE associados foi dependente da ativação de TLR4. Além disso, no grupo diabetes, a expressão de CCL3 diminuiu significativamente quando houve uma associação dos tratamentos LPS *E. coli* e BSA-AGE na presença do inibidor de TLR4 (RS-LPS). Em geral, os resultados indicam que PBMC de indivíduos não diabéticos foram mais responsivos na expressão de CCL3 e que a ativação de TLR4 induziu de forma muito mais potente a expressão gênica do que a ativação de RAGE. Os dados estão representados na Figura 14.

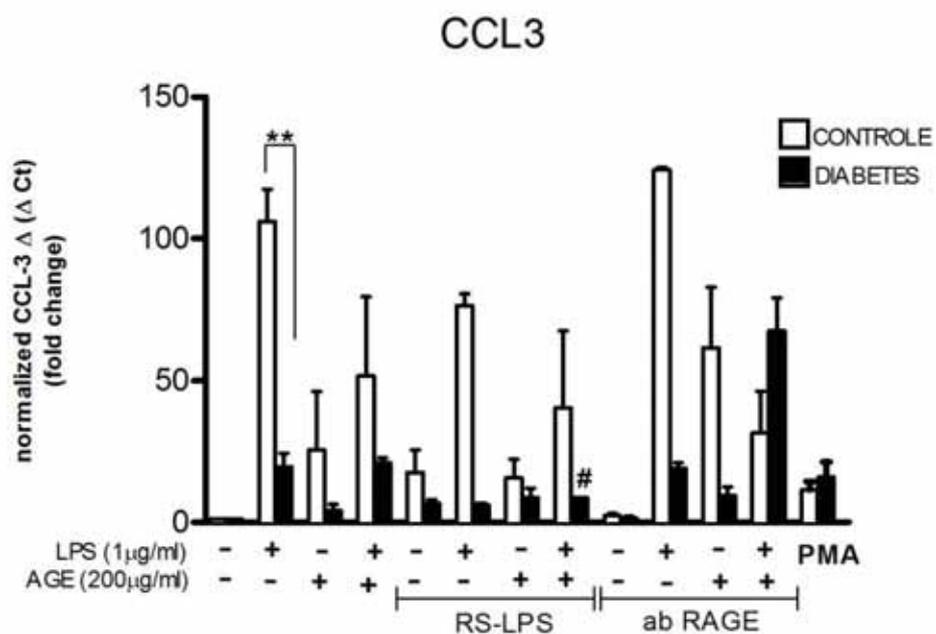


FIGURA 14 - Expressão gênica (RNAm) de CCL3 avaliada por RT-qPCR em PBMC isoladas em amostras de sangue periférico de pacientes sistemicamente saudáveis (controle) e portadores de diabetes tipo 2 (grupo diabetes). Tratamentos realizados com LPS *E. coli* (1 μg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200 μg/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20 μg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4 μg/mL). (#) Diferença significativa quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo. (\*\*) Diferença significativa entre os grupos controle e diabetes.

## **CCR5**

De forma similar ao observado para CCL3, a magnitude da expressão do receptor de quimiocina CCR5 foi discretamente maior em PBMC de indivíduos não diabéticos. Diferentemente, de CCL3, a regulação da expressão gênica de CCR5 parece ser induzida de forma mais marcante por BSA-AGE e não por LPS. Interessante notar que, apesar de AGE ser um estímulo mais potente que LPS, a inibição de TLR4 teve efeito mais marcante na expressão de RNAm de CCR5 do que a inibição de RAGE. Em ambos os grupos, diabéticos e não diabéticos nota-se uma tendência discreta para efeito sinérgico da ativação de TLR4 e RAGE. Em PBMC de diabéticos o estímulo com PMA, reduziu significativamente a expressão de RNAm de CCR5 (Figura 15).

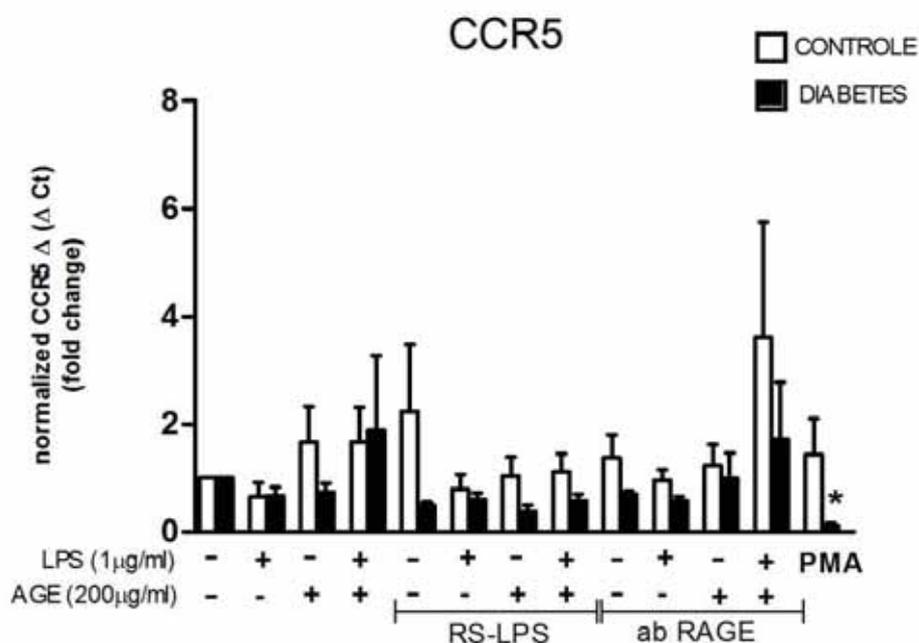


FIGURA 15 - Expressão gênica (RNAm) de CCR5 avaliada por RT-qPCR em PBMC isoladas em amostras de sangue periférico de pacientes sistemicamente saudáveis (controle) e portadores de diabetes tipo 2 (grupo diabetes). Tratamentos realizados com LPS *E. coli* (1 μg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200 μg/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20 μg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4 μg/mL). (\*) Diferença significativa quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

