



MARCELL COSTA DE MEDEIROS

Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B

ARARAQUARA

2012



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

MARCELL COSTA DE MEDEIROS

Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38

MAPK e NF-kB

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE PERIODONTIA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ODONTOLOGIA.

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

**ARARAQUARA
2012**

Medeiros, Marcell Costa de

Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF-kB / Marcell Costa de Medeiros.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

96 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Doenças periodontais 2. Diabetes Mellitus 3. Imunidade inata
4. Imunidade adaptativa 5. Produtos finais de glicosilação I. Título

MARCELL COSTA DE MEDEIROS

Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF-kB

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

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

3º Examinador: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'ana

Araraquara, 29 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

MARCELL COSTA DE MEDEIROS

NASCIMENTO	28 DE MARÇO DE 1987
FILIAÇÃO	Maria de Lourdes Costa de Medeiros Arnaldo Costa de Medeiros
2005-2009	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
2010-2012	Pós-graduação em Odontologia – Área de Periodontia – Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedicatória

A **Deus** por estar sempre presente nas horas mais difíceis, me fornecendo a força necessária diante das adversidades para que eu pudesse seguir sempre em frente.

Aos meus pais **Arnaldo** e **Maria de Lourdes** pelos ensinamentos passados ao longo da minha criação, sem os quais não teria despertado para buscar a maior riqueza que o ser humano pode possuir: o conhecimento.

Ao meu irmão **Arnaldo Júnior** pelo exemplo de companheirismo e integridade. Vivenciamos grande momentos juntos, e ao saber da distância que nos separaria não deixou de me dar o suporte necessário.

À minha namorada **Mariela** pelo estímulo, paciência e dedicação nos momentos que mais precisei. Sem o seu apoio constante nada disso seria possível. Recompensarei a minha ausência com o meu eterno amor.

À minha **Família** que me forneceu a base para os valores que agreguei ao longo do tempo e levo comigo onde quer que eu vá.

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela paciência que me transmite seus ensinamentos. Sem dúvida uma das pessoas mais

inteligentes e humildes que já convivi. Minha admiração e gratidão serão eternas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimentos

À minha primeira orientadora Prof^a Dr^a Ana Miryam, pelo incentivo e estímulo a odontologia e pesquisa, sem os quais não poderia estar trilhando esse caminho. Exemplo de honestidade e dedicação, foi com a senhora que aprendi meus primeiros valores no meio acadêmico.

À minha grande orientadora Prof^a Dr^a Lélia Batista por ter confiado no meu trabalho e me ter passado tantos ensinamentos que levo até hoje. O seu conhecimento me estimulou a buscar sempre o melhor.

À minha dedicada orientadora Prof^a Dr^a Delane Rego por ter mostrado a verdadeira e encantadora face da periodontia, se mostrando sempre solícita aos meus anseios e desejos. Nunca vou me esquecer o que a senhora fez por mim.

Aos demais professores, como a Prof^a Auliadora Nesi, amigos e funcionários do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como Gustavo, Denise, Fernanda Amorim, Danielle, que de alguma forma contribuíram nesse período que estive aqui.

À minha madrinha Ana Almira por todo o incentivo e carinho dado ao longo de toda minha vida.

Aos meus amigos do Colégio Marista de Natal: Renato, Marcus, Arthur, Eduardo Leite, Eduardo Elali, Aderson, Leonardo Siqueira, Leonardo Medeiros, Samua, Suzanna, Rafael Galego, Stefano, Felipe, Luiz Paulo e demais que aqui não foram citados, por todo o apoio dado

nos momentos mais difíceis e pela amizade constante. Levarei vocês por toda minha vida.

Aos meus amigos de Mestrado e Doutorado da Foar-UNESP: Sabrina, João Antonio, João Paulo, Morgana, Fausto, Rafael Molon, Luiz Guilherme, Guilherme, Lucas, Fabiana, Giovana, Lívia Finoti, Fernanda, Felipe, Livia Perussi, Rafael Nepomuceno, Pablo, Nicolau, Alliny, Andressa, Leila, Rubinho e todos os demais, pelos momentos compartilhados, ensinamentos e companheirismo. Tenham certeza que vocês contribuíram de alguma forma para meu crescimento.

Aos meus primos-irmãos Márcia, Marcos, Mayara, Vinícius, Amanda e todos os demais, pelo suporte, atenção e carinho dado principalmente ao longo desses dois anos.

Aos amigos potiguares de Araraquara Sergei, Marília, Alexandre, Beatriz e Norberto pela alegre convivência e ajuda que sempre estiveram dispostos a me dar.

Aos Funcionários e Funcionárias da Foar-UNESP que sempre me ajudaram no necessário: Maria José, Maria do Rosário, Regina Lúcia, Leandro, Esther, Mara, Alexandre e todos os outros.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Claudio Martins Segala e sua Vice-Diretora, Prof.^a Dr.^a Andréia Affonso Barretto Montandon, pelas condições para realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho.

Aos docentes da disciplina de Periodontia: Adriana Marcantonio,
Carlos Rossa Júnior, Élcio Marcantonio Júnior, Joni Augusto Cirelli, José
Eduardo Cezar Sampaio e Silvana Regina Perez Orrico pelos
ensinamentos passados ao longo desses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
CAPES, e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo,
FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e auxílio de pesquisa
respectivamente.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	23
REVISÃO DA LITERATURA.....	27
PROPOSIÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODO.....	44
RESULTADO.....	53
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – Produtos finais de glicação avançada.

AGE-BSA – Produtos finais de glicação avançada derivado de BSA

AP-1 – Proteína adaptadora 1

ASK1 – Kinase reguladora de sinal de apoptose 1

BSA – Albumina sérica bovina

CCL3 – Proteína inflamatória de macrófago 1-alfa

CCR1 – Receptor de quimiocina 1

CCR5 – Receptor de quimiocina 5

ERK – kinase regulada por sinais extracelulares

IFN- γ - Interferon gama

IKK γ /NEMO – Complexo Modulador essencial de NF-kB/kinase I κ B gama

IKK α – Kinase I κ B alfa

IKK β – Kinase I κ B beta

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-23 – Interleucina 23

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IRAK1 – Receptor de Interleucina-1 associado a kinase 1

IRAK4 – Receptor de Interleucina-1 associado a kinase 4

JNK – Kinase N-terminal c-Jun

LTB4 – Leucotrieno B4

M1, M2 – Perfil de polarização de macrófagos

MAPKs – Kinases protéicas ativadas por mitógenos

MEKK2/3 – Proteína kinase kinase kinase ativada por mitogeno 2/3

MyD88 – Gene mielóide de diferenciação da resposta primária 88

NF-Kb – Fator nuclear kappa B

P38 MAPk – Kinase protéica ativada por mitogenos p38

P50/p65 – Subunidades protéicas formadora de NF-kB

PBMCs – Células sanguíneas periféricas mononucleares

PMA - Forbol 12-miristato 13-acetato

RAGE – Receptor de produtos finais de glicação avançada

RIP1 – Receptor interagindo com proteína kinase 1

TAK1 – kinase transformante de fator de crescimento β ativado 1

Th1 – Célula T auxiliar tipo 1

Th2 – Célula T auxiliar tipo 2

TLR3,4,5,6,7,8,9 – Receptor semelhante a *toll* 3,4,5,6,7,8,9

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – Receptor associado ao factor 6

TRIF – Dominio TIR contendo adaptador de indução de interferom- β

RESUMO

Medeiros MC. Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

O diabetes está associado à maior susceptibilidade à infecções e sepsis, demonstrando uma influência desta condição sobre a resposta imune. A doença periodontal é um tipo de infecção crônica, modulada pela resposta imune que apresenta maior prevalência e severidade em pacientes diabéticos. Nosso objetivo foi avaliar um possível sinergismo entre os receptores RAGE e TLR4 na modulação da proliferação celular, atividade metabólica, apoptose e expressão de citocinas inflamatórias em células da resposta imune inata e adaptativa. Como objetivo secundário, avaliamos o papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B na expressão dos genes inflamatórios por estas células após estimulação de RAGE e TLR4. Linhagens de células humanas de linfócitos T (JM) e monócitos (U937) foram estimulados com LPS e AGE-BSA tanto de forma independente como associados. A estimulação foi realizada também na presença e na ausência de inibidores bioquímicos para p38 MAPK (SB203580) e NF- κ B (Bay 11-7082). A proliferação celular foi determinada por ensaio de exclusão azul de trypan, a apoptose pela via intrínseca e atividade metabólica foi avaliada por um ensaio bioquímico da função

mitocondrial, a expressão de citocinas foi estudada por RT-PCR e RT-qPCR e a ativação das vias de sinalização de interesse pelos estímulos utilizados foi investigada através de Western blotting. LPS e AGE-BSA não influenciaram a proliferação e sobrevivência celular de monócitos e linfócitos T após 24, 48 e 72 h. LPS, isoladamente ou associado a AGE, induziu a expressão de IL-6 e TNF- α em monócitos e células T, respectivamente. A ativação de p38 MAPK, mas não de NF- κ B, foi necessária para a indução por LPS e LPS/AGE de IL-6 e TNF- α por LPS, isolado ou associado a AGE. A expressão de RNAm de RAGE foi detectada em ambos os tipos de células. RNAm de CCL3 foi expresso de forma mais marcante em monócitos, particularmente após estimulação com LPS. Não houve sinergismo na sinalização entre RAGE e TLR4 na modulação da expressão de IL-6, TNF- α , RAGE, CCR5 e CCL3 por monócitos e células T.

Palavras Chaves: Doenças Periodontais, Diabetes Mellitus, Imunidade Inata, Imunidade Adaptativa e Produtos Finais de Glicação Avançada.

ABSTRACT

Medeiros MC. Modulation of cell proliferation, survival and gene expression of inflammatory mediators by RAGE and TLR signaling in cells of the innate and adaptive immune response: role of p38 MAPK and NF-KB. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

Diabetes is associated to increased susceptibility to infections and sepsis, indicating that this condition modulates the immune response. Periodontal disease is one type of chronic infection, which is modulated by the immune response and presents with increased prevalence and severity in diabetic patients. Our objective was to evaluate a possible synergism between RAGE and TLR4 signaling on the modulation of cell proliferation, metabolic activity, apoptosis and gene expression of inflammatory cytokines by cells of the innate and adaptive immune response. As a secondary objective, we assessed the role of p38 MAPK and NF-kB signaling pathways on the expression of the inflammatory genes by these cells after stimulation of RAGE and TLR4. Human cell lines of T lymphocytes (JM) and monocytes (U937) were stimulated with LPS and AGE-BSA both independently and associated. Stimulation was also performed in the presence and absence of biochemical inhibitors for p38 MAPK (SB203580) and NF-kB (Bay 11-7082). Cell proliferation was determined by trypan blue dye exclusion assay, apoptosis by the intrinsic pathway and metabolic activity were assessed by a biochemical assay of

the mitochondrial function, cytokine gene expression was studied by RT-PCR and RT-qPCR and the activation of the selected signaling pathways after RAGE and TLR4 activation was investigated by Western blotting. LPS and AGE-BSA did not influence cell proliferation and survival 24, 48 and 72 h after stimulation. LPS, alone or associated with AGE-BSA, induced expression of IL-6 and TNF- α mRNA by monocytes and T cells, respectively. Activation of p38 MAPK, but not of NF- κ B, was required for LPS and LPS/AGE-induced induction of IL-6 and TNF. RAGE mRNA expression was detected in both cell types. CCL3 mRNA expression levels were higher in monocytes upon stimulation with LPS. There was no synergism between RAGE and TLR4 signaling on the expression of IL-6, TNF- α , RAGE, CCR5 and CCL3 by monocytes and T cells.

Key-words: Periodontal Disease, Diabetes Mellitus, Innate Immunity, Acquired Immunity and Advanced Glycosylation End Products.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

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

Estudos globais apontam uma prevalência de diabetes de 9.8% na população masculina, e de 9.2% para a feminina, com cerca de 346 milhões de pessoas acometidas. Destes, 40% (por volta de 138 milhões) das pessoas com diabetes estão distribuídos na China e Índia, 10% (cerca de 36 milhões) nos EUA e Rússia, e 12% (em torno de 42 milhões) no Brasil, Paquistão, Indonésia, Japão e México¹³. Trabalhos que fazem projeções do quadro de diabetes no mundo para 2030 estipulam um aumento de 7,7 % , ou seja, cerca de 439 milhões de casos. É esperado também para 2030 um aumento de 69% da população adulta com diabetes nos países em desenvolvimento ⁷⁰. Diabetes e suas complicações representam uma das principais causas de mortalidade ⁶⁶ e morbidade nos EUA ¹⁷, com custos econômicos associados às despesas de assistência médica e redução da capacidade produtiva destes pacientes na ordem de US\$ 174 bilhões em 2007 ¹.

Estudos prospectivos calculam ainda um gasto por volta de US\$ 490 bilhões em todo o mundo em 2030 relacionados ao diabetes ⁹¹. As complicações cardiovasculares associadas ao diabetes representam a principal causa de mortalidade nestes pacientes ⁵¹. De fato, a presença de

diabetes não apenas é considerada um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, como também amplifica o risco associado a outros fatores de risco clássicos, como a hipertensão, fumo e hipercolesterolemia ^{73, 84}, ainda que os mecanismos biológicos para esta relação não sejam completamente conhecidos ⁷⁴. Especificamente em relação às doenças periodontais, existem abundantes evidências epidemiológicas indicando maior severidade e extensão de destruição periodontal em pacientes com diabetes, sendo a doença periodontal considerada uma das complicações 'clássicas' ^{24, 39}.

A relação causal entre a presença do diabetes e estas complicações é demonstrada por estudo de intervenção longitudinal com mais de 25 anos de acompanhamento, em que o melhor controle metabólico resultou em significativa redução da incidência de complicações microvasculares e neurológicas ³⁵. De forma similar, pacientes portadores de diabetes com melhor controle metabólico não apresentam maior severidade de doença periodontal em comparação a pacientes não diabéticos ⁷⁷; e a resposta ao tratamento periodontal nestes pacientes também é similar a de pacientes sem diabetes, indicando que as funções do sistema imune são normalizadas com o controle metabólico ⁸. A relação diabetes-resposta imune é complexa e recíproca, com diversas possibilidades de convergência das vias metabólica e inflamatória em múltiplos níveis ²⁶. Por exemplo, a resposta imune tem papel etiológico no diabetes tipo 1, que é uma condição resultante do

ataque de linfócitos T às células beta produtoras de insulina do pâncreas⁴³, e possivelmente no diabetes tipo 2 em que níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios como IL-6 e proteína C-reativa são associados a maior risco de desenvolvimento do diabetes⁶⁰.

Por outro lado, a presença de diabetes também modula a resposta imune, como demonstrado pela menor resistência à infecção nesses pacientes⁵⁹ e pela inibição da função de polimorfonucleares na resposta imune inata¹⁵. Reciprocamente, a resposta imune/inflamatória pode inibir eventos moleculares relacionados à atividade biológica da insulina, exercendo um papel crucial no metabolismo da glicose²⁶.

Em resumo, estas informações indicam a existência de uma importante inter-relação entre o diabetes e a resposta imune, a qual exerce um papel crucial nas complicações associadas ao diabetes.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Regulação recíproca entre o eixo AGE/RAGE e a resposta imune: NF- κ B e MAPKinases como vias de sinalização envolvidas nos dois 'braços' desta regulação

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*, AGEs). Estes AGEs podem exercer inúmeros efeitos biológicos e seu acúmulo foi demonstrado em rins ⁵⁷, placas ateroscleróticas ²⁰, coração ⁴ 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 afetar o controle da glicemia ¹⁹. 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 ⁵³. 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 ³, além de servir como receptor de adesão de leucócitos a 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 gengival de pacientes com diabetes³⁴.

A expressão do RAGE em células imunes também é detectada em trabalhos na literatura. A avaliação de monócitos frente a presença de AGEs desencadeou a expressão desse receptor e a ativação de vias inflamatórias importantes associadas ao NF- κ B^{2, 56}. O eixo RAGE-AGE está presente ainda em macrófagos, como no estudo de Xu et al onde a inibição de RAGE resultou em uma resposta inflamatória atenuada⁸⁷. Linfócitos T também expressam em sua superfície o RAGE, como descrito no estudo em que foi avaliada a expressão gênica desse receptor⁶. 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 doença⁴⁰. 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- κ B) 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 p38³¹. A expressão de RAGE é induzida pela ativação de NF- κ B, criando um 'loop' de regulação positiva que aumenta a resposta inflamatória⁴⁵. Estas informações sugerem que o sinal gerado pela ativação de RAGE e TLR 'converge' nas mesmas vias de sinalização intracelular, as quais tem papel tanto na imunidade inata quanto adaptativa^{44, 46} (Figura 1).

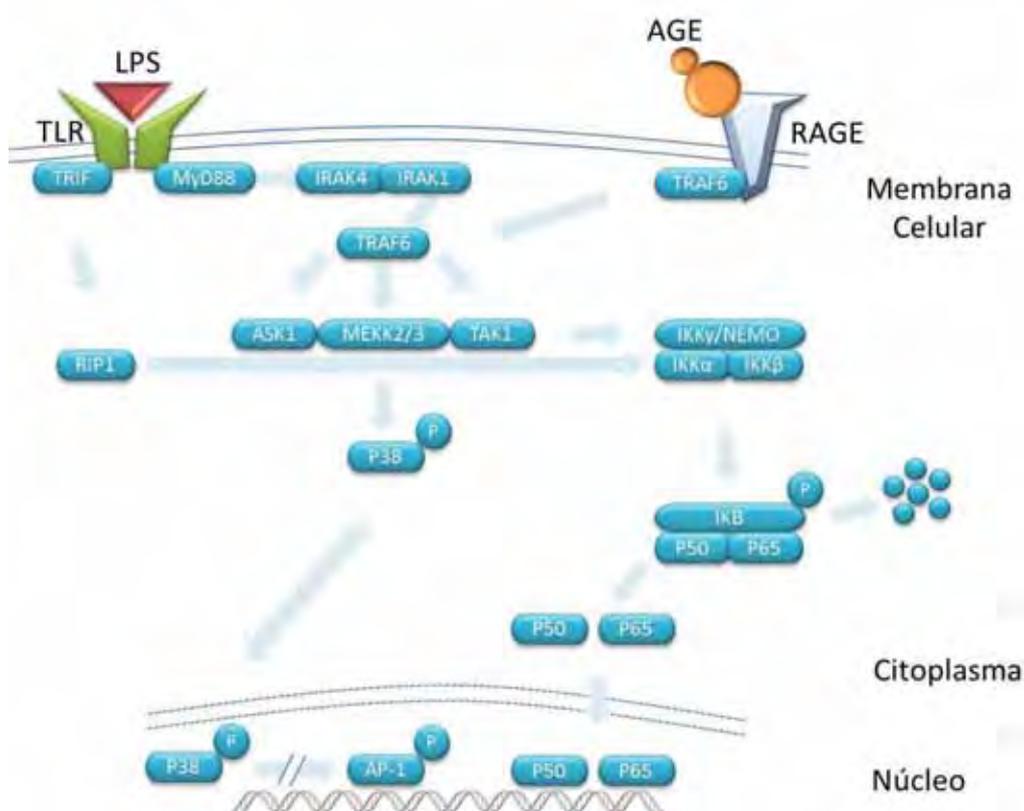


FIGURA 1 - Vias de sinalizações resultantes da ativação dos receptores TLR e RAGE. Ativação das vias p38 e NF- κ B nos receptores TLR se dá principalmente através das proteínas MyD88 ou TRIF. Quando depende de MyD88, a ativação de IRAK 1 por IRAK 4 irá induzir autofosforilação de IRAK 1 que resultará no recrutamento de TRAF 6 levando a ativação dos precursores da via de p38(ASK1, MEKK2/3 e TAK1) e NB- κ B (IKK γ /NEMO). Na via dependente de TRIF nos receptores TLR irá causar o recrutamento de outra proteína, a RIP, ativando a via de NF- κ B. A ativação do receptor RAGE irá recrutar diretamente o TRAF e os acontecimentos seguintes são semelhantes a ativação via TLR.

Imunidade inata e diabetes: papel na etiologia, complicações associadas e possível sinergismo com a sinalização via TLRs

A resposta frente a estímulos exógenos e a auto antígenos envolve a ativação das duas vias de defesa do hospedeiro: a resposta imune inata, que tem como função primária o reconhecimento imediato do agente agressor, e a resposta imune adaptativa ¹⁴.

O estabelecimento do diabetes tipo 2 está relacionado à obesidade e à um estado crônico de inflamação basal com aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-6, por macrófagos presentes nos tecidos adiposos. Este estado 'hiperinflamatório' eventualmente resulta no desenvolvimento de resistência à insulina e hiperglicemia^{68, 81}. A ativação dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 (*activating protein 1*) tem papel fundamental na regulação da expressão gênica destes mediadores inflamatórios, por meio da ativação das MAPKinases e da própria via NF-kB.

Este estado de inflamação crônica associado ao início do diabetes tipo 2 é associado à polarização do perfil de citocinas expresso pelos macrófagos em direção à um perfil conhecido como M1, caracterizado por elevada expressão de IL-12, IL-23, IL-6, TNF- α , IL-1 β e baixa expressão de IL-10, ao contrário dos macrófagos 'M2', de perfil reparativo e 'anti-inflamatório' caracterizado por reduzida expressão de IL-12, IL-23 e aumento da expressão de receptores do tipo 'scavenger' (por ex., receptor de manose 1, dectin 1) capazes de reconhecer e mediar

a fagocitose de diversas moléculas endógenas e exógenas, além do aumento da expressão de fibronectina, envolvida em adesão e migração celular em processos reparativos e de coagulação. Estes macrófagos M2 são induzidos por citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-10, e mediadores anti-inflamatórios como os glicocorticóides^{22, 49}. Este fenótipo é mantido no diabetes estabelecido num mecanismo semelhante à retroalimentação positiva, uma vez que estes macrófagos 'M1' contribuem na indução e manutenção de uma resposta imune adaptativa de perfil Th1, caracterizada por elevada expressão de IFN- γ , IL-12 e TNF- α ⁵⁰. Tanto citocinas inflamatórias derivadas dos próprios macrófagos e de linfócitos Th1, como IFN- γ e TNF- α , quanto a ativação de TLR por LPS bacteriano induzem a polarização de monócitos/macrófagos para um perfil hiperinflamatório M1.

Assim, a resposta imune inata caracterizada por um perfil inflamatório tem papel importante no estabelecimento do diabetes e também na modulação da imunidade adaptativa, polarizando o padrão de resposta celular. É interessante destacar que a imunidade inata, via sinalização por TLRs (em especial TLR4), pode ter um importante papel no estabelecimento do diabetes e no desenvolvimento das complicações associadas. A sinalização via TLR exerce importante papel na mediação dos efeitos inflamatórios de ácidos graxos saturados, uma vez que sua deleção inibe a expressão de genes inflamatórios induzida por estes lipídeos⁵⁵.