## IL-10

A expressão gênica da interleucina 10 por PBMC tanto de diabéticos quanto não diabéticos foi induzida primariamente por LPS, enquanto BSA-AGE não foi capaz de induzir RNAm de IL-10 de forma importante. De fato, a inibição de TLR4 atenuou de forma significativa esta indução, enquanto a inibição de RAGE não teve nenhum efeito na expressão de IL-10. Não houve efeito sinérgico ou antagônico com a associação de LPS e BSA-AGE, indicando que não há integração dos sinais gerados por TLR4 e RAGE na expressão desta citocina em PBMC. Os dados estão representados pela Figura 16.

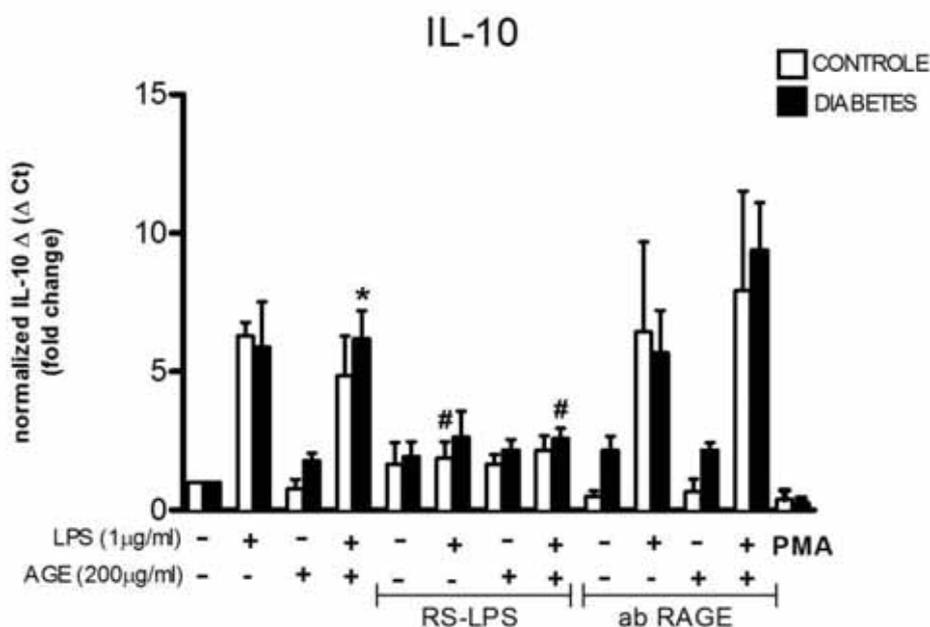


FIGURA 16 - Expressão gênica (RNAm) de IL-10 avaliada por RT-qPCR em PBMC isoladas em amostras de sangue periférico de pacientes sistemicamente saudáveis (controle) e portadores de diabetes tipo 2 (grupo diabetes). Tratamentos realizados com LPS *E. coli* (1 μg/mL) associado ou não à BSA-AGE (200 μg/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20 μg/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4 μg/mL). (\*) Diferença significativa quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo. (#) Diferença significativa quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

### TNF-α

A regulação da expressão gênica de TNF-α foi significativamente mais marcante após a ativação de TLR4 em ambos os grupos, enquanto a ativação de RAGE teve um efeito estimulatório discreto apenas em PBMC de indivíduos não diabéticos. De fato, a dependência da sinalização via TLR4 é confirmada com a verificação de que a inibição deste receptor inibiu de forma expressiva a indução de TNF-α. Por outro lado, a inibição de RAGE teve efeitos opostos em PBMC de não diabéticos, em que atenuou a indução por LPS, e em PBMC de diabéticos, nas quais potencializou a indução de TNF-α por LPS. A associação

dos estímulos LPS e BSA-AGE não modificou a regulação de TNF- $\alpha$  em PBMC de diabéticos, porém atenuou a indução por LPS em PBMC de indivíduos não diabéticos. Diferentemente do observado para IL-10, a expressão de TNF- $\alpha$  foi significativamente induzida por estímulo com PMA apenas em PBMC de indivíduos diabéticos, como mostra a Figura 17.