Chemokine receptor 5 (CCR5) foi inicialmente reconhecido como um co-receptor utilizado pelo vírus HIV para entrada na 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 ³², uma das complicações clássicas do diabetes. 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 ⁶⁵.

Chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3) também conhecida como proteína inflamatória de macrófago 1-alfa (MIP-1 α) interage com os receptores de quimiocinas CCR1 e CCR5, sendo produzida primariamente por monócitos e linfócitos T CD4+ ativados ⁶⁹. CCL3 tem função quimiotática para monócitos e linfócitos, com elevada expressão em sítios inflamados ⁴², inclusive no fluido gengival de pacientes com doença periodontal em comparação ao fluido de pacientes periodontalmente saudáveis ⁷⁸. 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+ e CCR5+. No entanto, neste mesmo estudo o fato de animais geneticamente deficientes em CCL3 apresentarem severidade de doença periodontal semelhante a 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 ⁶⁴ 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- α e leucotrieno B4 (LTB4) ⁶², indicando que esta quimiocina tem papel tanto na modulação da resposta imune inata quanto adaptativa, daí o interesse em avaliar sua modulação em resposta à ativação dos eixos AGE/RAGE e LPS/TLR4 em células da resposta imune inata (monócitos) e adaptativa (linfócitos).

Receptores de padrões moleculares semelhantes à Toll (TLRs) são proteínas trans-membrana caracterizadas por um domínio extracelular rico em leucina (LRR, *Leucine-rich repeat*) e um domínio citoplasmático semelhante ao do receptor da IL-1 (TIR, *Toll/IL-1R domain*). Sua classificação é dividida em dois grupos de acordo com a sua localização na célula. O grupo expresso na superfície celular inclui: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 que são capazes de reconhecer componentes microbianos, principalmente do envelope bacteriano. TLR3,

TLR7, TLR8 e TLR9 representam o grupo dos receptores expressos em vesículas intracelulares, em especial os lisossomos. Os TLRs lisossomais reconhecem uma ampla variedade de ácidos nucléicos microbianos. Esses receptores ativam vias de sinalizações distintas, dependentes do tipo celular, para o estabelecimento de uma resposta celular adequada à natureza e intensidade do estímulo^{52, 72}.

A interação RAGE-AGE é percebida também em linfócitos T. Estudos em modelo animal *knockout* para RAGE demonstram que essa via é de suma importância para ativação e diferenciação de linfócitos T, tanto frente a antígenos alógenos como a autoantígenos^{6, 52}.

Imunidade adaptativa e diabetes: papel na etiologia, complicações associadas e possível sinergismo com a sinalização via TLRs

A modulação da resposta adaptativa, em especial a ativação diferencial e polarização da resposta de linfócitos T é associada as diversas doenças inflamatórias, incluindo o diabetes⁷⁶, ainda que a literatura seja escassa em estudos especificamente relacionados ao diabetes tipo 2, alguns trabalhos demonstram que a polarização da resposta de células T influencia o início e desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade⁵⁸. O perfil hiperinflamatório associado ao diabetes inclui o aumento da produção de IL-8 e redução da produção de IL-10 por linfócitos B de pacientes com diabetes tipo 2³⁰. 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 diabéticos¹⁶

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. Entre as evidências para este desvio do padrão de resposta está a reduzida presença de células T regulatórias (Tregs, o 'freio' natural da inflamação na resposta adaptativa) no tecido adiposo de animais com resistência à insulina associado à obesidade, em comparação ao número de Tregs no tecido adiposo de animais com peso normal. O papel destas Tregs no desenvolvimento de resistência a insulina por meio da diminuição da inflamação foi confirmado com a transferência de Tregs expandidas *in vitro*¹⁸. 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 insulina⁸⁶, demonstrando a relevância da imunidade adaptativa, em especial do perfil de resposta e polarização de linfócitos T para o diabetes. De forma interessante, um estudo preliminar em pacientes morbidamente obesos portadores de diabetes tipo 2 submetidos a cirurgia bariátrica para redução de peso, relatou significativa alteração na presença de linfócitos Th1/Th2, enquanto as proporções de monócitos e a relação de linfócitos T auxiliares/citotóxicos não foram

alteradas, sugerindo modulação funcional da resposta imune com a redução do acúmulo lipídico⁸⁰.

Além da influência da obesidade, o uso de bloqueadores adrenérgicos para controle de hipertensão e glicemia em pacientes com diabetes tipo 2 também produziu significativas alterações no perfil de polarização de linfócitos T no sangue periférico, em paralelo a melhoria do controle metabólico⁴⁸. Neste estudo, os autores relatam aumento na proporção de Tregs e redução da proporção de linfócitos T auxiliares e citotóxicos ativados (CD4+/CD69+ e CD8+/CD69+), respectivamente, demonstrando que o estado de ativação da resposta imune tem correlação com o controle metabólico do diabetes tipo 2.

Em pacientes portadores de diabetes tipo 2 são encontrados maiores níveis plasmáticos de IL-6, IL-1 β e TGF- β , citocinas capazes de induzir a polarização da resposta de linfócitos T para o padrão hiperinflamatório Th17. De fato, estudo recente²⁹ demonstrou maior prevalência de linfócitos Th17 no sangue periférico de pacientes portadores de diabetes tipo 2. Além disso, o estímulo dos linfócitos T de pacientes portadores de diabetes tipo 2 com fitohemaglutinina (mitógeno) resultou em maior produção de IL-17, porém este aumento na produção só ocorreu com a presença de monócitos em cultura, indicando que a modulação da resposta dos linfócitos T pela imunidade inata, provavelmente por meio das citocinas IL-1 β , IL-6 e outros mediadores derivados dos monócitos, é necessária para a polarização da resposta Th17.

Estes dados indicam que a imunidade adaptativa requer o 'braço' da imunidade inata para ser ativada. De fato, a distinção didática entre imunidade inata e adaptativa não existe e a resposta imune deve ser entendida como um contínuo, uma reação do hospedeiro se ajustando constantemente à presença de diferentes condições externas. Os mecanismos e sinalização intracelular da resposta imune inata não são "desligados" com a ativação da resposta adaptativa, mas sim "suplementados" pela última. Por outro lado, células da resposta imune adaptativa também expressam PRRs e respondem à MAMPs, o que enfatiza ainda mais a interação dinâmica entre os dois "braços" da resposta imune.

Em linfócitos T, demonstrou-se que ativadores de TLR modulam a expressão de receptores de co-estimulação (tais como CD28, CD69 e CD152), aumentam a proliferação celular e produção de IFN- γ , sugerindo que os micróbios e seus MAMPs também podem exercer papel funcional direto na regulação da imunidade adaptativa^{5, 71}. Isto é especialmente importante de se perceber no contexto da doença periodontal, a qual é uma condição inflamatória crônica e, como tal, apresenta um denso infiltrado linfocitário, bem como em relação ao diabetes, uma condição metabólica caracterizada por aumento da atividade inflamatória e redução da resistência as infecções.

Estas informações indicam as possíveis interações entre os eixos AGE-RAGE e TLR na resposta imune inata e adaptativa, e este

estudo tem o objetivo de avaliar um possível sinergismo resultante da ativação simultânea destas vias em células da resposta imune inata e adaptativa.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

A hipótese geral deste estudo é que a ativação simultânea de RAGE e TLR em células da resposta imune inata e adaptativa resulta em efeito sinérgico na modulação de parâmetros de biologia celular. Para testar a hipótese descrita acima, propomos os seguintes estudos:

- 1) Determinar os efeitos do eixo AGE/RAGE e da sinalização via TLR na proliferação e morte celular de monócitos e linfócitos T.***
- 2) Descrever os efeitos do eixo AGE/RAGE no perfil de citocinas inflamatórias expressas em resposta à ativação de TLR por monócitos e linfócitos.***
- 3) Avaliar a influência do eixo AGE/RAGE na ativação das vias de sinalização intracelular relacionadas à expressão das citocinas inflamatórias induzidas pela ativação de TLR.***

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e manutenção das linhagens celulares

Obtivemos linhagens celulares de linfócitos T (JM/Jurkat) e monócitos (U937) humanos junto a colaboradores (Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva, Depto de Biologia Celular e Agentes Biopatogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e Dra. Gunhild Sommer, Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina-MUSC, Charleston, SC, USA; respectivamente). Por se tratar de linhagens de células imortalizadas amplamente utilizadas no meio científico por mais de 30 anos, e não envolver animais e humanos, não houve necessidade de submissão à comite de ética em pesquisa para utilização das mesmas (Anexo 1).

As linhagens celulares foram mantidas de forma apropriada, em RPMI com elevada concentração de glicose, reduzida concentração de bicarbonato de sódio (1,5 g/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, à 37°C em atmosfera umedecida de ar e 5% de CO₂.

Previamente aos estímulos as células foram rotineiramente desinduzidas em meio de cultura apropriado suplementado com 0.3%/1% de FBS por um período mínimo de 8 h. Esta desindução teve a finalidade de evitar possíveis influências de componentes do soro fetal bovino resistentes à inativação pelo calor (imunoglobulinas, componentes do sistema

complemento) e também proporcionar uma melhor sincronização do ciclo celular.

Preparo da albumina sérica glicada (AGE-BSA)

A albumina sérica bovina – fração V (BSA) foi diluída em uma 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 (+ 4C) após confirmação da glicação por avaliação da absorbância em 405 nm em espectrofotômetro e verificação de absorbâncias acima de 3.0 nas amostras de AGE-BSA e inferior a 0.1 nas amostras de BSA-controle.

Quadro 1 - Distribuição dos tratamentos para as amostras JM e U937. Todos os tratamentos indicados em '**estímulo**' foram realizados na presença e na ausência dos '**inibidores**'

<i>Experimento</i>	<i>Estímulo (concentração)</i>	<i>Inibidores (concentração)</i>	<i>Quantidade de células</i>	<i>Períodos</i>
Proliferação e morte celular	- Controle (PBS) - Doxorubicina (10 uM) - LPS - <i>E. coli</i> (100 ng/mL) - BSA Controle (200 µg/mL) - AGE-BSA (200	- SB203580(10 µM) - Bay 11-7082(10 µM)	5 x 10 ⁵ células/mL em placas de 48 poços (0,5 mL/poço)	24, 48, 72 h

	<p>µg/mL) - LPS+AGE-BSA</p>			
Ensaio MTS	<p>- Controle (PBS) - Doxorubicina (10 µM) - LPS - <i>E. coli</i> (100 ng/mL) -BSA Controle (200 µg/mL) - BSA-AGE (200 µg/mL) - LPS+AGE-BSA</p>	<p>- SB203580(10 µM) - Bay 11-7082(10 µM)</p>	<p>1 x 10⁶ céls/mL - placas de 96 poços (0.1 mL/poço)</p>	<p>24, 48, 72 h</p>
RT-PCR e RT-qPCR	<p>- controle (PBS) - Doxorubicina (10 µM) - LPS - <i>E. coli</i> (100 ng/mL) -BSA Controle(200 µg/mL) - BSA-AGE (200 µg/mL) - LPS+BSA - PMA (phorbol myristate acetate) (10 µM)</p>	<p>- SB203580(10 µM) - Bay 11-7082(10 µM)</p>	<p>1 x 10⁶ células/mL em placas de 48 poços (1 mL/poço)</p>	<p>6 hs</p>
Western Blot	<p>- Controle (PBS) - BSA Controle (200 µg/mL) - LPS - <i>E. coli</i> (100 ng/mL) - BSA-AGE (200 µg/mL) - LPS+BSA</p>		<p>2 x 10⁶ céls/mL - placas de 12 poços (1 mL/poço)</p>	<p>10 min</p>

Viabilidade e proliferação celular

A viabilidade celular foi avaliada por dois métodos e os estímulos consistiram de um controle negativo (PBS), BSA controle (não glicado), BSA-AGE (200 µg/mL), LPS - *E. Coli* (100 ng/mL), BSA-AGE + LPS na ausência e presença de inibidor de P38 - SB203580 (10 µM) e inibidor de Nf-kB - Bay 11-7082(10 µM) e um controle positivo para morte celular

Doxirrubicina (10 uM), como descrito no Quadro 1. O primeiro corresponde ao método de colocação por azul de trypan (Número cat. 15250-061, Invitrogen), onde o mesmo é responsável pela coloração de células onde não exista mais continuidade da parede celular, caracterizando células mortas. O procedimento constituiu da diluição da amostra na proporção de 1:1 com o azul de Trypan, aguardou-se 2 minutos para que o sal derivado de toluidina pudesse fazer efeito nas células e foi realizada a contagem em hemocitometro de Neubauer de cada amostra descrita anteriormente, tanto das células azuis (mortas) e células normais, em seguida é calculada a porcentagem de células mortas sobre o número de células totais.