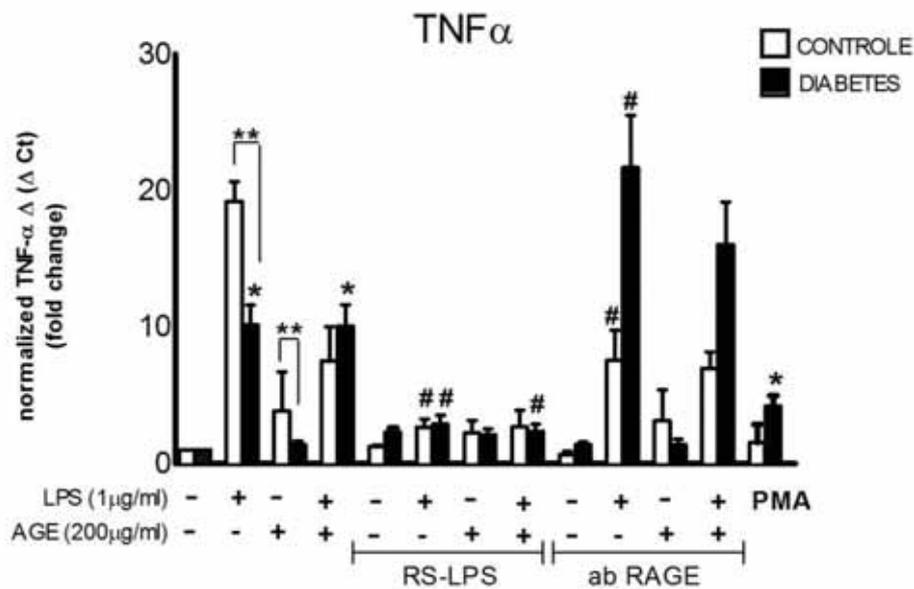


FIGURA 17 - Expressão gênica (RNAm) de TNF- $\alpha$  avaliada por RT-qPCR em PBMC isoladas em amostras de sangue periférico de pacientes sistemicamente saudáveis (controle) e portadores de diabetes tipo 2 (grupo diabetes). Tratamentos realizados com LPS *E. coli* (1 $\mu$ g/mL) associado ou não à BSA-AGE (200 $\mu$ g/mL), na presença ou ausência de inibidores de TLR4 (RS-LPS, 20 $\mu$ g/mL) e RAGE (ab-RAGE, 4 $\mu$ g/mL).

(\*) Diferença significativa quando comparado ao controle não estimulado dentro do mesmo grupo.

(#) Diferença significativa quando comparado ao estímulo isolado dentro do mesmo grupo.

(\*\*) Diferença significativa entre os grupos controle e diabetes.

## 5 DISCUSSÃO

A hipótese principal deste trabalho é a existência de um efeito sinérgico da ativação dos receptores TLR e RAGE na resposta imune. Estes receptores são similares pela capacidade de reconhecer diversos ligantes e estruturas (ou padrões) moleculares, exercendo papel na resposta imune inata ativada por MAMPs ou DAMPs. Em geral, os resultados deste trabalho não suportam a existência de uma interação, seja de natureza sinérgica ou antagônica, resultante da ativação destes receptores; porém existem diversas considerações importantes derivadas destes resultados que passamos a explorar a seguir.

### ***Apoptose e proliferação celular***

O processo de apoptose ou morte celular programada é essencial para manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, atuando como parte de um mecanismo de “controle de qualidade” e reparação, compensando erros genéticos ou erros estocásticos do desenvolvimento<sup>99</sup>.

Desde a década de 90, alguns trabalhos (in vitro) já associavam a indução de apoptose celular à hiperglicemia no diabetes mellitus<sup>5, 21, 62</sup>. Esses estudos tinham como foco principal a abordagem em células endoteliais da retina, rins, miocárdio e células endoteliais da veia umbilical em humanos. Os mecanismos envolvidos para início do processo apoptótico sob estado hiperglicêmico incluíam o estresse oxidativo, aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , disfunção mitocondrial (apoptose via intrínseca), alterações no metabolismo intracelular de ácidos graxos, ativação das quinases protéicas ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) e diminuição da ativação

de fosforilação da proteína kinase Akt<sup>99</sup>. Nossos resultados não suportam um papel de RAGE como indutor de apoptose, seja pela via intrínseca ou extrínseca. De fato, PBMC de indivíduos diabéticos pareceram ser mais resistentes à apoptose in vitro do que PBMC de indivíduos não diabéticos.

Diferenças no tipo celular (PBMC versus células endoteliais) e desenho dos experimentos (hiperglicemia versus estímulo com AGE) podem explicar as discrepâncias entre os resultados deste trabalho e os relatos da literatura. O estudo de Graber et al.<sup>32</sup>(1999), corrobora nossos resultados, e mostra que PBMC de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 exibem um baixo grau de permeabilidade da membrana ao iodeto de propídio (PI), sugerindo que estas células possuem menor taxa apoptótica quando comparadas as células de indivíduos sistemicamente saudáveis. A interpretação desses resultados baseia-se justamente na desregulamentação enzimática resultante da hiperglicemia que faz parte de um complexo mecanismo de resposta adaptativa que permite as PBMCs, de pacientes diabéticos, tolerância de variabilidade metabólica intracelular, e aumento da impermeabilidade da membrana (rigidez). Assim, limita-se não só o processo apoptótico como também outros tipos de estresse metabólico (glicosilação) resultantes do diabetes mellitus<sup>32</sup>.

Os resultados descritos na literatura divergem muito e, em parte, isso ocorre devido oscilação da resposta imunológica nos portadores de diabetes; número insuficiente de amostra no estudo ou inconsistências na coleta de células da população que está sendo estudada<sup>47</sup>. Além disso, a hiperglicemia pode aumentar produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em um aumento do estress oxidativo<sup>3</sup>. Esse aumento foi observado em células

de pacientes diabéticos tipo 2, e associado ao comprometimento da atividade de enzimas mitocondriais, despolarização da membrana mitocondrial, ativação das caspase-3 e PARP, levando a um processo de apoptose celular, e debilitando a homeostase dos linfócitos nesses indivíduos sistemicamente comprometidos <sup>45</sup>. Outros estudos <sup>3, 37, 70</sup>, também mostram resultados semelhantes com relação a apoptose em linfócitos no diabetes.

Neste trabalho, não avaliamos os mecanismos biológicos relacionados à apoptose via intrínseca e extrínseca, mas os resultados obtidos sugerem que será interessante avaliar mecanismos relacionados à sobrevivência celular como as ativação de Akt, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL após estímulo com LPS e BSA-AGE.