O segundo método de avaliação da proliferação celular foi pelo método do MTS (3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3 -carboxi metil fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). Este basea-se no princípio da avaliação colorimétrica da atividade mitocondrial celular. Os tipos celulares descritos foram plaqueados em placas de 96 poços e ao termino de cada período foram incubados por 2 horas com 20 uL de MTS (Número cat. G3582, Promega). Em seguida foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda correspondente a 490 nm. O resultado dessa análise foi normalizada para 100 % relativo ao controle e de acordo com esse valor foi calculada a viabilidade das demais amostras.

Extração de RNA total e RT-qPCR

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído com o kit *RNAqueous-4PCR*, segundo o protocolo do fabricante (*Ambion, Inc*). Brevemente, ao final do período experimental de 8 h, a suspensão de meio de cultura contendo as células, nos respectivos estímulos descritos no Quadro 1, foi centrifugado a 250 G por 5 minutos para coleta das células. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de células foram adicionados 300 µL de tampão de lise em tubo de 1,5mL seguido de maceração com o auxílio de pilão plástico fornecido com o kit. O mesmo volume (300µL) de etanol 64% foi adicionado ao lisado celular e misturado cuidadosamente. Essa mistura será transferida para uma coluna com filtro de afinidade para ligação do RNA presente na amostra e centrifugada a 15.000 g por 1 min. O filtrado foi descartado e o filtro contendo o RNA imobilizado foi utilizado nos passos seguintes de lavagem e eluição do RNA. As amostras foram quantificadas no aparelho NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare), levando em conta sempre a pureza e quantidade de 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 e pares de primers e sonda pré-desenhados e otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) para detecção dos seguintes genes-alvo: RAGE, CCL3 e CCR5, 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 $\Delta(\Delta C_t)$ utilizando o software da própria termocicladora para quantificação relativa da expressão dos genes-alvo após normalização para o gene constitutivo.

PCR Semi-quantitativo

A reação de PCR foi feita num volume total de 25 μ L, utilizando 2 μ L do produto da reação de transcriptase reversa (cDNA) na presença de 100 pmol/ μ L de primers de cada gene (50 pmol/ μ L de cada primer, sense e antisense). A sequência dos primers e informações sobre as condições da reação de PCR são apresentadas no Quadro 2. Os produtos da reação de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1.5% e corados com brometo de etídeo (0.5 μ g/mL). Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis que foram utilizadas em análise densitométrica (utilizando o software Image J, NIH). A expressão dos genes-alvo foi normalizada para a expressão do housekeeping gene (Gliceraldeído fosfato-desidrogenase, GAPDH) e expressa como fold change em relação ao controle negativo.

Quadro 2 - Informações sobre os primers pré-otimizados para PCR semi-quantitativo (Invitrogen)

Gene Alvo	Seqüência (sense/antisense)	Ciclos	Acession#	Ta (°C)	Amplicon
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT - S AGGGGTCTACATGGCAACTG - AS	25	NM002046	54	420 bp
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA - S GAGGTGCCCATGCTACATTT- AS	32	NM000600	54	408 bp
TNF-α	TGCTTGTTCTCAGCCTCTT - S TGAGGTACAGGCCCTCTGAT - AS	32	NM000594	55	313 bp

Western blot

A ativação de p38 e NF- κ B foram avaliadas utilizando amostras de proteína total obtidas do lisado celular coletados após 10 minutos dos diferentes estímulos. Estas amostras de proteína foram coletadas utilizando o tampão de extração M-PER (Pierce, Thermo-Fisher) acrescido de um coquetel de inibidores de protease (*Complete EDTA-free, Santa Cruz*) contendo também inibidores de fosfatases (PhosStop, Roche), e armazenadas à -20C.

Após quantificação das amostras por meio de microensaio baseado no método de Bradford (*Bio-Rad*), 30 μ g foram utilizadas na separação eletroforética. O volume correspondente à esta quantidade de proteína total foi misturado a um tampão de amostra contendo glicerol, SDS, DTT e azul de bromofenol. Após fervura para desnaturação protéica à 95^oC por 5 minutos, as amostras foram carregadas nos poços de géis de poliacrilamida à 10% para resolução por eletroforese descontínua (SDS-PAGE).

A separação eletroforética em géis de poliacrilamida foi com voltagem constante de 110V por 50 minutos, e imediatamente após eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,2 μ m em tampão contendo 20% de metanol utilizando corrente constante de 300 mA por 60 minutos. Após o bloqueio em tampão Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários para as

proteínas de interesse (p-p38 e NF-kB p-p65, ambos na diluição de 1:1000) e também para expressão da forma total (incluindo formas fosforiladas e não fosforiladas) de p38 MAPK (Diluição 1:1000, #9212, Cell Signaling), proteína de expressão constitutiva não modulada nas condições experimentais utilizadas, como controle de “carregamento”, para confirmar que quantidades iguais de proteínas totais foram utilizadas. Tanto estes anticorpos primários (p-p38 – #9211L, cell signaling; NF-kB p-p65 - # SC-7151, Santa Cruz) , os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, #7074 - Cell Signaling e Anti-biotin, HRP-linked Antibody, #7075 – Cell Signaling*) foram obtidos comercialmente. A detecção da presença das proteínas foi feita por um sistema de quimioluminescência (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate – Pierce Thermo Scientific*) e a quantificação relativa feita por análise densitométrica das imagens digitalizadas dos filmes radiográficos expostos.

Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio padrão e média \pm erro padrão, especificados nas legendas das imagens. A análise estatística, quando necessária, consistiu do teste t de Student para determinação de significância entre os tratamentos. Os calculos foram executados no programa estatístico GraphPad versão 5.00 (La Jolla, CA, EUA).

RESULTADO

Resultado

Os resultados são apresentados separadamente segundo os tipos celulares estudados (linfócitos T e monócitos) para facilidade de visualização e interpretação.

1 Linfócitos T (JM)

1.1 Proliferação e morte celular

Inicialmente avaliamos o papel dos estímulos e vias de sinalização consideradas na indução de morte celular pelo ensaio de exclusão de azul de trypan. Os estímulos utilizados não alteraram a viabilidade celular de forma significativa, assim como não houve efeito com a inibição das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B. O controle positivo (doxorubicina) reduziu significativamente a viabilidade celular nos três períodos avaliados, indicando a susceptibilidade das células e a sensibilidade do ensaio. Interessante notar um discreto (não significativo estatisticamente) aumento da viabilidade nos períodos de 48h e 72h nos grupos tratados com os inibidores SB203580 e Bay 11-7082 e estimulados com LPS (Figura 2).

No experimento que avaliou a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial (MTS), representativa da apoptose pela via intrínseca, não observamos alterações importantes no período de 24 horas, com exceção do controle positivo com doxorubicina que reduziu significativamente a viabilidade dessas células. Nos períodos de 48h e

72h, embora os estímulos com LPS e AGE-BSA não tenham alterado de forma significativa a atividade metabólica houve um discreto aumento da atividade metabólica com LPS, associado ou não ao AGE-BSA. Interessante notar comportamento antagônico com o uso dos inibidores das vias de sinalização, em particular nas amostras estimuladas com LPS (isolado ou associado ao AGE-BSA): favorecimento do aumento da atividade metabólica com SB203580 e inibição do efeito estimulador da atividade metabólica com Bay 11-7082. Esta discreta atividade de inibição do metabolismo celular (indução de apoptose pela via intrínseca) com a inibição de NF-kB também é notada no período de 72 h. (Figura 3).

1.2 Regulação da expressão gênica – RT-PCR e RT-qPCR

A linhagem celular de linfócitos T apresentou reduzida expressão de RNAm de IL-6, que não foi significativamente induzida por nenhum dos estímulos utilizados, porém foi dependente da atividade de p38 MAPK. Por outro lado, a inibição de NF-kB resultou em tendência de aumento da expressão constitutiva e associada ao estímulo com AGE-BSA, mas não nos estímulos com LPS, sugerindo um possível papel regulador negativo de NF-kB. (Figura 4)

A regulação de RNAm de TNF- α foi similar à observada para IL-6, porém em contraste com IL-6, a expressão gênica de TNF- α foi significativamente induzida pelo estímulo com PMA (controle positivo) neste tipo celular; enquanto pode-se notar discreto (porém não estatisticamente significativo) efeito sinérgico dos estímulos com AGE-BSA e LPS. p38 MAPK também teve papel relevante como regulador positivo na expressão de TNF- α . Já NF-kB teve efeito oposto, com sua inibição resultando em aumento da expressão constitutiva e induzida por AGE-BSA associado ou não a LPS. Interessante notar que a expressão de TNF- α na presença de LPS foi dependente tanto de p38 MAPK quanto de NF-kB, de forma não redundante, isto é, na presença de LPS a inibição de uma destas vias resultou em significativa redução da expressão gênica de TNF- α , mesmo com a outra via ativa. (Figura 4)

A expressão de RNAm de RAGE foi detectada nos linfócitos T, porém não foi regulada de forma notável por nenhum dos tratamentos e

condições experimentais, exceto por discreta inibição da expressão gênica com a inibição de NF- κ B. CCR5 e CCL3, expressas primariamente por macrófagos/células monocíticas como esperado apresentaram reduzida expressão constitutiva por linfócitos. Interessante observar que esta expressão foi inibida pelos estímulos utilizados e praticamente ab-rogada com a inibição de p38 MAPk ou NF- κ B. (Figura 5)

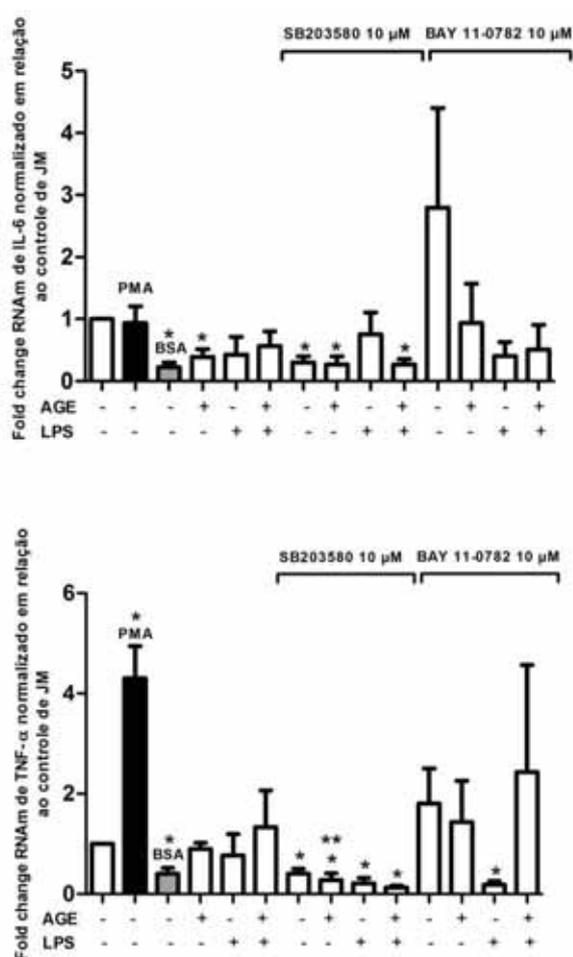


FIGURA 4 - Expressão gênica (RNAm) de IL-6 e TNF- α avaliada por RT-PCR em linhagem celular de linfócitos T humanos (JM) após estímulos com LPS associado ou não à AGE-BSA na presença e ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580) e NF- κ B (Bay 11-7082). As células foram estimuladas por 6 horas. A barra negra representa o controle positivo de estímulo inflamatório com PMA (10 μ M). Barras indicam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. (*) Representa diferença significativa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, (**) Representa diferença significativa $p < 0,05$ em relação ao grupo correspondente sem inibidor.