Os estímulos com LPS *E. coli* e BSA-AGE, isolados ou em associação, não tiveram influência na viabilidade e proliferação de PBMC de indivíduos saudáveis e de portadores de diabetes mellitus tipo 2. De fato, observamos que estes estímulos aumentam a atividade metabólica destas células em ambos os grupos. Curiosamente, a inibição dos receptores TLR4 e RAGE não influenciou este aumento da atividade metabólica, exceto pelo bloqueio de RAGE em PBMC de não diabéticos no período de 72 h. O fato da inibição dos receptores não ter influenciado no aumento da atividade metabólica, pode estar associado à ausência da utilização dos dois inibidores simultaneamente. Como inibimos TLR4 ou RAGE, um deles sempre permanecia ativo e pode ter 'compensado' a ausência do outro receptor. Em contraste aos nossos resultados, a literatura mostra que o estímulo com AGE inibe a atividade proliferativa em células

progenitoras endoteliais (derivadas da medula óssea) de maneira dose-dependente e que silenciar RAGE (siRNA) pode bloquear este efeito <sup>14</sup>.

Entretanto, o tipo celular e a forma do composto glicado utilizados são diferentes ao protocolo utilizado em nosso estudo. Em outro estudo, duas formas de AGE (albumina sérica de ovo de galinha e albumina sérica bovina BSA-AGE) foram utilizadas para avaliação de viabilidade celular em dois tipos de linhagem de células: BHK-21 fibroblastos de hamster e SH-SY5Y células de neuroblastoma humano. Ambos compostos glicosados foram capazes de inibir a viabilidade celular de maneira dose-dependente <sup>63</sup>. A influência de BSA-AGE e de LPS na viabilidade e atividade metabólica celular são relatadas por alguns trabalhos <sup>9, 83, 84</sup>, no entanto, a diferença no tipo celular utilizado nesses estudos dificulta a comparação com nossos resultados. Além disso, a utilização de população mista de células (avaliação em PBMC sem expansão de linfócitos) possibilita interação celular (linfócitos e células apresentadoras de antígenos - APCs) e uma resposta de maneira peculiar aos diferentes tipos de tratamento.

### ***Perfil de resposta de células T auxiliares (Th)***

Nossos resultados indicam uma tendência para maior quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4+) em pacientes portadores de diabetes, em comparação aos indivíduos do grupo controle, e esses resultados condizem com o estudo de Bouter et al. <sup>10</sup> (1992).

A marcação intracelular de células CD4+ em nosso trabalho mostra que tratamentos de PMA e BSA-AGE aumentam significativamente a proporção de células IFN- $\gamma$ + em indivíduos não diabéticos. Não observamos efeitos

sinérgicos ou antagônicos com a ativação simultânea de TLR4 e RAGE. Com uma abordagem experimental um pouco diferente, resultados semelhantes são relatados em estudo que avalia os diferentes subtipos de AGE. AGE-2 e AGE-3 são os que possuem mais alta afinidade com o receptor RAGE e aumentam a produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em PBMC de pacientes sistemicamente saudáveis<sup>94</sup>.

De forma similar à indução de IFN-  $\gamma$ , verificamos que os estímulos com PMA e BSA-AGE também aumentaram de forma significativa a proporção de células T auxiliares IL-4+ em PBMC de indivíduos não diabéticos, novamente sem interação entre TLR4 e RAGE. Esses resultados demonstram que a ativação de RAGE pode modular o padrão de resposta de células T auxiliares, com a indução da produção de citocinas que são importantes no processo inflamatório<sup>56, 67, 74</sup>. Avaliando-se as células Th17 (células IL-17+), apenas o estímulo com PMA fez aumentar a proporção de linfócitos T auxiliares IL17A+ tanto em PBMC de indivíduos saudáveis quanto de diabéticos, indicando que a ativação de TLR4 e RAGE não tem papel relevante neste tipo de resposta Th. Interessante notar que, em geral, PBMC de indivíduos não diabéticos foram mais 'responsivos' ao estímulo com PMA em comparação à PBMC de indivíduos diabéticos. Resultados semelhantes são relatados na literatura em relação à produção basal de IFN- $\gamma$  e IL-17, em células mononucleares em sangue periférico de pacientes sépticos e sadios. Estes dados foram avaliados através de marcação intracelular (células Th1 e Th17) por citometria de fluxo.

Os resultados mostraram que após o estímulo com PMA, em uma concentração menor do que a utilizada em nossos trabalhos (20 ng/mL), os

níveis de IL-17 e IFN- $\gamma$  foram aumentados, sendo este último observado em proporção maior nos pacientes saudáveis. Esses dados demonstram que após um estímulo exógeno potente, aumentam-se os níveis basais de células Th1 e Th17 e estas, estão envolvidas na resposta inflamatória tanto de pacientes sistemicamente saudáveis como em pacientes portadores de doenças que apresentam um desequilíbrio no controle do sistema imunológico <sup>82</sup>.

No entanto, o estímulo com LPS *E. coli* isolado ou associado ao BSA-AGE, não influenciou a alteração de proporção celular Th1, Th2 e Th17. Esses dados divergem dos estudos encontrados na literatura. Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) induz a produção de IFN- $\gamma$  em células PBMC, e os monócitos possuem um papel essencial e obrigatório nesse processo. Linfócitos T purificados falharam em produzir IFN- $\gamma$  quando estimulados por LPS, e a adição de 2% de monócitos à cultura de linfócitos, fez com que houvesse uma enorme resposta ao LPS bacteriano, com elevado nível de IFN- $\gamma$  <sup>52</sup>. Esse trabalho não só mostra que PBMC são responsivas à LPS, mas também a importância e necessidade da interação de monócitos e linfócitos no processo de resposta inflamatória, o que condiz com a escolha do tipo celular utilizado em nosso trabalho. A diferença encontrada entre nossos resultados e a literatura pode estar associada às diferentes formas de avaliação; a concentração utilizada de LPS; e o tempo de estímulo. Além disso, a intenção de utilização de PBMC sem expansão de linfócitos foi minimizar a perda das características fenotípicas peculiares das células dos pacientes diabéticos. No entanto, mesmo o curto período de tempo entre a coleta, separação e estímulo

das PBMC pode ter afetado as características fenotípicas das células, devido à “padronização” das condições do ambiente extracelular.