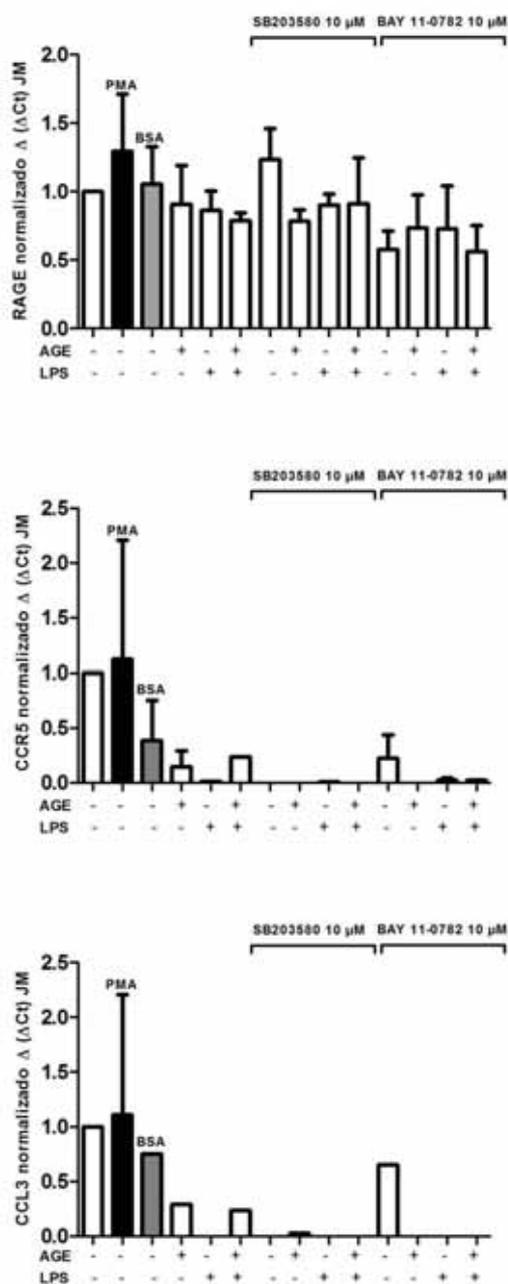


FIGURA 5 - Expressão gênica (RNAm) de RAGE, CCR5 e CCL3 avaliada por RT-qPCR em linfócitos T (células JM) humanos após estímulo com LPS de *E.coli* (1 μg/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 μg/mL) na presença e ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580) e NF-κB (Bay 11-7082). As células foram estimuladas por 6 h. Barras indicam média ± erro padrão de três experimentos independentes.

1.3 Ativação das vias de sinalização intracelular – Western Blot

Nos linfócitos T, LPS e AGE-BSA isoladamente ou combinados ativaram rapidamente p38 MAPK e NF- κ B, Não houve diferença de expressão entre os tratamentos com AGE-BSA ou LPS. (Figura 6)

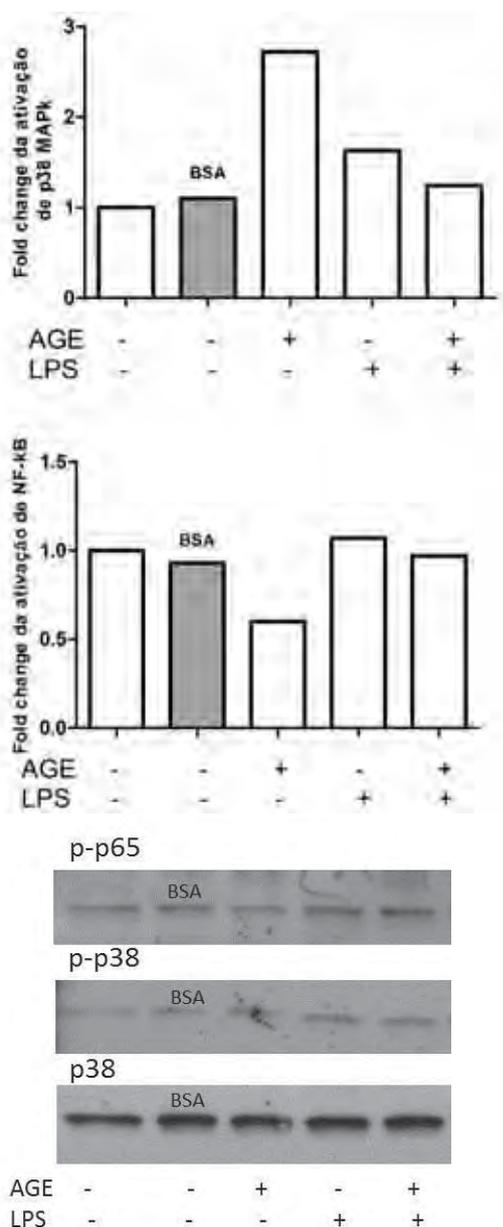


FIGURA 6 - Modulação das vias NF- κ B e p38 MAPK em linfócitos T (JM) humanos após estímulo com LPS de *E.coli* (1 μ g/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 μ g/mL). As células foram estimuladas por 10 minutos. Os gráficos correspondem a densitometria da imagem.

2 Monócitos (U937)

2.1 Proliferação e morte celular

Os estímulos utilizados não induziram morte celular (ensaio de exclusão de azul de trypan) ou alteração de metabolismo/apoptose pela via intrínseca (ensaio MTS) em nenhum dos períodos considerados (24, 48 e 72h). O controle positivo (doxorrubicina) induziu a morte celular, confirmando a sensibilidade das células e das metodologias utilizadas. Observa-se uma redução da viabilidade celular, pelos dois métodos utilizados e nos três períodos considerados (24, 48 e 72h), com a inibição de NF-kB. (Figura 7 e 8)

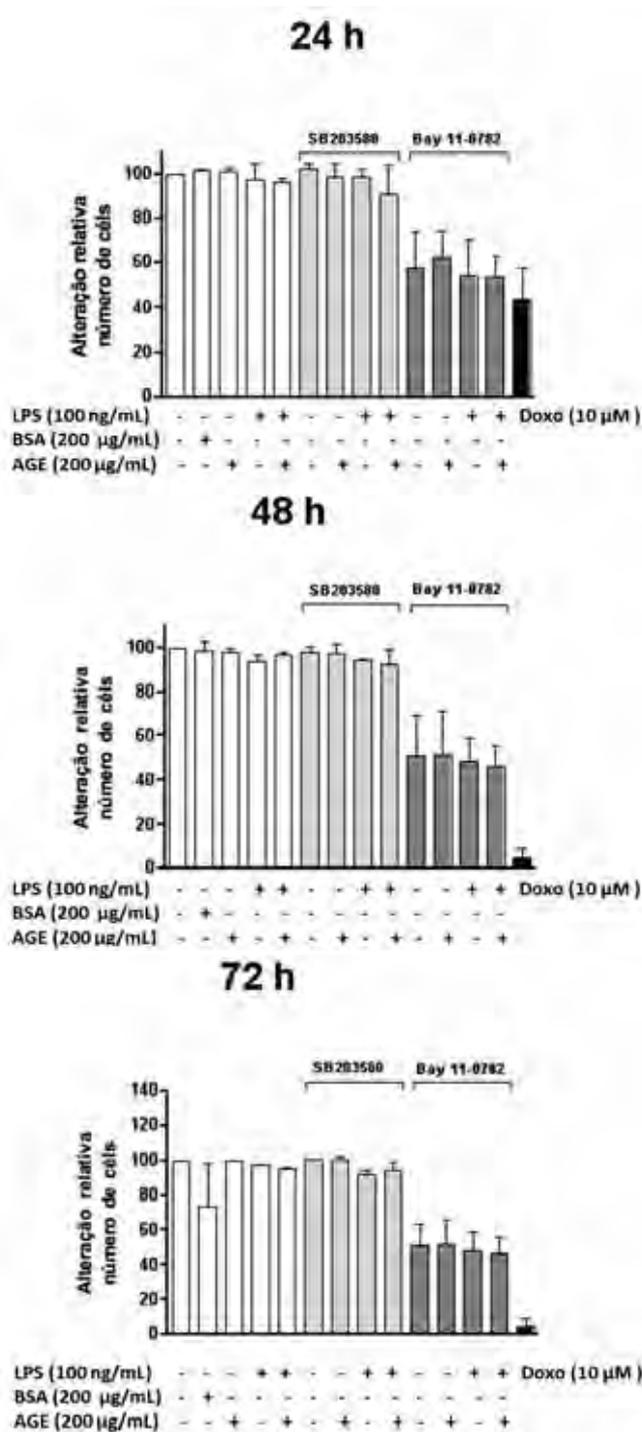


FIGURA 7 - Modulação da proliferação celular na linhagens U937 (monócitos), Ensaio Azul de Trypan. A linhagem celular foi estimulada por 24, 48 e 72 h com LPS (1 µg/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 µg/mL) na presença e na ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580, 10 µM) e NF-κB (Bay 11-782, 10 µM). A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorubicina (10 µM). Barras indicam média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

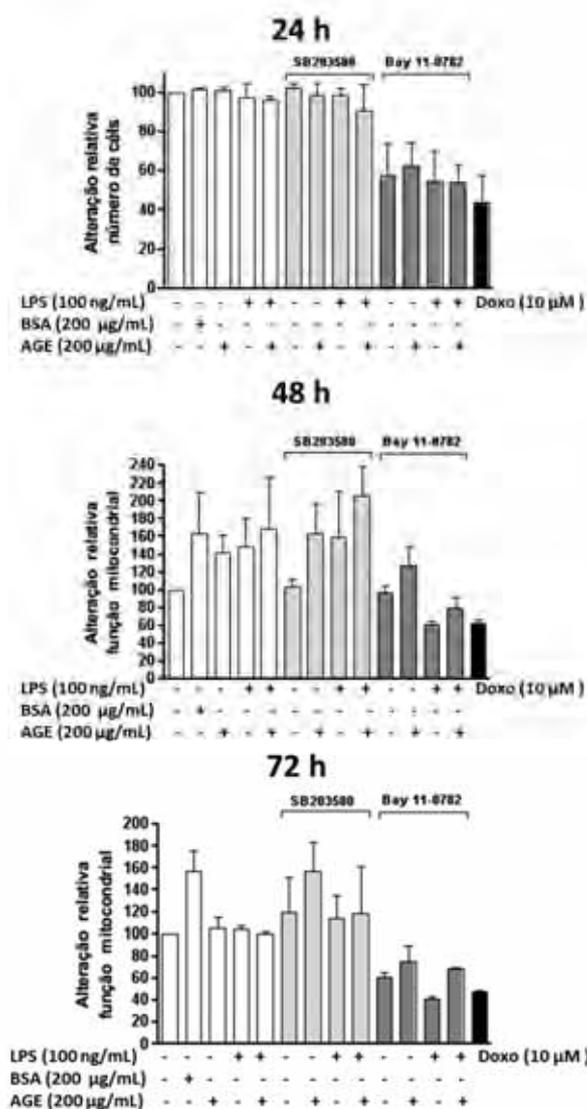


FIGURA 8 - Modulação da apoptose pela via intrínseca na linhagem U937 (monócitos), MTS. A linhagem celular foi estimulada por 24, 48 e 72 h com LPS (1 µg/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 µg/mL) na presença e na ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580, 10 µM) e NF-κB (Bay 11-7082, 10 µM). A barra negra representa o controle positivo de estímulo apoptótico com Doxorubicina (10 µM). Barras indicam média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

2.2 Expressão de mRNA – RT-PCR e RT-qPCR

Em geral a expressão gênica de IL-6 foi mais marcante e induzível por estímulo com LPS em monócitos do que em linfócitos T. AGE-BSA

não induziu a expressão de IL-6, porém não inibiu a indução de RNAm de IL-6 associada ao LPS quando os estímulos foram empregados simultaneamente. Nota-se que a expressão de IL-6 por monócitos é dependente primariamente de p38 MAPK, sem efeito marcante associado à inibição de NF-kB (Figura 9).

À semelhança do observado em linfócitos, a expressão gênica de TNF- α foi induzida apenas por PMA (controle positivo), porém não pelo estímulo com LPS e AGE-BSA isoladamente, com discreto (e não significativo estatisticamente) efeito sinérgico quando estes estímulos foram associados. p38 MAPK não teve papel relevante na expressão de TNF- α por estas células, porém a inibição de NF-kB resultou em discreto aumento do RNAm de TNF- α , num efeito regulador negativo similar ao observado em linfócitos (Figura 9).

A expressão de RNAm de RAGE foi detectada em monócitos, porém os estímulos utilizados e as vias de sinalização p38 MAPK e NF-kB não modularam de forma marcante sua expressão. O receptor de quimiocina CCR5 teve sua expressão gênica inibida pelos estímulos utilizados, exceto quando LPS e AGE-BSA foram associados. A inibição de p38 MAPK teve efeito regulador positivo ao inibir a expressão constitutiva (não estimulada) e induzida por LPS e AGE-BSA associados, enquanto NF-kB não teve papel relevante na expressão de CCR5 (Figura 10).

A regulação da expressão gênica de CCL3 em monócitos foi bastante similar à observada em linfócitos para CCR5, com inibição da expressão constitutiva por todos os estímulos e dependência tanto de p38 MAPK quanto de NF- κ B foi induzida por LPS, mas não por AGE-BSA. Quando LPS e AGE-BSA foram associados, o efeito indutor do LPS se manteve inalterado. Em contraste com o observado para a regulação de CCR5, a produção de RNAm de CCL3 induzida por LPS depende de NF- κ B (Figura 10).

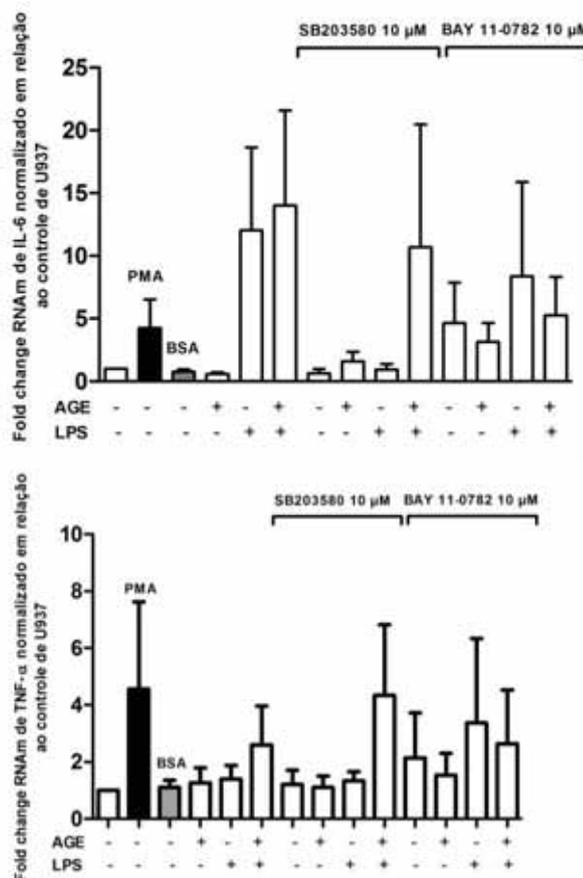


FIGURA 9 - Expressão gênica (RNAm) de IL-6 e TNF- α avaliada por RT-PCR em linhagem celular de monócitos humanos (U937) após estímulos com LPS associado ou não à AGE-BSA na presença e ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580) e NF- κ B (Bay 11-0782). As células foram estimuladas por 6 horas. A barra negra representa o controle positivo de estímulo inflamatório com PMA (10 μ M). Barras indicam média \pm erro padrão de três experimentos independentes.

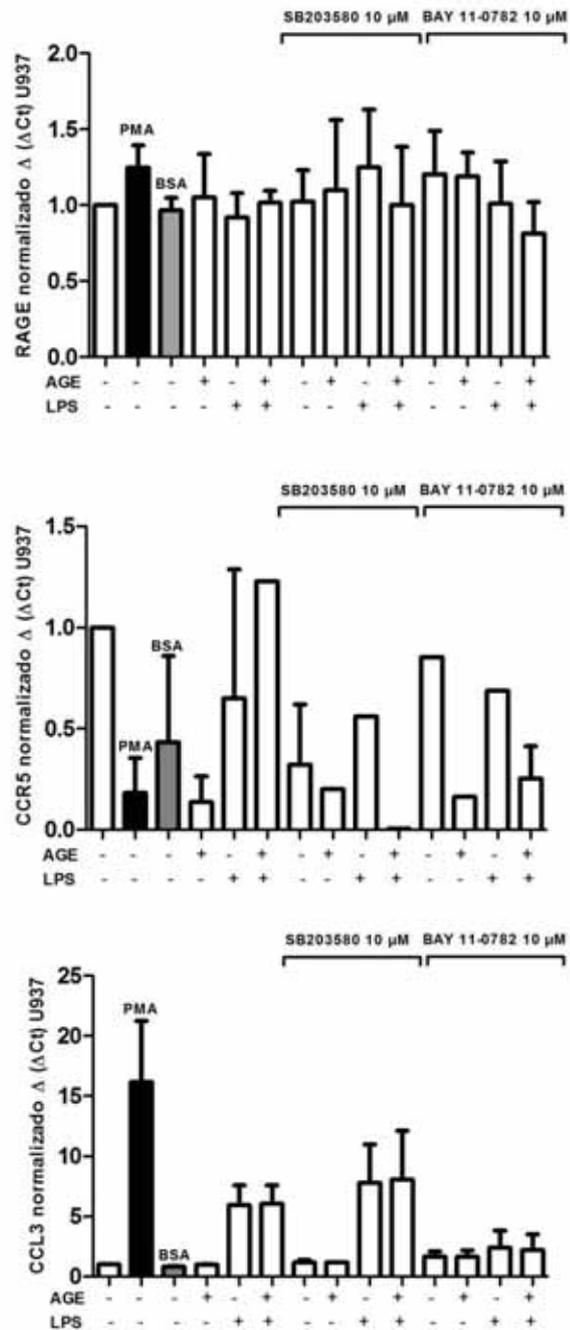


FIGURA 10 - Expressão gênica (RNAm) de RAGE, CCR5 e CCL3, e avaliada por RT-qPCR em monócitos (células U937) humanos após estímulo com LPS de *E.coli* (1 μg/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 μg/mL) na presença e ausência de inibidores de p38 MAPK (SB203580) e NF-κB (Bay 11-0782). As

células foram estimuladas por 6 h. Barras indicam média \pm erro padrão de três experimentos independentes.

2.3 Ativação das vias de sinalização intracelular – Western Blot

Podemos perceber que a ativação de pp38 se deu nos estímulos onde o LPS esteve presente, e não na presença de AGE-BSA. A ativação de pp65 pode ser detectada nos estímulos AGE-BSA e LPS isoladamente e tenuamente na associação destas (Figura 11).

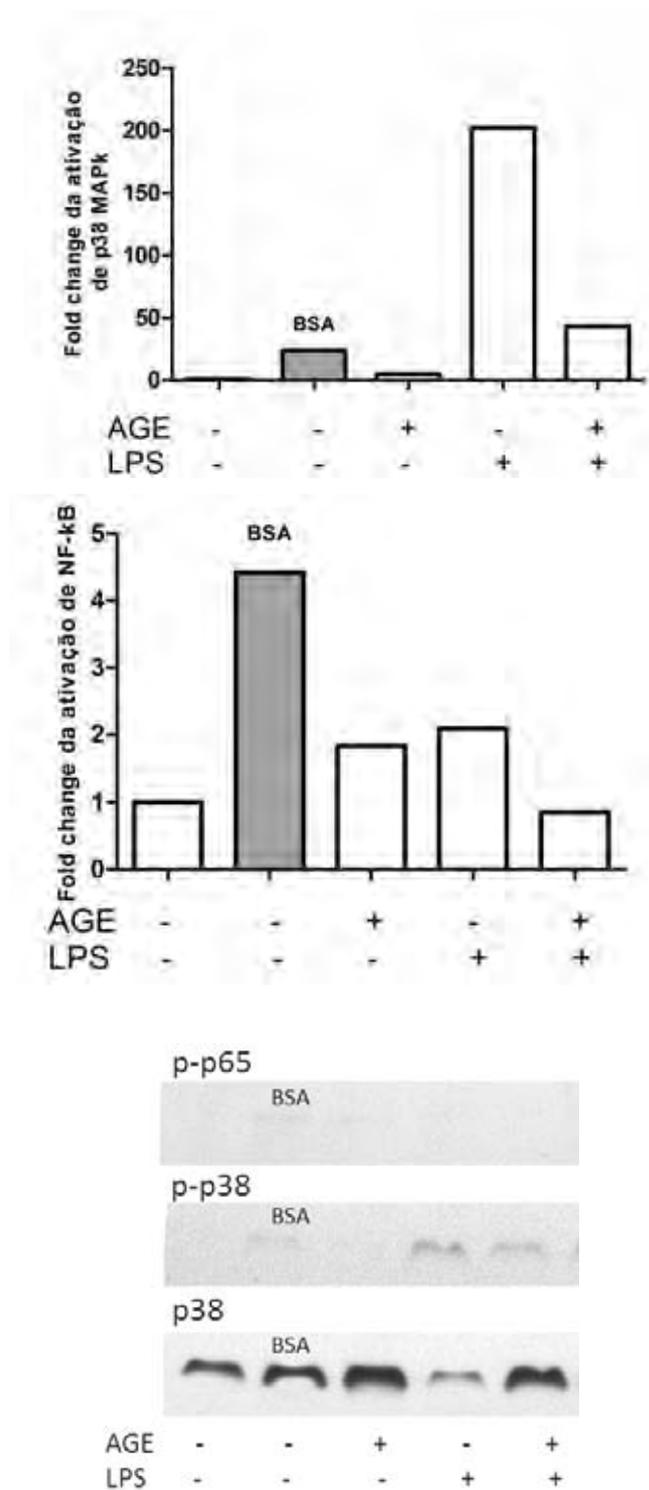


FIGURA 11- Modulação das vias NF- κ B e p38 MAPK em monócitos (U937) humanos após estímulo com LPS de *E.coli* (1 μ g/mL) associado ou não à AGE-BSA (200 μ g/mL). As células foram estimuladas por 10 minutos. Os gráficos correspondem a densitometria da imagem.

DISCUSSÃO

Discussão

A discussão dos resultados encontrados é dificultada pelo fato de não termos encontrado na literatura nenhum estudo similar que avaliou os efeitos dos agonistas de TLR4 (lipopolissacarídeo bacteriano, LPS) e RAGE (albumina sérica bovina glicada, AGE-BSA) isoladamente e associados, em uma simulação *in vitro* dos efeitos da ativação destes receptores em células da resposta imune inata (monócitos) e adaptativa (linfócitos), o que torna o nosso trabalho inédito nesse sentido. Com as devidas restrições e precauções associadas à extrapolação de resultados, a intenção é simular aos eventos no microambiente periodontal em um paciente diabético.

Proliferação e morte celular

Quando os tipos celulares alvos desse estudo (linfócito T e monócito) foram estimulados com AGE-BSA (200 µg/mL) e/ou LPS - *E. coli* (1 µg/mL) na presença ou ausência dos inibidores de p38 MAPK SB203580 (10 µM) e Nf-kB Bay 11-7082 (10 µM) não houve variações significativas na proliferação e viabilidade celular. Um trabalho que avaliou morte celular de linfócitos T (JM) expostos a diversas concentrações de AGE-BSA (50, 100, 200 e 400 µg/mL), obteve uma curva dose-resposta decrescente a medida que se aumentava a concentração de AGE-BSA, na concentração de 200 µg/mL nota-se uma diminuição em torno de 50%

de viabilidade celular pelos testes de exclusão de azul de Trypan e MTT comparado ao grupo controle. Entretanto a análise da viabilidade celular foi realizada 5 dias após os estímulos, o que justifica a diferença encontrada entre os resultados dos autores acima citados e os nossos.²⁸ Baixas doses de AGE-BSA (1, 10 e 100 µg/mL) não são capazes de induzir apoptose em basófilos humanos, fato que só foi constatado em altas doses (1000 µg/mL) por um período de 48 h.²⁵ Outros autores ainda relacionam a ativação de RAGE com aumento da sobrevivência celular, como nesse estudo realizado com eosinófilos humanos sob estímulo de S100B, um ligante de RAGE, onde constatou-se um aumento na viabilidade celular em um período de 48 h, resultado semelhante ao nosso no mesmo período¹². O possível papel anti-apoptótico da sinalização via RAGE também é sugerido pela associação positiva entre a expressão de RAGE e viabilidade celular em células pancreáticas neoplásicas³³. A inibição da via p38 MAPK não tem papel relevante na modulação da proliferação e morte celular de linfócitos T e monócitos, na presença e na ausência dos agonistas de TLR4 e RAGE, com resultados similares relatados na literatura^{36, 47, 83}. Observamos que a via NF-κB apresenta discreto efeito positivo na proliferação e sobrevivência celular, o que é suportado por outros estudos que também observaram redução da proliferação e viabilidade celular com a inibição desta via^{21, 38}. A ativação de TLR4 com LPS de *E. coli* na concentração de 1 µg/mL não foi capaz de influenciar significativamente a proliferação celular, de forma similar ao

relatado por Schacter et al, que testaram a citotoxicidade de LPS *E. coli* nas concentrações de 0,2 a 200 µg/mL em PBMCs e constataram aumento da morte celular apenas a partir da concentração de 2 µg/mL, tendo o seu pico de citotoxicidade máximo aos 20 µg/mL, representado por 11% de citotoxicidade celular⁶⁷. Não foi objetivo do nosso estudo determinar uma curva de dose-resposta para indução de apoptose, mas apenas verificar se, nas concentrações utilizadas, os estímulos de TLR4 e RAGE teriam influência na proliferação e sobrevivência celular, fatos que poderiam se refletir nos efeitos observados posteriormente na expressão dos genes-alvo. As concentrações utilizadas de AGE-BSA, LPS, SB203580 e Bay 11-7082 são comumente utilizadas na literatura, e nossos resultados indicam que não alteraram de forma importante a proliferação e sobrevivência celular. Importante destacar que, mesmo associados, estes estímulos não influenciaram a proliferação e viabilidade celular.

Regulação da expressão gênica

Com o objetivo de descrever os efeitos do eixo AGE/RAGE em resposta à ativação de TLR e o papel das vias p38 MAPK e NF-κB em monócitos e linfócitos T na resposta imune, avaliamos a expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios e receptores com a abordagem de 'genes-candidato', incluindo: IL-6, TNF-α, RAGE, CCR5 e CCL3.

Inicialmente, avaliamos a expressão de RNAm de RAGE, e verificamos que ambas as linhagens expressam RAGE⁸⁸. Esta expressão

não foi influenciada pelos estímulos utilizados, mas foi discretamente (embora não de forma estatisticamente significativa) dependente de NF- κ B em linfócitos T. No entanto, embora p38 MAPK não tenha papel relevante na expressão de RAGE, isso não significa que não seja uma via ativada após a interação de RAGE com seu ligante e que seja importante na modulação dos efeitos biológicos resultantes da ativação deste receptor, tanto em monócitos quanto em linfócitos^{27, 75, 92}.

Nos linfócitos T foi detectada a expressão constitutiva de RNAm de IL-6, e o estímulo com AGE-BSA e LPS de forma independente inibiram significativamente a expressão de IL-6, o que não foi observado quando estes estímulos foram combinados. Assim, embora não tenha sido verificado efeito sinérgico entre TLR4 e RAGE, o estímulo simultâneo destes receptores eliminou o efeito inibitório. Em monócitos, a expressão de IL-6 foi mais responsiva aos estímulos com PMA (controle positivo) e LPS, enquanto AGE-BSA não modulou a produção de RNAm desta citocina. Interessante notar que a ativação simultânea de TLR4 e RAGE não resultou em efeitos antagônicos ou sinérgicos, uma vez que embora isoladamente AGE-BSA não tenha modulado a expressão de IL-6, também não atenuou o efeito indutor do LPS quando os estímulos foram utilizados em associação. A expressão de IL-6 por ambos os tipos celulares foi dependente da via p38 MAPK, mas não de NF- κ B. Estes dados estão de acordo outros trabalhos com diferentes tipos celulares em

relação a regulação da expressão dessas citocinas via p38 MAPK^{9, 23, 41, 54, 61, 63, 82, 90}.

A expressão de TNF- α foi induzida por PMA tanto em linfócitos quanto em monócitos e, de forma similar, ambos os tipos celulares a ativação de TLR4 e RAGE resultou em discreto efeito sinérgico na indução de RNAm de TNF- α . Porém a via p38 MAPK teve papel oposto na regulação deste gene após estímulo associado de AGE-BSA e LPS: em linfócitos, a inibição de p38 MAPK reduziu a expressão de TNF- α , enquanto em monócitos a inibição desta mesma via de sinalização resultou em discreto (embora não estatisticamente significativo) aumento da expressão do RNAm de TNF- α , num efeito regulador negativo. Tanto em linfócitos quanto em monócitos a via NF- κ B não teve papel relevante na regulação de TNF- α .

A expressão gênica da quimiocina CCL3 e seu receptor CCR5 foi avaliada como forma de obter informações sobre os efeitos da ativação de TLR4 e RAGE na modulação da interação entre as respostas inata e adaptativa. CCR5 desenvolve papel importante em diversos processos fisiológicos e patológicos, dentre eles inflamação e hematopoiese. Sua expressão é comumente associada a monócitos/macrófagos, porém também é expresso por outros tipos celulares, como linfócitos T⁷. Em trabalho in vivo utilizando modelo experimental de doença periodontal, a expressão de RNAm de CCR5 foi 2 a 4 vezes maior em comparação a tecidos periodontalmente saudáveis³⁷. Observamos que linfócitos T

apresentaram reduzida expressão de CCR5 em comparação aos monócitos, como esperado por dados da literatura^{79, 85}. Em linfócitos T todos os estímulos tenderam a reduzir a expressão de CCR5, a qual foi dependente tanto de p38 MAPK quanto de NF-kB. Já em monócitos, o estímulo com AGE-BSA e LPS associados não inibiu a expressão de CCR5, a qual foi dependente tanto de p38 MAPK (expressão basal e induzida por LPS e AGE-BSA associados) quanto de NF-kB (apenas após estímulo com LPS e AGE-BSA associados).

A exemplo da expressão de RNAm de CCR5, a expressão de CCL3, também conhecida com MIP-1 α , foi maior nas células da imunidade inata. Em linfócitos, à semelhança do observado para a regulação de CCR5, todos os estímulos tenderam a reduzir a expressão constitutiva, e esta expressão foi dependente tanto de p38 MAPK quanto de NF-kB. Em monócitos, a ativação de TLR4 por estímulo com LPS resultou em marcante indução de CCL3, e esta indução foi dependente da via NF-kB mas não de p38 MAPK. A ativação de RAGE em monócitos não alterou a expressão constitutiva de CCL3, e a ativação simultânea dos receptores TLR4 e RAGE não resultou em efeito antagônico, isto é, a ativação de RAGE juntamente com TLR4 não atenuou o efeito indutor do LPS. De fato, outros trabalhos relacionaram a expressão dessa quimiocina com a atividade das vias p38 MAPK e NF-kB^{10, 11}.

Também verificamos o efeito da ativação de TLR4 e RAGE na ativação das vias p38 MAPK e NF-kB por meio de western blot. Em

monócitos, verificamos que tanto a ativação de RAGE quanto de TLR4 levou a discreta indução de NF-kB, porém apenas TLR4 ativou p38 MAPK. De fato, o estímulo simultâneo de TLR4 e RAGE resultou em efeito antagônico, uma vez que a ativação de p38 MAPK induzida por LPS foi atenuada na presença de AGE-BSA. O estímulo de RAGE resultou na ativação de p38 MAPK em células monocíticas THP-1⁸⁹, e esta discrepância pode estar relacionada à natureza do AGE utilizado (CML-HSA versus BSA-AGE em nosso estudo). Uma discreta ativação de NF-kB em linfócitos T foi associada apenas ao estímulo com LPS, porém, embora BSA-AGE não tenha induzido NF-kB também não antagonizou o efeito do LPS quanto os estímulos foram utilizados simultaneamente. Por outro lado, em linfócitos surpreendentemente a ativação de RAGE por AGE-BSA resultou em ativação mais potente de p38 MAPK do que o estímulo de TLR4 com LPS. Também surpreendente foi a observação que a ativação simultânea de RAGE e TLR4 não resultou em ativação significativa desta via de sinalização intracelular. Estes resultados são intrigantes uma vez que p38 MAPK e NF-kB são vias de sinalização comumente ativadas '*downstream*' à RAGE e TLR4, porém é preciso considerar a natureza do AGE utilizado, as concentrações dos estímulos e o período de avaliação, que limitamos a 10 minutos como representativo da rápida ativação associada à expressão de genes de resposta imediata.

Existem diversos aspectos metodológicos e do desenho experimental que devem ser considerados ao interpretar os resultados

deste estudo. O fato de termos utilizado linhagens celulares contínuas e associadas a transformação neoplásica podem ter influenciado os aspectos de proliferação e morte celular, uma vez que o ciclo celular e apoptose nestes tipos celulares pode diferir substancialmente em comparação à células 'normais'. No entanto, como mencionado anteriormente, estes experimentos foram realizados para verificar se os efeitos dos estímulos na regulação da expressão gênica poderiam estar relacionados à modulação da proliferação e apoptose, e consideramos que o fato da doxorrubicina (controle positivo) ter induzido a morte celular indica que estas células são sensíveis a estímulos apoptóticos. Outras limitações deste estudo incluem a utilização de uma abordagem de genes-candidato nos experimentos de avaliação dos efeitos da ativação de RAGE e TLR4 na expressão gênica, uma vez que a ausência de sinergismo observada pode não ser aplicável a outros genes também relacionados à resposta imune-inflamatória. Finalmente, a avaliação da expressão gênica apenas em nível de RNAm pode não ter correspondência direta com a produção das proteínas, em especial para genes que também apresentam regulação pós-transcricional (modulação da estabilidade do RNAm sintetizado), como IL-6 e TNF- α .

CONCLUSÃO

Conclusão

Em relação à hipótese principal deste trabalho, os resultados não demonstram a existência de sinergismo entre os receptores TLR4 e RAGE em células da resposta imune inata e adaptativa.

Os dados demonstram que a ativação de RAGE associada ou não a sinalização TLR não teve qualquer efeito sobre a proliferação e sobrevivência celular. De forma similar, não houve sinergismo na sinalização entre RAGE e TLR4 na modulação da expressão de IL-6, TNF- α , RAGE, CCR5 e CCL3 nas linhagens estudadas de monócitos (U937) e células T (JM).

Em monócitos, a sinalização via TLR4 e RAGE ativaram NF-kB, enquanto apenas TLR4 resultou em ativação importante de p38 MAPK. a linhagem de linfócitos T utilizada foi menos responsiva e a sinalização via RAGE foi um ativador mais potente de p38 MAPK do que a sinalização via TLR4.

REFERÊNCIAS

Referências*

1. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. *Diabetes Care*. 2008;31(3):596-615.
2. Bao W, Min D, Twigg SM, Shackel NA, Warner FJ, Yue DK, et al. Monocyte CD147 is induced by advanced glycation end products and high glucose concentration: possible role in diabetic complications. *Am J Physiol Cell Physiol*. 299(5):C1212-9.
3. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7(11):985-91.
4. 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(7):785-92.
5. Caron G, Duluc D, Fremaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005;175(3):1551-7.
6. 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(6):4272-8.
7. Choi WT, An J. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Exp Biol Med* (Maywood). [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. 2011;236(6):637-47.

8. Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):112-24.

9. Chu YF, Jiang Y, Zhang JC, Ren HS, Jiang JJ, Meng M, et al. [The role of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;22(5):291-4.

10. Chui R, Dorovini-Zis K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;7:1.

11. Chung J, Choi MJ, Jeong SY, Oh JS, Kim HK. Chemokines gene expression of RAW 264.7 cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide using microarray and RT-PCR analysis. *Mol Cells*. [Research Support, N

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nih.gov/bsb/uniform_requirements.html

12. Cui Y, et al. *Cultured cells, derived from macrophages, produce RAGE ligands, exhibit PKC-delta phosphorylation and enhanced viability in response to the RAGE ligand, S100B*. *Int Immunol*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2011;23(12):713-28.

13. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and

epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 378(9785):31-40.

14. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol*. 2007;178(10):6017-22.

15. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*. 1997;14(1):29-34.

16. 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(6):962-7.

17. Engelgau MM, Geiss LS, Saaddine JB, Boyle JP, Benjamin SM, Gregg EW, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Ann Intern Med*. 2004;140(11):945-50.

18. 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(8):930-9.

19. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J*. 2003;17(12):1762-4.

20. 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(7):1813-23.
21. Garcia MG, Alaniz L, Lopes EC, Blanco G, Hajos SE, Alvarez E. Inhibition of NF-kappaB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leuk Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005;29(12):1425-34.
22. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
23. Guo F, Xing Y, Zhou Z, Dou Y, Tang J, Gao C, et al. Guanine-Nucleotide Exchange Factor-H1 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor alpha Expression in Endothelial Cells Via Activation of Nuclear Factor- kappaB. *Shock*. 2012.
24. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes*. 3(1):21-8.
25. Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, et al. The in vitro effects of advanced glycation end products on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;155 Suppl 1:64-70.
26. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):923-34.
27. Hou FF, Ren H, Owen WF, Jr., Guo ZJ, Chen PY, Schmidt AM, et al. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic

kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004;15(7):1889-96.

28. Hung LF, Huang KY, Yang DH, Chang DM, Lai JH, Ho LJ. Advanced glycation end products induce T cell apoptosis: Involvement of oxidative stress, caspase and the mitochondrial pathway. *Mech Ageing Dev.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;131(11-12):682-91.

29. 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.* 186(2):1162-72.

30. Jagannathan M, McDonnell M, Liang Y, Hasturk H, Hetzel J, Rubin D, et al. Toll-like receptors regulate B cell cytokine production in patients with diabetes. *Diabetologia.* 53(7):1461-71.

31. Jandeleit-Dahm K, Watson A, Soro-Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes-accelerated atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(3):329-34.

32. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 162(7):1453-69.

33. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;17(4):666-76.

34. 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(1):40-4.
35. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. The Diabetes Control and Complications Trial: the gift that keeps giving. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(10):537-45.
36. Kim CH, Won M, Choi CH, Ahn J, Kim BK, Song KB, et al. Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;391(2):1182-6.
37. Kim HK, Park HR, Sul KH, Chung HY, Chung J. Induction of RANTES and CCR5 through NF-kappaB activation via MAPK pathway in aged rat gingival tissues. *Biotechnol Lett.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006;28(1):17-23.
38. Kim K, Ryu K, Ko Y, Park C. Effects of nuclear factor-kappaB inhibitors and its implication on natural killer T-cell lymphoma cells. *Br J Haematol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005;131(1):59-66.
39. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1527-34.

40. 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(8):1117-24.
41. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Advanced glycation endproducts mediate pro-inflammatory actions in human gestational tissues via nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Endocrinol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007;193(2):269-77.
42. 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(6):3392-401.
43. 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.
44. Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine.* 49(1):1-9.
45. 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(11):1641-50.
46. Lin L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* 2006;3(5):351-8.
47. Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, et al. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-

stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;46(3):339-51.

48. Macsai E, Cseh A, Budai G, Meszaros G, Vasarhelyi B, Fischer K, et al. Effect of 3 months of doxazosin therapy on T-cell subsets in type 2 diabetic patients. *J Int Med Res*. 2009;37(6):1982-7.

49. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-11.

50. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.

51. Mooradian AD. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: current management guidelines. *Arch Intern Med*. 2003;163(1):33-40.

52. Moser B, Desai DD, Downie MP, Chen Y, Yan SF, Herold K, et al. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contributes to antigen-specific cellular expansion in vivo. *J Immunol*. 2007;179(12):8051-8.

53. Neeper 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(21):14998-5004.

54. Neuder LE, Keener JM, Eckert RE, Trujillo JC, Jones SL. Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;129(3-4):192-9.

55. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007;282(48):35279-92.
56. Ohashi K, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Sadamori H, et al. Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. *Clin Immunol.* 134(3):345-53.
57. 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(12):1853-63.
58. Pacifico L, Di Renzo L, Anania C, Osborn JF, Ippoliti F, Schiavo E, et al. Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(5):691-7.
59. Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23(1):3-13.
60. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327-34.
61. Qian Y, Deng J, Xie H, Geng L, Zhou L, Wang Y, et al. Regulation of TLR4-induced IL-6 response in bladder cancer cells by opposing actions of

MAPK and PI3K signaling. *J Cancer Res Clin Oncol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;135(3):379-86.

62. 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(1):167-77.

63. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;50(5):838-51.

64. 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*. 46(4):1122-30.

65. 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*. 6(7):e22526.

66. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract*. 87(1):15-9.

67. Schacter B, Kleinhenz ME, Edmonds K, Ellner JJ. Spontaneous cytotoxicity of human peripheral blood mononuclear cells for the lymphoblastoid cell line CCRF-CEM: augmentation by bacterial lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1981;46(3):640-8.
68. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55(6):1537-45.
69. 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(3):526-33.
70. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 87(1):4-14.
71. Simone R, Floriani A, Saverino D. Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open Microbiol J*. 2009;3:1-8.
72. Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 29(1):1-14.
73. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993;16(2):434-44.
74. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, et al. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and

atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):371-81.

75. Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, et al. Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;330(1):89-98.

76. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14(3-4):222-31.

77. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002;30(3):182-92.

78. 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.* 38(3):219-28.

79. Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cell Immunol.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006;243(1):19-29.

80. Viardot A, Lord RV, Samaras K. The effects of weight loss and gastric banding on the innate and adaptive immune system in type 2 diabetes and prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(6):2845-50.

81. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):3-13.
82. Wang X, Xue H, Xu Q, Zhang K, Hao X, Wang L, et al. p38 kinase/cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway: a new signaling cascade for lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta and interleukin-6 release in differentiated U937 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008;86(1-4):61-7.
83. Wang Y, Zeigler MM, Lam GK, Hunter MG, Eubank TD, Khramtsov VV, et al. The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007;36(1):68-77.
84. Whiteley L, Padmanabhan S, Hole D, Isles C. Should diabetes be considered a coronary heart disease risk equivalent?: results from 25 years of follow-up in the Renfrew and Paisley survey. *Diabetes Care.* 2005;28(7):1588-93.
85. Wierda RJ, Kuipers HF, van Eggermond MC, Benard A, van Leeuwen JC, Carluccio S, et al. Epigenetic control of CCR5 transcript levels in immune cells and modulation by small molecules inhibitors. *J Cell Mol Med.* 2011.
86. 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(8):921-9.

87. Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, et al. Advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages. *J Biol Chem*. 285(30):23233-40.
88. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2008;4(5):285-93.
89. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjerkke RJ, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001;50(6):1495-504.
90. Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. *Liver Int*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006;26(4):467-76.
91. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 87(3):293-301.
92. Zhu P, Ren M, Yang C, Hu YX, Ran JM, Yan L. Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT

keratinocytes. *Exp Dermatol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't].
2012;21(2):123-9.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado "*Modulação da proliferação, morte celular e expressão gênica pela ativação de RAGE e TLR4 em células da resposta imune inata e adaptativa: papel das vias de sinalização p38 MAPK e NF-κB*" não foi submetido a nenhum Comitê de Ética em Pesquisa pelo fato de não envolver o uso de animais experimentais ou seres humanos. As linhagens celulares derivadas de humanos utilizadas neste projeto foram obtidas de outros pesquisadores e foram estabelecidas há mais de 30 anos, sendo atualmente de domínio da comunidade científica e amplamente utilizadas por pesquisadores em todo o mundo. Assim, trata-se de uma pesquisa totalmente realizada *in vitro* que não apresenta comprometimento de aspectos éticos.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2012


Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**
Responsável pelo Projeto e Orientador do Candidato

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP
Rua Humaitá, 1680 - Centro
Araraquara - SP 14801-903
fone: (16) 33016509 - e-mail: crossajr@foar.unesp.br

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

Araraquara, 29 de março de 2012.

MARCELL COSTA DE MEDEIROS