Com relação à atuação dos receptores (TLR4 e RAGE), os resultados mostram que a inibição dos mesmos, não influencia a regulação de proporção de células IFN- $\gamma$ +, IL-4+ e IL-17+, uma vez que o bloqueio destes receptores com RS-LPS e ab-RAGE, não diminui a marcação intracelular destas células (com exceção da inibição de TLR4 associada ao estímulo com BSA-AGE na avaliação das células IL4+ no grupo controle) quando comparados aos estímulos respectivos isolados, em ambos os grupo (controle e diabetes), fato que pode ter duas explicações: 1) os inibidores utilizados não foram 100% eficientes; 2) existem outros receptores que podem estar intermediando os efeitos dos estímulos utilizados. Experimentos adicionais de inibição da expressão gênica de TLR4 e RAGE com siRNA ou shRNA poderiam verificar a primeira hipótese, porém estes não foram realizados neste estudo.

### ***Regulação da expressão gênica de citocinas e quimiocinas***

Avaliamos a expressão gênica de citocinas relacionadas ao processo inflamatório IL-10 e TNF- $\alpha$ , da quimiocina CCL3 / MIP-1 $\alpha$  e dos receptores CCR5 e RAGE apenas em RNAm e em único período de 6 horas após os estímulos. Esta abordagem experimental apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas: o curto período de 6 horas é favorável para avaliação de genes de resposta rápida e condiz com a escolha do protocolo de cultura de células utilizado, uma vez que, neste período de tratamento minimiza alterações no fenótipo das PBMC obtidas de indivíduos diabéticos e não diabéticos pelas condições padronizadas da cultura in vitro, incluindo pH,

nutrientes, aminoácidos e nível de glicose. Por outro lado, a escolha de se avaliar a expressão gênica somente em nível de RNAm, dificulta a comparação com resultados encontrados na literatura que avaliaram a regulação gênica em nível protéico, já que as proteínas é que exercem os principais efeitos biológicos. Além disso, existe a possibilidade dos achados de RNAm não corresponderem à produção de proteína devido à regulação pós-transcricional de genes como IL-10 e TNF- $\alpha$  <sup>76</sup> e considerando que a meia-vida destas espécies de RNAm pode ser inferior a 6 horas.

A expressão de IL-10 foi induzida pelo estímulo com LPS isolado e por LPS associado a BSA-AGE em PBMC de diabéticos e não diabéticos. Esta regulação foi dependente principalmente de TLR4, uma vez que a inibição de RAGE não alterou a regulação da expressão gênica. A ativação de RAGE, embora não tivesse efeito indutor para expressão de IL-10, também não teve efeito antagônico à ativação de TLR4 por LPS. Os resultados para a expressão de TNF- $\alpha$  foram similares, com LPS sendo o estímulo mais potente, porém a ativação de RAGE por BSA-AGE teve efeito indutor discreto, mas mais marcante do que para IL-10. Novamente, não observamos sinergismo ou antagonismo entre TLR4 e RAGE.

A ausência de efeito sinérgico entre RAGE e TLR4 é interessante e não antecipada por nós, uma vez que a ativação de diferentes receptores de superfície celular por seus respectivos ligantes pode convergir para as mesmas vias de sinalização intracelular, como a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B <sup>58</sup>. NF- $\kappa$ B a principal via de sinalização ativada por TLRs, e sua relevância para a expressão dos genes-alvo considerados é demonstrada pelos efeitos do

bloqueio do receptor TLR4. No entanto o resultado final da indução da expressão gênica depende do efeito líquido das proteínas ligantes ao DNA, principalmente na região promotora dos genes. Embora NF- $\kappa$ B seja uma via de convergência de sinais gerados por TLR e RAGE, diversas outras vias de sinalização (e, conseqüentemente, fatores de transcrição e proteínas ligantes ao DNA) podem ser ativadas por estes receptores. Assim, dependendo da natureza e quantidade de fatores de transcrição (ativadores da síntese de RNAm) e de repressão (inibidores da síntese de RNAm) teremos a modulação da produção de RNAm.

Esta complexidade na regulação do mecanismo transcricional pode estar associada a resultados intrigantes observados, como o fato de que a inibição do receptor RAGE seguida do estímulo de TLR4 com LPS ter resultado em significativo aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em PBMC de indivíduos diabéticos, enquanto que em PBMC de indivíduos não diabéticos essa expressão foi diminuída.

O gene TNF- $\alpha$ , por exemplo, pode ser regulado pelos fatores de transcrição NFAT and ATF2/Jun em células B e T. Nas células T ATF2/Jun se liga ao elemento AMP-cíclico no promotor do gene TNF- $\alpha$  e colabora com NFAT, permitindo a atividade de transcrição<sup>51</sup>. Por outro lado, fatores como C/EBP- $\alpha$  e c-Jun induzem a expressão de TNF- $\alpha$  independente de NFAT em células monocíticas<sup>105</sup>. O Quadro 1 abaixo apresenta a quantidade de sequências ou "motivos" de DNA em uma região de 10 Kb acima do sítio de início da transcrição dos genes-alvo avaliados e ilustra a complexidade envolvida na regulação destes genes.

Quadro 1 - Número de sítios de DNA potencialmente reconhecidos por proteínas ligantes ao DNA segundo o gene-alvo considerado. Resultados obtidos a partir de busca em algoritmo *online* (<http://www.softberry.com>) utilizando uma sequência de 10 Kb do promotor dos genes obtida no banco de dados do NCBI/NIH

<b>GENES</b>	<b>NÚMERO DE SÍTIOS (<i>MOTIFS</i>) DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO/REPRESSÃO</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>295</b> , sendo 121 fatores diferentes
<b>IL-10</b>	<b>166</b> , sendo 95 fatores diferentes
<b>CCL3</b>	<b>244</b> , sendo 106 fatores diferentes
<b>CCL5</b>	<b>194</b> , sendo 78 fatores diferentes
<b>RAGE</b>	<b>123</b> , sendo 108 fatores diferentes

A expressão de CCL3 foi maior em PBMC de indivíduos não diabéticos, porém esta diferença foi estatisticamente significativa apenas após o estímulo com LPS. Essa menor responsividade pode estar relacionada ao debilitado sistema imunológico característico aos pacientes diabéticos descompensados e as alterações na quimiotaxia e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), a função principal de CCL3. A literatura sobre o papel de CCL3 no diabetes mellitus é controversa. Alguns demonstram um impacto dos níveis de CCL3 na modulação da resposta imune/inflamatória em condições e doenças de natureza autoimune como o diabetes tipo 1 e na infecção por HIV <sup>35, 75</sup>. Outros trabalhos relatam marcante redução das quimiocinas ligantes dos receptores CCR5 e CXCR3 em linfócitos de sangue periférico de pacientes com diagnóstico recente de diabetes tipo 1 <sup>61</sup>. CCL3 é o ligante natural dos receptores CCR1 e CCR5. Os resultados encontrados na

modulação gênica de CCR5 diferiram dos de seu ligante, uma vez que BSA-AGE foi o estímulo indutor mais potente ao contrário de CCL3 que foi induzido principalmente por LPS. No entanto, TLR4 parece ter um papel mais importante do que RAGE na modulação da expressão de CCR5. Novamente, PBMC de pacientes não diabéticos foram mais responsivas aos estímulos. A literatura também é controversa com relação ao papel do receptor CCR5 no diabetes mellitus. Avaliação em células PBMCs de pacientes diabéticos tipo 2, por citometria de fluxo, mostram um aumento da expressão de CCR5, quando comparadas às células do grupo controle <sup>23</sup>. Em outro estudo, não foi observada diferença na expressão de CCR5 entre vários subgrupos de pacientes portadores de diabetes tipo 1 e pacientes “controles” <sup>103</sup>.

Avaliamos também a regulação expressão do próprio receptor principal dos AGEs, e verificamos que a indução por BSA-AGE ocorre de maneira autócrina. Além disso, observamos que TLR4 não exerce papel importante na modulação da expressão do receptor. Um efeito gradativo na expressão (mas não significativo) de RAGE foi observado com o tratamento de LPS, BSA-AGE e associação de ambos. Não observamos diferenças significativas na capacidade dos estímulos induzirem a expressão de RAGE entre os grupos diabetes e controle, porém surpreendentemente a expressão basal de RAGE foi superior em PBMC de indivíduos não diabéticos (dados de expressão gênica normalizada não apresentados). Nossos resultados contrastam com relatos da literatura de maior expressão de RAGE em pacientes diabéticos <sup>91, 96</sup>, porém é preciso considerar que avaliamos apenas RNAm e em um período de estímulo curto. A ausência de influência da

ativação de TLR na expressão de RAGE também é intrigante uma vez que a expressão de RAGE é induzida pela ativação de NF- $\kappa$ B, criando um 'loop' de regulação positiva que aumenta a resposta inflamatória <sup>57</sup>. O sinal gerado na ativação de RAGE pode convergir para as mesmas vias de sinalização intracelular gerada por ativação de TLR <sup>58</sup> e assim, promover convergência para uma mesma via de sinalização metabólica nas PBMC, utilizando dois receptores de superfícies diferentes <sup>100</sup>. Embora o mecanismo de sinalização ainda não seja totalmente esclarecido, devido à capacidade de interagir com uma gama de ligantes endógenos, RAGE pode funcionar como um excelente "sensor" para estímulos ambientais, e portanto, desempenhar um papel crucial na regulação da homeostase e patogênese da resposta imune inata e na resposta imune adaptativa através da sinalização de tecido injuriado e ativação endógena de células T imune efectoras <sup>58</sup>. Assim, a ausência de sinergismo entre TLR4 e RAGE observada neste estudo é intrigante, mas precisa ser interpretada no contexto do desenho e condições experimentais utilizadas. A grande variedade de elementos reguladores que podem influenciar a expressão gênica (promotores e repressores da transcrição) também pode ter papel importante nos resultados encontrados. Finalmente, como não realizamos (neste estudo) a inibição simultânea dos receptores RAGE e TLR4 previamente aos estímulos com LPS e BSA-AGE, existe a possibilidade de um efeito compensatório, em que a inibição de um dos receptores é compensada pela atividade do outro. A avaliação da expressão gênica em nível protéico e após indução com outros estímulos, bem como a utilização de estratégias

alternativas para a inibição da atividade de RAGE e TLR4 serão importantes para expandir e confirmar os resultados relatados.

## 6 CONCLUSÃO

Em resposta à hipótese geral deste trabalho, concluímos que não há um sinergismo consistente na ativação de TLR4 e RAGE na modulação da resposta imune.

A partir dos resultados obtidos, e considerando os objetivos específicos propostos concluímos que:

1. LPS e BSA-AGE não induzem apoptose em PBMC de forma significativa; e PBMC de pacientes diabéticos são mais resistentes à apoptose;
2. A atividade metabólica de PBMC é aumentada pelo estímulo com LPS e BSA-AGE, sem efeito sinérgico ou antagônico entre os estímulos;
3. A proliferação celular de PBMC não é modulada pelo estímulo com LPS e BSA-AGE, isoladamente ou combinados;
4. Há uma tendência de maior proporção de linfócitos T auxiliares (CD4+) e discreto desvio para um padrão de resposta Th2 no sangue periférico de pacientes diabéticos;
5. A ativação de TLR tem papel mais relevante do que RAGE na regulação da expressão gênica de IL-10, TNF- $\alpha$ , CCL3 e CCR5.

## 7 REFERÊNCIAS\*

1. Andrassy M, Igwe J, Autschbach F, Volz C, Remppis A, Neurath MF, et al. Posttranslationally modified proteins as mediators of sustained intestinal inflammation. *Am J Pathol.* 2006;169:1223-37.
2. Ariza MA, Vimalananda VG, Rosenzweig JL. The economic consequences of diabetes and cardiovascular disease in the United States. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11:1-10.
3. Arya AK, Pokharia D, Tripathi K. Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetic patients with chronic non healing wound. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:377-84.
4. Bahia LR, Araujo DV, Schaan BD, Dib SA, Negrato CA, Leao MP, et al. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian public health system. *Value Health.* 2011;14(5 Suppl 1):S137-40.
5. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. High-glucose--triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 1995;44:1323-7.
6. Berbaum K, Shanmugam K, Stuchbury G, Wiede F, Korner H, Munch G. Induction of novel cytokines and chemokines by advanced glycation endproducts determined with a cytometric bead array. *Cytokine.* 2008;41:198-203.
7. Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol.* 2007;211:273-8.
8. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs.* 2006;7:985-91.
9. Bigl K, Schmitt A, Meiners I, Munch G, Arendt T. Comparison of results of the CellTiter Blue, the tetrazolium (3-[4,5-dimethylthioazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and the lactate dehydrogenase assay applied in brain cells after exposure to advanced glycation endproducts. *Toxicol In Vitro.* 2007;21:962-71.
10. Bouter KP, Meyling FH, Hoekstra JB, Masurel N, Erkelens DW, Diepersloot RJ. Influence of blood glucose levels on peripheral lymphocytes in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1992;19:77-80.
11. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
12. Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *J Dent Res.* 2009;88:503-18.
13. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res.* 2003;92:785-92.
14. 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;335:137-46.
15. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, et al. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol.* 2008;181:4272-8.
16. Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, et al. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol.* 2002;71:433-44.
17. Delamaille M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med.* 1997;14:29-34.
18. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* 2008;88:1254-64.
19. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:578-83.
20. Devaraj S, Tobias P, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine.* 2011;55:441-5.
21. Du XL, Sui GZ, Stockklauser-Farber K, Weiss J, Zink S, Schwippert B, et al. Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia.* 1998;41:249-56.

22. Dworacka M, Winiarska H, Borowska M, Abramczyk M, Bobkiewicz-Kozłowska T, Dworacki G. Pro-atherogenic alterations in T-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients. *Circ J*. 2007;71:962-7.
23. Dytfeld J, Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Jagodzinski PP, Bryl W, Kujawa A. [Expression of chemokine receptor CCR5 in patients with type 2 diabetes]. *Pol Merkur Lekarski*. 2006;20(116):195-8.
24. Ellis SD, Tucci MA, Serio FG, Johnson RB. Factors for progression of periodontal diseases. *J Oral Pathol Med*. 1998;27:101-5.
25. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15:930-9.
26. Fokkema SJ, Loos BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:374-8.
27. Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*. 2004;53:1813-23.
28. Fores JP. Impacto da IL-17A na predisposição do diabetes mellitus tipo 1A. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP; 2010.
29. Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol*. 1996;103:422-8.
30. Gangoiti MV, Cortizo AM, Arnol V, Felice JJ, McCarthy AD. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol*. 2008;600:140-7.
31. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol*. 2001;159:513-25.
32. Graber R, Farine JC, Fumagalli I, Tatti V, Losa GA. Apoptosis and oxidative status in peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients. *Apoptosis*. 1999;4:263-70.
33. Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000*. 2007;45:128-37.
34. Grossi SG, Skrepicinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol*. 1997;68:713-9.
35. Hanifi-Moghaddam P, Kappler S, Seissler J, Muller-Scholze S, Martin S, Roep BO, et al. Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2006;23:156-63.
36. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, Ye S. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2275-81.
37. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes*. 2002;51:159-67.
38. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycosylated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2001;72:774-8.
39. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, Rehman Q, Hasturk H, Apovian CM, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol*. 2011;186:1162-72.
40. Jandeleit-Dahm K, Watson A, Soro-Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes-accelerated atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:329-34.
41. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011;162:1453-69.
42. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Yasuda T, et al. Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. *Diab Vasc Dis Res*. 2008;5:190-7.
43. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol*. 2005;32:40-4.

44. Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol.* 2000;164:2102-9.
45. Khan S, Raghuram GV, Bhargava A, Pathak N, Chandra DH, Jain SK, et al. Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Transl Res.* 2011;158:344-59.
46. Kobayashi H, Nagasawa T, Aramaki M, Mahanonda R, Ishikawa I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 2000;35:319-28.
47. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2010;59:634-43.
48. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med.* 2007;13:625-35.
49. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2000;105:1117-24.
50. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* 2001;123:294-300.
51. Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF, Jackson A, McGlynn K. Calcineurin/nuclear factor of activated T cells and MAPK signaling induce TNF- $\alpha$  gene expression in pancreatic islet endocrine cells. *J Biol Chem.* 2011;286:1025-36.
52. Le J, Lin JX, Henriksen-DeStefano D, Vilcek J. Bacterial lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production: roles of interleukin 1 and interleukin 2. *J Immunol.* 1986;136:4525-30.
53. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1995;22:885-90.
54. Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164:3392-401.
55. 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.
56. Li JT, Hou FF, Guo ZJ, Shan YX, Zhang X, Liu ZQ. Advanced glycation end products upregulate C-reactive protein synthesis by human hepatocytes through stimulation of monocyte IL-6 and IL-1 beta production. *Scand J Immunol.* 2007;66:555-62.
57. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest.* 2004;113:1641-50.
58. Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* 2006;3:351-8.
59. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006;85:510-4.
60. Liu Y, Liang C, Liu X, Liao B, Pan X, Ren Y, et al. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis.* 2010;208:34-42.
61. Lohmann T, Laue S, Nietzschmann U, Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, et al. Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002;51:2474-80.
62. Lorenzi M, Cagliero E. Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. Call for data. *Diabetes.* 1991;40:653-9.
63. 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;105:1005-15.
64. Lutterloh EC, Opal SM, Pittman DD, Keith JC, Jr., Tan XY, Clancy BM, et al. Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection. *Crit Care.* 2007;11:R122.
65. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:127-53.
66. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10679-84.

67. Miyata T, Iida Y, Ueda Y, Shinzato T, Seo H, Monnier VM, et al. Monocyte/macrophage response to beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products. *Kidney Int.* 1996;49:538-50.
68. Nah SS, Choi IY, Lee CK, Oh JS, Kim YG, Moon HB, et al. Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:425-31.
69. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007;581:1928-32.
70. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, et al. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes.* 2001;50:1472-81.
71. Neepner M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992;267:14998-5004.
72. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest.* 2001;108:1853-63.
73. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23:3-13.
74. Pertynska-Marczewska M, Kiriakidis S, Wait R, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM. Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. *Cytokine.* 2004;28:35-47.
75. Pflieger C, Kaas A, Hansen L, Alizadeh B, Hougaard P, Holl R, et al. Relation of circulating concentrations of chemokine receptor CCR5 ligands to C-peptide, proinsulin and HbA1c and disease progression in type 1 diabetes. *Clin Immunol.* 2008;128:57-65.
76. Rajasingh J, Bord E, Luedemann C, Asai J, Hamada H, Thorne T, et al. IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. *FASEB J.* 2006;20:2112-4.
77. Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, et al. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol.* 2005;78:167-77.
78. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L. Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2009;80:1166-73.
79. Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone.* 2010;46:1122-30.
80. Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Vieira AE, Silveira EM, Avila-Campos MJ, da Silva JS, et al. Dose-Response Met-RANTES Treatment of Experimental Periodontitis: A Narrow Edge between the Disease Severity Attenuation and Infection Control. *PLoS One.* 2011;6:e22526.
81. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontol.* 1998;33:212-25.
82. Santos MCD. Avaliação das populações de linfócitos produtores de IFN-G e IL-17 em pacientes sépticos e relação com o desfecho clínico. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP; 2010.
83. Schmitt A, Bigl K, Meiners I, Schmitt J. Induction of reactive oxygen species and cell survival in the presence of advanced glycation end products and similar structures. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:927-36.
84. Sharifi AM, Hoda FE, Noor AM. Studying the effect of LPS on cytotoxicity and apoptosis in PC12 neuronal cells: role of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression. *Toxicol Mech Methods.* 2010;20:316-20.
85. Sharma V, Xu M, Ritter LM, Wilkie NM. HIV-1 tat induces the expression of a new hematopoietic cell-specific transcription factor and downregulates MIP-1 alpha gene expression in activated T-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;223:526-33.
86. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:3015-25.

87. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:367-88.
88. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:739-45.
89. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2001;28:306-10.
90. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:281-6.
91. Su XD, Li SS, Tian YQ, Zhang ZY, Zhang GZ, Wang LX. Elevated serum levels of advanced glycation end products and their monocyte receptors in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res.* 2011;42:596-601.
92. Surendar J, Mohan V, Rao MM, Babu S, Aravindhan V. Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). *Diabetes Technol Ther.* 2011;13:477-82.
93. Szebeni A, Schloot N, Kecskemeti V, Hosszufalusi N, Panczel P, Prohaszka Z, et al. Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408. *Inflamm Res.* 2005;54:415-9.
94. Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, et al. Advanced glycation end products subtypes-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330:89-98.
95. Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res.* 2000;79:1548-55.
96. Tam XH, Shiu SW, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ, Tan KC. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2011;120:81-9.
97. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011;38:219-28.
98. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, et al. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem.* 2004;324:68-78.
99. van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:792393.
100. Veloso CA, Fernandes JS, Volpe CM, Fagundes-Netto FS, Reis JS, Chaves MM, et al. TLR4 and RAGE: Similar routes leading to inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 2011;37:336-342.
101. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009;15:921-9.
102. 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;283:27255-69.
103. Yamada S, Oikawa Y, Sakai G, Atsumi Y, Maruyama T, Shimada A. Expression levels of CXC chemokine receptors 3 are associated with clinical phenotype of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1079:186-9.
104. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med.* 2009;87:235-47.
105. Zagariya A, Mungre S, Lovis R, Birrer M, Ness S, Thimmapaya B, et al. Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2815-24.

## 8 Anexo

### Anexo 1A

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa



# Certificado

**Certificamos** que o projeto de pesquisa intitulado **"EFEITO DA PEROXIDAÇÃO DE LÍPIDES, ASSOCIADO OU NÃO À GLICAÇÃO DE PROTEÍNA, SOBRE A SINALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATORIOS"**, sob o protocolo nº 35/09, de responsabilidade do Pesquisador (a) **SILVANA REGINA PEREZ ORRICO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 2 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

**Certify** that the research project titled **"THE ROLE OF LIPID PEROXIDATION, AND ITS ASSOCIATION WITH PROTEIN GLYCATION ON SIGNALING AND EXPRESSION OF INFLAMMATORY CYTOKINES"**, protocol number 35/09, under Dr. **SILVANA REGINA PEREZ ORRICO**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAR-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 06 de novembro de 2009.

*MMS Nagle*  
Prof. Dr. Mauricio Meirelles Nagle  
Coordenador

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

Araraquara, 26 de março de 2012.

Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli