

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DA PROTEÍNA HMGB1 SOBRE FATORES SENSÍVEIS A ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS:  
INVESTIGANDO UM NOVO PAPEL**

**FERNANDA BONATTO**

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito  
para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre, dezembro de 2006.**

Aos meus pais e meu irmão,  
personificações do amor incondicional

**Nada na biologia faz sentido, exceto à luz da evolução.**

Theodosius Dobzhansky

## ÍNDICE

PARTE I.....	01
Resumo.....	02
Summary.....	03
Lista de abreviaturas.....	04
O paradoxo da vida aeróbia.....	06
Macrófago e inflamação.....	13
HMGB1.....	16
Objetivos.....	20
PARTE II.....	21
Artigo submetido ao periódico Immunology Letters “HMGB1 lower doses alter redox-sensitive agents in peritoneal macrophages”	
PARTE III.....	36
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	47
Lista de figuras e tabelas.....	48

**PARTE I**

## RESUMO

HMGB1 é a proteína não-histona mais abundante no núcleo celular e foi inicialmente descrita como reguladora da transcrição gênica por ligar-se ao DNA promovendo alterações conformacionais na fita dupla e assim permitindo a ação de outros fatores nucleares. Em 1999, a HMGB1 foi detectada no soro de pacientes com sepse em estágios tardios, e sua concentração plasmática foi inversamente proporcional à sobrevivência. Desde então a busca para elucidar o papel sinalizador da proteína nuclear HMGB1, tem gerado resultados paradoxais. HMGB1 é secretada por macrófagos, células dendríticas, tumores, células endoteliais e também é liberada com o processo de necrose. Duas classes de receptores já foram descritos estarem relacionados com a sinalização da HMGB1: RAGE e TLRs. As vias de transdução do sinal interno ativado por HMGB1 envolvem quinases da família das MAPK que convergem para a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B. Suas primeiras ações caracterizadas relacionam-se ao processo pró-inflamatório, mas recentes pesquisas mostram a participação da HMGB1 na promoção da recuperação celular. Supõe-se que o fator limitante no direcionamento do sinal da proteína nuclear sejam suas concentrações e a especificidade celular. Com o intuito de relacionar a sinalização de HMGB1 e sua possível ação sobre agentes redox-sensíveis, utilizamos culturas de macrófagos peritoneais de ratos submetidas a 2 doses de HMGB1 e analisamos os níveis de nitritos no meio de cultivo celular; dosamos a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase; e avaliamos a translocação de fatores de transcrição para o núcleo. As duas concentrações de HMGB1 ativaram NF- $\kappa$ B, mas apenas a menor dose foi capaz de induzir um aumento na atividade enzimática da catalase. Ambas as doses não alteraram a atividade da superóxido dismutase e também não promoveram um acúmulo de nitritos. Nossos resultados comprovam que os efeitos da HMGB1 são dose-dependentes. Mais investigações ajudarão a elucidar se a HMGB1 em leves doses pode agir como um fator pré-condicionador.

## SUMMARY

HMGB1 is the non-histone protein most abundant in the cell nucleus. This protein was initially described as a DNA-binding agent that promotes transcription regulation by bending the double-helix, thus allowing the action of nuclear factors. In 1999, serum HMGB1 was detected in sepsis patients with time delay. HMGB1 concentrations and survival were inversely proportional. Then, the search for HMGB1 actions has generated inverse results. HMGB1 is secreted by macrophages, dendritic cells, endothelial cells and tumors cells; however, during the process of necrosis, HMGB1 is released to extracellular environment. Two receptor families were described: RAGE and TLRs. The HMGB1 transduction signals involve MAPK kinases that converge to NF- $\kappa$ B translocation. HMGB1 actions were related with pro-inflammatory process, but recent research showed HMGB1 beneficial effects. Protein concentrations could cause different tissue-specific responses. Our purpose was to analyze macrophages responses to low doses of HMGB1. Rat peritoneal macrophage cultures were treated with two HMGB1 concentrations. Supernatant nitrites, superoxide dismutase activity and catalase activity were determined. Plus, transcriptional factor translocation was evaluated. Both HMGB1 concentrations activated NF- $\kappa$ B, but only the low HMGB1 concentration induced an increase in the catalase enzymatic activity. Both HMGB1 concentrations did not alter the superoxide dismutase activity and also they did not change nitrite amount. Our results showed biological HMGB1 effect. More studies will help elucidate the HMGB1 role primed-like agent.

### Lista de abreviaturas

AP-1 (*activator protein 1*): fator de transcrição proteína ativadora 1

CAT: catalase

$\text{CO}_3^{\bullet-}$ : ânion radical carbonato

DNA (*deoxyribonucleic acid*): ácido deoxirribonucleico

Ec-SOD: SOD extracelular

EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*): ensaio de mobilidade eletroforética

$\text{FADH}_2$  (*flavin adenine dinucleotide*): flavina adenina dinucleotídeo

GM-CSF (*granulocyte macrophage – colony stimulatory factor*): fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos

GPx (*glutathione peroxidase*): glutathione peroxidase

GSSG: glutathione oxidada

GSH: glutathione reduzida

HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*): proteína de alta mobilidade box 1

$\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio

LPS (*lipopolysaccharide*): lipopolissacarídeo

MAPK (*mitogen-activated protein kinases*): quinases de proteínas ativadas por mitógenos

MyD88 (*myeloid differentiation factor*): fator de diferenciação mielóide

IL-1  $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ): interleucina 1 $\beta$

IL-3 (*interleukin-3*): interleucina 3

IL-6 (*interleukin-6*): interleucina 6



iNOS (*inducible nitric oxide synthase*): óxido nítrico sintase induzível

M-CSF (*macrophage-colony stimulatory factor*): fator estimulador de colônia de macrófagos

NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*): nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa b*): fator nuclear  $\kappa$ B

NO $\cdot$ : óxido nítrico

O<sub>2</sub> $\cdot^-$ : radical superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxigênio singleto

OH $\cdot$ : radical hidroxil

ONOO $^-$ : peroxinitrito

RAGE (*receptor advanced glycation end-products*): receptor de produtos avançados de glicação

Rho-GTPases (*Rho family of guanine nucleotide (GTP)-binding proteins*): família de proteínas ligantes de guanina trifosfato

RO $\cdot$ : radical livre alcóxil

ROO $\cdot$ : radical livre peróxil

ROS (*reactive oxygen species*): espécies reativas de oxigênio

RNA (*ribonucleic acid*): ácido ribonucléico

S $\cdot$ : radical livre de enxofre

SOD (*superoxide dismutase*): superóxido dismutase

TLR (*toll-like receptors*): receptores tipo Toll

TNF (*tumour necrosis factor*): fator de necrose tumoral

## **O paradoxo da vida aeróbia**

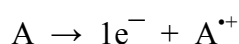
A elevação dos níveis de oxigênio na atmosfera terrestre proporcionou a aceleração do processo evolutivo da vida na Terra. Estudos sugerem que a aproximadamente 2.500 milhões de anos atrás, cianobactérias, popularmente conhecidas como algas azuis, adquiriram a capacidade de quebrar água liberando oxigênio [Halliwell e Gutteridge, 1999]. O surgimento de  $O_2$  na atmosfera teve como consequência a formação da camada de ozônio ( $O_3$ ) que juntamente com o oxigênio permitiram uma melhor filtração de grande parte da radiação ultravioleta solar. Assim a colonização do ambiente terrestre pelos organismos marinhos foi possibilitada. Organismos que podiam tolerar oxigênio, provavelmente pelo surgimento de sistemas protetores contra os efeitos tóxicos do  $O_2$ , se adaptaram para utilizar oxigênio em reações biológicas. Com a evolução dos sistemas energéticos e sistemas de transportes ocorreu o desenvolvimento de seres multicelulares, e com o passar do tempo a diversidade biológica aumentou [Halliwell e Gutteridge, 1999].

Apesar da diversidade biológica gerada pelo aumento nos níveis de oxigênio atmosférico, os níveis de 21% de  $O_2$  causam danos aos organismos [Halliwell e Gutteridge, 1999]. Uma das primeiras hipóteses para explicar a toxicidade do oxigênio nasceu com a descoberta de sua função como inibidor de enzimas celulares. Em 1954, Rebecca Gershan e Daniel L. Gilbert propuseram que os efeitos tóxicos do  $O_2$  poderiam ser devidos à formação de radicais livres de oxigênio. A partir deste estudo a pesquisa sobre radicais livres e sua interação com moléculas biológicas tem crescido aceleradamente gerando grande interesse mundial.

Durante a respiração celular o oxigênio é reduzido à água na última etapa da cadeia transportadora de elétrons [Nelson e Cox, 2000]. Entretanto, por ter como característica um par de elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, o  $O_2$  sofre redução de um elétron por vez, consecutivamente, estando reduzido totalmente após receber quatro elétrons e quatro íons  $H^+$ , formando duas moléculas de água. Esta seqüência de reações é conduzida pela cadeia transportadora de elétrons sendo a etapa final catalisada pela enzima citocromo oxidase, mas acredita-se que de 1 a 3% do oxigênio utilizado na respiração celular sofre redução incompleta gerando  $O_2^{\bullet-}$ , o radical livre superóxido [Halliwell e Gutteridge, 1999].

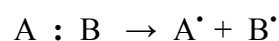
Radical livre é um termo frequentemente definido como qualquer espécie – átomo ou molécula – que contém um ou mais elétrons desemparelhados e que é capaz de existir independentemente. Radicais livres são formados quando átomos ganham ou perdem um elétron [Matsuo e Kaneko, 2000]. Gráficamente, radicais livres são representados com um ponto na porção superior após a fórmula (equação 1).

equação 1



Também podem ser formados através da quebra de uma ligação covalente, onde cada átomo permanece com um elétron do par compartilhado na ligação, esse processo é denominado fissão homolítica (equação 2).

equação 2



Os principais intermediários da redução do oxigênio são relacionados na tabela abaixo.

## ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• radical livre formado pela cadeia transportadora de elétrons</li> <li>• produto da reação catalisada por xantina oxidase</li> <li>• produto da reação catalisada por NADPH oxidase, presente em macrófagos, células endoteliais entre outras</li> <li>• produto de reações de autoxidação, como exemplos <math>FADH_2</math>, adrenalina e dopamina</li> </ul>
Peróxido de hidrogênio	$H_2O_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• espécie reativa de <math>O_2</math></li> <li>• produto da dismutação do radical superóxido</li> </ul>
Hidroxil	$OH^{\cdot}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• radical livre mais reativo</li> <li>• possui meia-vida curta</li> <li>• reage com qualquer biomolécula em sua vizinhança</li> <li>• produto da reação de Fenton</li> <li>• reagente e produto da reação de Haber-Weiss</li> <li>• produto de radiação ionizante</li> </ul>
Oxigênio singleto	$^1O_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• espécie reativa de <math>O_2</math></li> <li>• formado pelo aumento de energia excitatória no oxigênio molecular</li> <li>• produto de reações dependentes de luz, por exemplo nos bastonetes da retina</li> </ul>

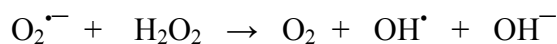
O peróxido de hidrogênio não possui elétrons desemparelhados, logo não é caracterizado como radical livre, mas é classificado como espécie reativa de oxigênio[Halliwell e Gutteridge, 1999]. Por ser um composto relativamente estável, não

possui alto grau de reatividade. Por possuir meia-vida longa, pode percorrer grandes distâncias nos sistemas biológicos. Soma-se também a capacidade de atravessar membranas biológicas. Mesmo não tendo grande reatividade, quando convertido ao radical hidroxil torna-se um potente gerador de danos.  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode reagir com íons de ferro II ou possivelmente íons de cobre I resultando em radical hidroxil (equação 3), este processo é conhecido como reação de Fenton [Matsuo e Kaneko, 2000]. Hidroxil  $\text{OH}^\bullet$  também pode ser produto da reação de Haber-Weiss [Matsuo e Kaneko, 2000] quando o radical superóxido reage com peróxido de hidrogênio tendo íons metálicos como catalisadores (equação 4).

equação 3



equação 4



As espécies reativas de oxigênio são capazes de reagir com diversos tipo de moléculas orgânicas ,entre elas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, extraindo elétrons e originando novos radicais livres em cascata [Halliwell e Gutteridge, 1999]. A reação com lipídios causa a peroxidação dos mesmos, tendo como consequência a alteração de suas estruturas moleculares acarretando em modificações na estrutura de bicamadas e inativando lipídios sinalizadores. Em proteínas a ação de espécies reativas de oxigênio gera oxidação de aminoácidos, resultando muitas vezes em perda de função. O ataque pode ser direto ou por ação de peróxidos de lipídios. O dano a ácidos nucleicos pode gerar mutações e evidências sugerem a participação de espécies reativas de oxigênio no

desenvolvimento de cânceres. Danos podem ocorrer tanto nas bases púricas e pirimídicas como na cadeia de desoxirribose ou ribose [Matsuo e Kaneko, 2000].

Como adaptação aos possíveis danos das espécies reativas de oxigênio, os organismos desenvolveram mecanismos para combater estes agentes oxidantes, conhecidos como defesas antioxidantes.

Antioxidantes englobam diversos compostos:

- enzimas que removem radicais livres e espécies reativas.
- compostos com baixo peso molecular, oriundos do organismo ou obtidos da dieta, que possuem a propriedade de seqüestrar oxidantes.
- proteínas que diminuem a disponibilidade de agentes pró-oxidantes.

Entre os principais agentes antioxidantes não enzimáticos estão: o tripeptídeo glutationa,  $\alpha$  tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, transferrinas, metalotioneína [Halliwell e Gutteridge, 1999]. Recentemente o termo redox-ativo está sendo incorporado para designar os antioxidantes não-enzimáticos, pois pesquisas mostram que o efeito antioxidante dos mesmos depende das condições do meio e de suas concentrações moleculares [Augusto, 2006].

Três enzimas antioxidantes têm papel fundamental no combate às espécies reativas de oxigênio: superóxido dismutase (SOD *superoxide dismutase*), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx *gluthathione peroxidase*).

A enzima SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e  $O_2$  (equação 5). Vários tipos de SOD já foram descritos em sistemas biológicos, sendo caracterizadas pelo metal presente no sítio ativo [Halliwell e Gutteridge, 1999]:

Cu, Zn-SOD: SOD presente no citoplasma

Mn-SOD: presente na mitocôndria

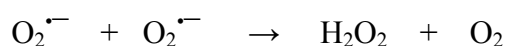
Ec-SOD: Cu, Zn-SOD presente no fluido extracelular

Fe-SOD: presente em bactérias (citoplasma) e em plantas (cloroplastos)

Glutationa peroxidase, é uma enzima dependente de selênio e da disponibilidade de glutatona reduzida. Esta enzima remove peróxidos orgânicos (ROOH) ou peróxido de hidrogênio usando esse peróxido para oxidar glutatona reduzida [Halliwell e Gutteridge, 1999] (equação 6).

A enzima catalase possui um grupo prostético heme e decompõe o peróxido de hidrogênio a água e  $O_2$  (equação 7) [Halliwell e Gutteridge, 1999].

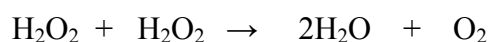
equação 5



equação 6



equação 7



Vale lembrar que existem também espécies reativas de nitrogênio, como o radical livre óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), e a espécie reativa peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).  $NO^{\bullet}$  é um gás e desempenha importantes funções como sinalizador em plantas – como hormônio – e em animais – como neurotransmissor. Peroxinitrito pode causar oxidação e nitração de biomoléculas, como o produto nitrotirosina. Também existem radicais livres de enxofre ( $S^{\bullet}$ ), radicais livres lipídicos, como os radicais alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ) e peróxil ( $ROO^{\bullet}$ ). Espécies reativas de carbono estão sendo citadas com frequência na literatura, um exemplo é o radical ânion radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), sendo suas existências e funções biológicas ainda discutidas [Augusto, 2006].

Normalmente encontra-se nos organismos uma relação estável entre oxidantes e antioxidantes, quando falham os mecanismos de defesa são ativados mecanismos de

reparos e a relação tende a ser mantida. Entretanto, se há um desequilíbrio favorecido por aumento acentuado de espécies reativas, uma situação de estresse oxidativo está caracterizada. Segundo Sies [Halliwell e Gutteridge, 1999], criador do termo, o estresse oxidativo é um distúrbio no balanço entre pró oxidantes e antioxidantes, favorecendo o gerador de espécies reativas resultando em um dano potencial. Quando ocorre estresse oxidativo ou por diminuição de antioxidantes ou por aumento de espécies reativas os organismos podem sofrer dano oxidativo e as alternativas são: adaptação ao estresse, reparo ao dano ou morte [Halliwell e Gutteridge, 1999].

Nos últimos anos, o papel de vilão do estresse oxidativo vem diminuindo. A idéia de que as espécies reativas de oxigênio são moléculas tóxicas vem sendo modificada, sugere-se que tais oxidantes desempenham também diversas funções fisiológicas fundamentais: (i) a molécula de  $H_2O_2$  atuando como segundo mensageiro em resposta a estímulos extracelulares, fazendo parte de uma via que pode regular a expressão gênica [Bowie e O'Neil, 2000; Chang e Alvarez-Gonzalez, 2001; Augusto, 2006]; (ii) duplas redox como GSSG/2GSH, por serem sensíveis ao ambiente redox, funcionam como indicadores citoplasmáticos direcionando o estágio celular para proliferação, diferenciação, apoptose ou necrose [Schafer e Buettner, 2001]; (iii) a explosão respiratória - *oxidative burst* - que é caracterizada por um aumento no consumo de oxigênio para a formação de espécies reativas por células fagocíticas do sistema imune, neutrófilos e macrófagos, tal processo potencializa o poder citotóxico dessas células [Abbas e Lichtman, 2003].



## Macrófago e inflamação

Macrófagos são células fagocíticas do sistema imune inato, sendo importantes tanto na imunidade inata como na adquirida. Células similares a macrófagos já foram identificadas em invertebrados e plantas. Suas funções no sistema imune inato incluem fagocitar micróbios, restos celulares e partículas estranhas, secretar citocinas que recrutarão outras células inflamatórias. Durante a fase efetora da resposta imune adquirida o macrófago é ativado por linfócitos T a destruir micróbios fagocitados e pode reconhecer corpos opsonizados por anticorpos e fagocitá-los [Abbas e Lichtman, 2003].

O macrófago é originado na medula óssea a partir de células progenitoras mielóides. Quando o macrófago ainda está em fases iniciais de desenvolvimento e presente na corrente sanguínea ele é denominado monócito, possuindo propriedade proliferativa e capacidade de penetrar todos os tecidos. A diferenciação e o desenvolvimento de monócitos em macrófagos dependem de diversos fatores entre eles estão as interações com o estroma de órgãos hematopoiéticos, e sinalização por citocinas como: fator estimulador de colônias de macrófagos (*M-CSF macrophage-colony stimulatory factor*), fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (*GM-CSF granulocyte macrophage – colony stimulatory factor*), interleucina 3 (*IL-3 interleukin-3*) e proteínas da família do fator de necrose tumoral (*TNF tumour necrosis factor*) [Thèze, 1999]. Moléculas de adesão, como selectinas e integrinas, controlam a migração dos monócitos do sangue para os tecidos. Uma vez que o monócito recebe sinais para diferenciar-se passa a ser chamado de macrófago e perde seu potencial proliferativo [Gordon, 2003].

Três classes são diferenciáveis: macrófagos endoteliais, macrófagos residentes e macrófagos recrutados. Macrófagos endoteliais permanecem na corrente sanguínea

aderidos às células endoteliais. Os macrófagos residentes diferenciam-se como resultado da adaptação ao micro ambiente local, vários tipos celulares já são conhecidos: células de Kupfer (macrófagos do fígado), macrófagos alveolares (presentes nos pulmões), microglia, macrófagos (presentes no Sistema Nervoso Central), células de Langerhans (macrófagos da pele) e osteoclastos (macrófagos multinucleados nos ossos). Fatores responsáveis pelo fenótipo específico dos macrófagos para cada tecido incluem a matriz extracelular e moléculas secretadas e de superfície das células vizinhas. Macrófagos recrutados migram do sangue para os tecidos principalmente devido aos sinais de macrófagos residentes, sofrendo ativação no local da inflamação. Normalmente o macrófago morre *in situ* por apoptose, mas pode ser induzido a migrar para os linfonodos ou ainda retornar à corrente sangüínea e se diferenciar em célula dendrítica [Gordon 2003] – célula apresentadora de antígeno. Pequenas alterações no ambiente do macrófago residente permitem-lhe reconhecer estágios iniciais de inflamação, tais estímulos causam sua ativação, e mesmo sem poder de proliferação, esses fagócitos de vida longa possuem síntese protéica e RNAs mensageiros ativos [Gordon 2003].

Um processo inflamatório tem como principais mediadores as citocinas, que são polipeptídeos ou glicoproteínas de baixo peso molecular – monômeros  $\leq 8-30$  kDa – que promovem diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas e, determinam e regulam os tipos de resposta imune. Suas principais características são: pleiotropia, redundância e expressão transiente. Cada citocina promove diversos efeitos em diferentes tipos celulares, podendo, tais efeitos, serem modulados por outras citocinas inibitoriamente ou sinergisticamente. A complexação citocina/receptor multimérico interage com diversas quinases e acabam regulando a expressão gênica. Essas moléculas são as efetoras na ativação dos macrófagos [Dy et al. 1999].

Na etapa inicial da inflamação, macrófagos residentes secretam as citocinas pró-inflamatórias: interleucina-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$  *interleukin-1 $\beta$* ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) acompanhadas de quimiocinas – sinalizadores de quimiotaxia. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  atuam sobre as células endoteliais dos vasos mais próximos e induzem a expressão de moléculas de adesão, assim monócitos são ativados e migram através do gradiente de quimiocinas para o sítio inflamatório. Outras citocinas, como a interleucina 6 (IL-6 *interleukin-6*) sinalizam para o aumento de consumo de oxigênio e a conversão de oxigênio molecular em espécies reativas. A principal enzima envolvida é a NADPH oxidase que utiliza NADPH como cofator, produzindo O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Também há a participação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS *inducible nitric oxide synthase*), que catalisa a conversão de arginina a citrulina liberando óxido nítrico. As espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico acabam tendo funções redundantes, mas estudos demonstraram que camundongos knockout para ambas as enzimas iNOS e NADPH oxidase foram mais suscetíveis a infecções quando comparados a animais knockouts para apenas uma das enzimas [Halliwell e Gutteridge, 1999]. Os mecanismos efetores do *oxidative burst* nos macrófagos encontram-se em vesículas intracelulares para proteger os próprios fagócitos de danos [Abbas e Lichtman, 2003]. Após o pico pró-inflamatório, citocinas antiinflamatórias sinalizam a manutenção dos macrófagos viáveis e remodelamento tecidual do local afetado.

A inflamação é um processo complexo que necessita ser finamente controlado para haver a eliminação do estímulo agressor e ainda favorecer o restabelecimento da homeostase sem grandes danos. Por isso a rede de citocinas deve estar regulada para não comprometer o organismo [Dy et al. 1999].

## HMGB1

HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) pertence à família das proteínas nucleares HMG (*high mobility group*). As HMGs foram descobertas em 1973 por Goodwin e assim chamadas devido a sua rápida migração em géis de poliacrilamida, caracterizando assim uma marcante mobilidade eletroforética. Muito abundante nas células, cerca de 1 milhão de cópias/célula, é altamente conservada entre os mamíferos: entre ratos e camundongos há 100% de similaridade, entre humanos e roedores há 98% [Yang et al. 2005]. Proteínas tipo HMGB1 também são encontradas em leveduras, bactérias e plantas [Yang et al. 2005].

HMGB1 foi inicialmente caracterizada como uma proteína nuclear não-histona, com peso molecular de 25kDa, seus 215 resíduos de aminoácidos estão organizados em três porções distintas: dois domínios homólogos de ligação ao DNA e a porção C-terminal carregada negativamente [Weir et al. 1993]. HMGB1 se liga à fenda menor do DNA fita dupla sem especificidade de seqüência. Diversas proteínas reguladoras que se ligam ao DNA utilizam os dobramentos na estrutura do DNA gerado pela ligação com HMGB1 para a formação de complexos DNA-proteínas [Bustin, 1999]. Além disso, HMGB1 tem como funções nucleares estabilizar a formação do nucleossomo, facilitar/regular a transcrição gênica e modular a atividade de receptores esteroidais [Yang et al. 2005]. Quando não está ligada ao DNA, a HMGB1 possui interações entre seus três domínios impedindo qualquer ligação com outros fatores além do DNA [Dumitriu et al. 2005]. Tem como localização o núcleo, com exceções: fígado e cérebro, onde a HMGB1 foi encontrada em grande quantidade no citoplasma [Yang et al. 2005].

Em 1991 Rauvala e colaboradores encontraram uma proteína ancorada à membrana plasmática de neuritos em crescimento e chamaram de anfoterina, termo

relacionado às suas extremidades carregadas antagonicamente. A anfoterina foi relacionada com desenvolvimento neuronal e provavelmente suas ações seriam através do receptor de produtos avançados de glicação (*RAGE receptor advanced glycation end-products*) [Taguchi et al. 2000]. Após mais análises, descobriu-se tratar da HMGB1.

Em 1999, a atenção à HMGB1 foi alavancada quando Tracey e colaboradores [Wang et al. 1999] detectaram essa proteína nuclear em soro de pacientes com sepse onde o aumento nos níveis de HMGB1 foi relacionado com a diminuição da sobrevivência. Este foi o trabalho inicial que disparou a pesquisa para conectar HMGB1 e resposta inflamatória.

HMGB1 é considerada uma citocina de atividade tardia quando comparada com o tempo e liberação de citocinas clássicas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  [Wang et al. 1999]. Ela pode ser encontrada no espaço extracelular a partir de dois processos. Pode ser ativamente secretada por células que participam do processo inflamatório, como macrófagos [Andersson et al. 2000], células dendríticas [Dumitriu et al. 2005] e até células endoteliais [Fiuza et al. 2003, Mullins et al. 2004] e tumorais [Kuniyasu et al. 2005]. Opostamente pode ser liberada por necrose celular, onde há perda de todo conteúdo celular para o meio [Scaffidi, Misteli e Bianchi, 2002]. Para que a HMGB1 seja secretada ela precisa sair do núcleo, para tanto deve sofrer acetilações nos resíduos de lisina, no entanto a proteína pode permanecer no citoplasma. A hiperacetilação impede o transporte de volta o núcleo [Bonaldi et al. 2003]. A secreção de HMGB1 não ocorre através da via clássica: retículo endoplasmático – Aparelho de Golgi [Gardella et al. 2002].

Quando no espaço extracelular, seu sinal é transduzido a partir de sua ligação com receptores plasmáticos. Até hoje três tipos já foram encontrados e, em alguns

modelos experimentais, cascatas de sinalização já foram descritas. O primeiro descrito foi o RAGE, que foi primeiro relacionado como receptor para anfoterina (HMGB1 em neuritos). Sabe-se que a ação de HMGB1 via RAGE ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B *nuclear factor kappa b*) através das quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK *mitogen-activated protein kinases*) tendo como resultados produção de citocinas e a sobrevivência celular [Yang et al. 2005]. Também pode ocorrer a ligação de HMGB1 com receptores tipo Toll 2 e 4 (TLR2, TLR4 *toll-like receptors*). Esta cascata também culmina com ativação de NF- $\kappa$ B, mas por uma rota dependente de MyD88, resultando em transcrição de genes pró-inflamatórios [Yu et al. 2006], respostas similares ao efeito de lipopolissacarídeo (LPS *lipopolysaccharide*). Entretanto muitos resultados encontrados não podem ser relacionados a nenhum desses três receptores, sugerindo que há outros receptores para HMGB1 ou que há sinergismos na sinalização [Lotze1 e Tracey, 2005].

Alguns resultados com diferentes tipos celulares tornam ainda mais difícil o entendimento das ações da HMGB1. Uma extensa revisão bibliográfica [Lotze1 e Tracey, 2005] encontrou diversos resultados: células endoteliais sofrem ativação via HMGB1, aumentando a expressão de moléculas de adesão como as selectinas; elevação no recrutamento de leucócitos indica um papel pró-inflamatório da HMGB1, porém também foram descritos a capacidade de HMGB1 induzir a angiogênese; em modelos animais de artrite reumatóide ela eleva o recrutamento de leucócitos para as articulações; em um modelo animal de queimaduras foi observado uma maior concentração de hmgb1 RNA mensageiro nos pulmões e fígado; HMGB1 esta envolvida na perda das barreiras formadas por células endoteliais e por enterócitos; foi observado também que ela participa de processos inflamatórios no pulmão, no fígado e no intestino; mas em modelo de dano tecidual, HMGB1 recruta células-tronco

hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais para os locais afetados; no Sistema Nervoso Central, HMGB1 é essencial para o crescimento de neuritos corticais e cerebelares, mas também já foi relacionada à progressão de doença de Alzheimer; a participação na inflamação sistêmica aguda esta relacionada apenas com sepse severa, não com choque séptico; e a expressão de HMGB1 esta aumentada em diversos tipos de cânceres.

Especula-se que níveis séricos baixos de HMGB1 poderiam mediar efeitos benéficos ao organismo [Lotze1 e Tracey, 2005; Limana et al. 2005]. A HMGB1 possui atividade tecido-específica como outras citocinas e a elucidação dos processos pelos quais esta proteína controla as respostas inflamatórias poderá trazer novas perspectivas para o tratamento de doenças.

## **Objetivos**

Visando aprimorar o entendimento da atuação da HMGB1 nos processos inflamatórios, esta dissertação teve como objetivos:

- avaliar a possível ativação de macrófagos peritoneais de ratos pela citocina HMGB1 em duas concentrações diferentes 50ng/mL e 1µg/mL de HMGB1, estipuladas a partir de níveis plasmáticos detectados durante processo inflamatório agudo

- analisar a modulação da atividade de duas enzimas antioxidantes - SOD e CAT - em macrófagos peritoneais de ratos tratados com 50ng/mL e 1µg/mL de HMGB1

- detectar a translocação de fatores de transcrição para o núcleo de macrófagos peritoneais de ratos após tratamento com as duas doses de HMGB1 já determinadas



**PARTE II**

## HMGB1 lower doses alter redox-sensitive agents in peritoneal macrophages

Fernanda Bonatto<sup>a\*</sup>, Alfeu Zanotto Filho<sup>a</sup> and José Cláudio Fonseca Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ramiro Barcelos, 2600-anexo, Porto Alegre 90035-003, RS, Brasil

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33165578; fax: +55 51 33165540

Postal address: Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo Bairro: Santana - Porto Alegre – RS Brasil

CEP 90.035-003

e-mail: fernanda@bonatto.org

Keywords: HMGB1, inflammation, free radicals

**Abstract**

HMGB1 has been increasingly shown to mediate cell-signaling events in inflammation, since pro-inflammatory or beneficial signals depend on concentration and cell type. Activation of macrophages leads to the secretion of cytokines and enzymes that control the inflammatory response and increase metabolic processes. This, in turn, results in increased production of reactive oxygen species. HMGB1 could activate the nuclear factor kappa B (NF-kappa B), which regulates ROS, inflammatory cytokines and antioxidant levels. Therefore, we studied the HMGB1 low dose effects on antioxidant enzymes and redox-sensitive transcriptional factors. HMGB1 low concentration increased catalase activity, but the two HMGB1 doses activated NF-kappa B at the same rate. Our present results provide evidence that HMGB1 could play a role in a cellular redox environment. Otherwise, more experiments are necessary to demonstrate HMGB1's ability to prime macrophages against subsequent insult.

## **Introduction**

In the last six years, immunology researchers have been surprised with the new roles of nuclear protein HMGB1. In the early 1970s, a group of proteins was found to be nuclear DNA-binding protein; they were called High Mobility Group proteins because of their electrophoretic fast migration characteristic [1]. Highly conserved among species, ubiquitous and often abundant in mammalian tissues, HMGB1 (formerly amphoterin) is composed of 216 amino acid residues organized into two DNA-binding domains followed by an acid tail [2]. Previously, HMGB1 has been widely studied as a non-histone DNA-binding nuclear protein with indirect functions in the regulation of genetic expression. The non-specific binding with the minor groove of DNA allows HMGB1-DNA bend that facilitates transcription, replication and repair [2]. In 1999, the Tracey group reported the inflammatory cytokine property of HMGB1 [3].

Timely findings in the inflammation field match up HMGB1 as a putative cell signaling involved in several inflammatory diseases, from sepsis and hemorrhage to rheumatoid arthritis and cancers [4]. HMGB1 is actively released by many cell types in a non-classical transport, like interleukin-1, in an endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus-independent way, although HMGB1 has to be acetylated to leave the nucleus [4]. Until now, the accurate signal mechanisms are unclear and signaling pathways downstream extracellular HMGB1 have been proposed to be tissue-specific resulting in different responses. However, three different receptors have been involved in HMGB1 cell signaling RAGE (receptor for advanced glycation end-products) and Toll-like receptors 2 and 4. Despite such receptors being involved in MAP kinase pathway and NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) activation, the routes by which they reach the nucleus are quite different [4].

The NF- $\kappa$ B family is among the most pleiotropic transcriptional factors and its nuclear translocation is activated by several molecules including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), lipopolysaccharide (LPS) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5]. Activated NF- $\kappa$ B orchestrates varied responses involving apoptosis, cell differentiation, proliferation, tumorigenesis [6]. AP-1 (activator protein 1) transcription factors are involved in cell survival, proliferation or differentiation and transformation like NF- $\kappa$ B. However the main focus in AP-1 function is tumorigenesis [7]. Both nuclear factors have been considered redox-sensitive proteins responding to reactive oxygen species (ROS) [8].

Phagocytes are especially related to ROS, and mainly with the respiratory burst and the possible oxidative damage due to their accelerated O<sub>2</sub> metabolism. Macrophages can be primed by prior exposure to factors. Priming agents are able to prepare cells to react more vigorously in the future [9]

Notably, some emerging data have demonstrated that HMGB1 has advantageous effects; this opposite action was observed in response to low HMGB1 levels [4, 10]. Thus, the purpose of this study was to analyze macrophages responses to low dose of HMGB1.

## **Methods**

Isolation and culture of peritoneal macrophages: Male Wistar rats (2-4 months) treated according institutional guidelines, were sacrificed by decapitation. The peritoneal cavity was washed with 15 ml warm sterile Hanks' balanced salt solution, pH 7.4. After a gentle massage of the abdominal wall, the peritoneal fluid was collected and centrifuged at 200 x g for 10 minutes. Peritoneal cells were resuspended with sterile ice-cold red blood cell lysis buffer. After centrifugation, the resident macrophages pellet was resuspended and incubated with RPMI 1640 media, containing 2% fetal bovine serum, for three hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, cultured cells were washed in order to

remove non-adherent and non-viable cells enriching peritoneal macrophage culture. The cells were incubated with serum-free RPMI 1640 media and specific treatments for one hour or 24 hours, as indicated in the text and legends.

Griess assay: Nitrite, a stable end product of NO<sup>•</sup> metabolism, was determined in the supernatant of peritoneal macrophages after 24 hours incubation. Culture media were mixed 1:1 (v/v) with Griess Reagent. After 15 minutes of incubation at room temperature, the nitrite amount was determined at 540 nm [11].

To detect antioxidant enzymes activities macrophages were harvested and washed three times with PBS. SOD activity was determined by measuring the kinetics of the inhibition of adrenaline auto-oxidation at 480 nm [12] and CAT activity was assayed by measuring the rate of decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorbance at 240 nm [12].

EMSA for NF- $\kappa$ B and AP-1 activation: Nuclear extracts were prepared as described previously [5]. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed by using biotin-labeled oligonucleotides to measure NF- $\kappa$ B or AP-1 content according to the kit manufacturer's protocol (Pierce).

Results were normalized to protein concentration [12]. Results are presented as means  $\pm$  S.E.M. Differences among groups in procedures evaluating oxidative parameters were determined by one-way ANOVA, using Duncan post hoc test to compare means values between control group and test group. In all experiments *p* values lower than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## **Results**

Rat peritoneal macrophages were stimulated with 50ng/mL or 1 $\mu$ g/mL HMGB1 for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Doses of HMGB1 were stipulated according to literature [3, 13] that measured serum levels in a murine model of sepsis. As a positive control, LPS-treated cells (1 $\mu$ g/mL) were cultured in the same

conditions mentioned above. LPS-exposed macrophages showed an elevation in supernatant nitrite levels. Nitrite concentrations (figure 1) did not differ when compared to with HMGB1-treated cells.

The superoxide dismutase activity (figure 2A) appeared increased only in LPS treatment. The macrophages treated with HMGB1 did not show difference in SOD activity. The peroxidase activity of catalase (figure 2B) increased with 50ng/mL HMGB1 treatment although the HMGB1 highest concentration did not induce any change. Lipopolysaccharide also induced an increase in this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification enzyme activity.

Detections of AP-1 DNA-binding activity (figure 3A) did not show difference in HMGB1 treatments. In contrast, electrophoretic mobility shift assay using NF- $\kappa$ B consensus oligonucleotides (figure 3B) showed an increment in NF- $\kappa$ B DNA-binding in HMGB1-treated cells. Surprisingly, both concentrations of HMGB1 had similar effects. It is valuable to note that LPS-treated macrophages presented an increase in AP-1 and NF- $\kappa$ B after one hour treatment.

## **Discussion**

In the present study we showed evidences of the action of nuclear protein HMGB1 in immune/inflammation system. The recent involvement of HMGB1 with tumorogenesis and chronic or acute inflammatory diseases promotes the establishment of this protein as an inflammatory cytokine. Its potent action includes – when actively secreted by macrophages, dendritic cells, natural killer cells or endothelial cells in response to immune stimulus, or released by necrotic cells – promotion of cytokines and adherent molecules expression as well as chemokines and cytokines secretion [4, 14].

Notwithstanding above mentioned property of HMGB1 eliciting proinflammatory processes, a new hypothesis suggests fruitful effects of this cytokine

[4, 10]. However the potential for HMGB1 to positively regulate the anti-inflammatory systems has not been explored in details. Our purpose was to test the hypothesis that macrophages could be affected by low HMGB1 concentration and consequently suffer alterations on reactive oxygen species-sensitive agents like antioxidants enzymes and nuclear factors.

The nitrite concentration in the cultured media indirectly showed NO<sup>•</sup> production, one hallmark of macrophage activation. Our observations showed that the low levels did not activate the cells like the positive control LPS. Unusually, we did not find the expected elevation in nitrite levels by the highest HMGB1 concentration. Previous works [14, 15], which detected TNF secretion, supernatant nitrite and other proinflammatory marks, used an initial dose 5-fold higher than our highest HMGB1 concentration. Perhaps a higher dose will show NO<sup>•</sup> products.

The antioxidant enzymes balance exerts a fine control over the production of reactive oxygen species, and once a disturbance in this balance sets in, oxidative stress could occur [9]. Concerning macrophage oxidative burst potential, the regulation in the antioxidant system is crucial to an effective response [9]. Thus, our findings - low-level HMGB1 concentration elevated catalase activity - suggest that macrophages could be primed for oxidative stress. Despite this, the present results cannot affirm that the regulation of macrophage catalase may contribute to a beneficial response of HMGB1's signal virtue.

NF- $\kappa$ B activates genes related with immune responses such as inducible nitric-oxide synthase, IL-1 $\beta$ , IL-6, and NF- $\kappa$ B activation is accompanied by generation of reactive oxygen species [5]. The LPS-activated NF- $\kappa$ B, AP-1 signals, like elevation in nitrite content and antioxidants enzymes, confirmed macrophage activation. Despite oxidant-antioxidant homeostasis being implicated in NF- $\kappa$ B and AP-1 function, the



regulation and the upstream cascade are quite different. In this work we found NF- $\kappa$ B nuclear translocation but not the AP-1 factor as a consequence of HMGB1 treatments. Some data have demonstrated that cells overexpressing catalase were unable to activate NF- $\kappa$ B in response to TNF- $\alpha$  [9]. Taking this result into account, more studies are needed, like HMGB1 pretreatment, in order to establish a link between antioxidant protection and beneficial action of HMGB1.

The relation between amplification and downregulation of cytokine network results in inflammatory process. Considering that tight control in the immune response now involves HMGB1 cytokine activity, investigation of signal pathways and possible interventions must be evaluated.

## References

- [1] Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973;38(1):14-19
- [2] Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol.* 2005;26(7):381-387
- [3] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285: 248–251
- [4] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5: 331-342.
- [5] Chang W, Alvarez-Gonzalez R. The Sequence-specific DNA Binding of NF- $\kappa$ B Is Reversibly Regulated by the Automodification Reaction of Poly (ADP-ribose) Polymerase 1. *J Biol Chem* 2001;276(50):47664-47670
- [6] Chen L, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2004;5:392-401
- [7] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:859-868
- [8] Sen CN, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-720
- [9] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. Third edition. 1999.
- [10] Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Muller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial

regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2005;97(8):e73-83

[11] Bredt, D.S. and Snyder, S.H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 175-95. (1994)

[12] Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Conte da Frota ML Jr, Dal-Pizzol F, Rotta LN, Souza DO, Perry ML, Moreira JCF. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett.* 2006;406(3):281-284

[13] Andersson BU, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med.* 2000; 4:565-570.

[14] Mullins GE, Sunden-Cullberg J, Johansson AS, Rouhiainen A, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ, Rauvala H, Palmblad J, Andersson J, Treutiger CJ. Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand J Immunol.* 2004;(6):566-73

[15] Kuniyasu H, Yano S, Sasaki T, Sasahira T, Sone S, Ohmori H. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphotericin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am J Pathol.* 2005;166(3):751-60

Figure 1: Nitrite concentration in cultured media of rat peritoneal macrophages treated for 24 hours with 50ng/mL HMGB1, 1µg/mL HMGB1 or 1µg/mL LPS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Data are expressed as percentage of control group. Data are means ± S.E.M., where n=6. \* different from control group,  $p < 0.05$ .

Figure 2: SOD (A) and CAT (B) activities of rat peritoneal macrophages treated for 24 h with 50ng/mL HMGB1, 1µg/mL HMGB1 or 1µg/mL LPS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Data are expressed as percentage of control. Data are means ± S.E.M., where n=5 for catalase assay and n=4 for SOD assay. \* different from control group,  $p < 0.05$ .

Figure 3: Electrophoretic mobility shift analyses: AP-1 (A) and NF-κB (B) activities in nuclear extracts from rat peritoneal macrophages exposed for one hour to 50ng/mL or 1µg/mL HMGB1 at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. (C) shows the specificity of binding of the AP-1 oligonucleotide (NF-κB data not shown). Results are representative of three separate experiments; densitometric measures can be seen below the images. EMSAs were performed using equivalent amounts of nuclear proteins.

Figure 1

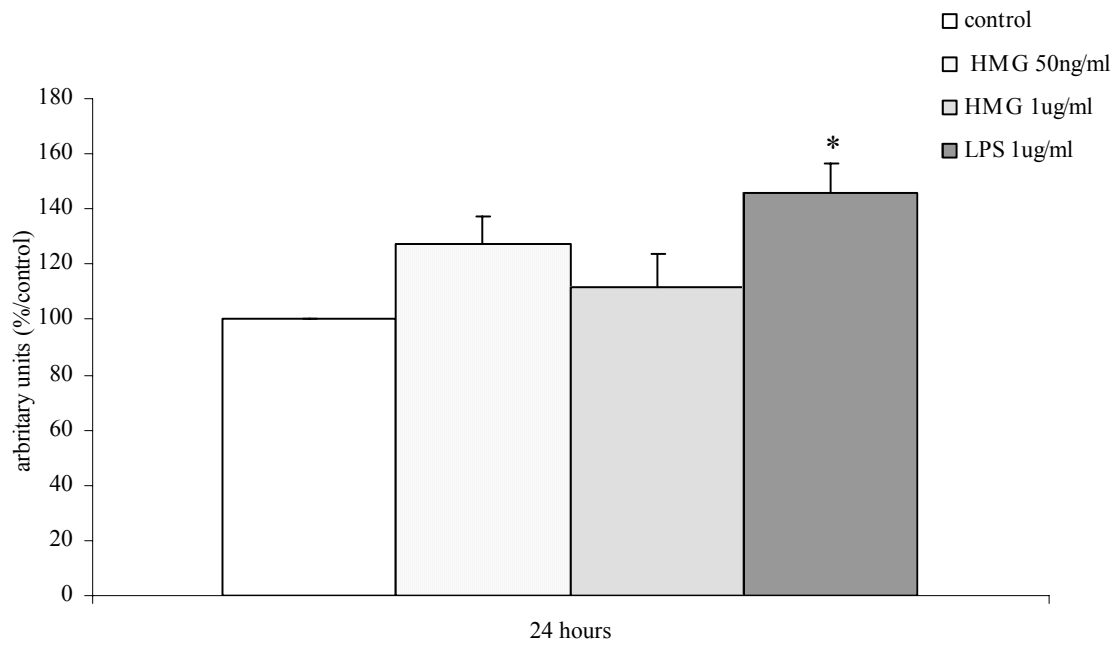


Figure 2A

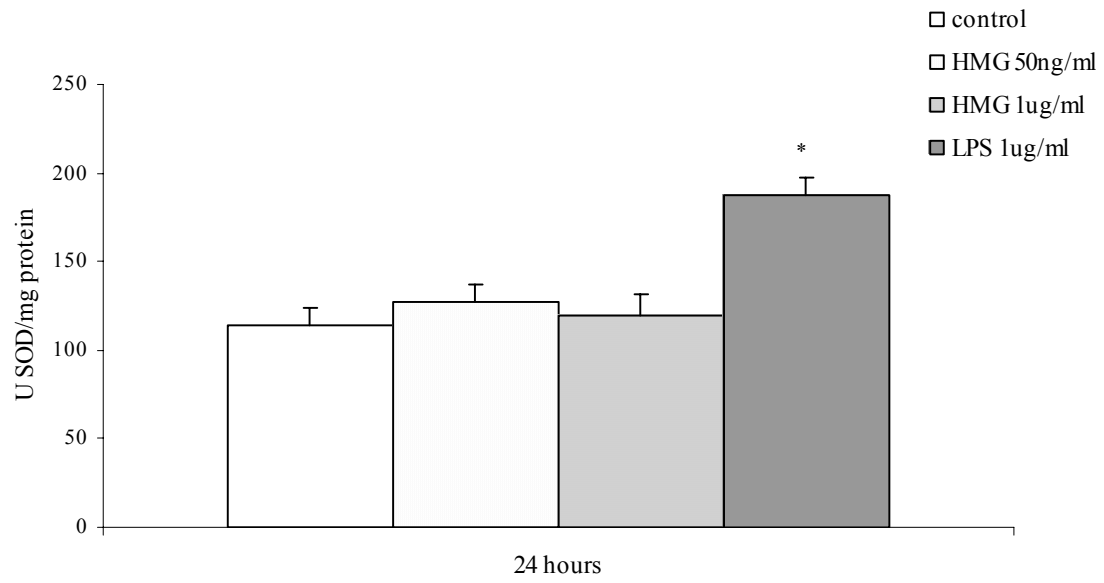


Figure 2B

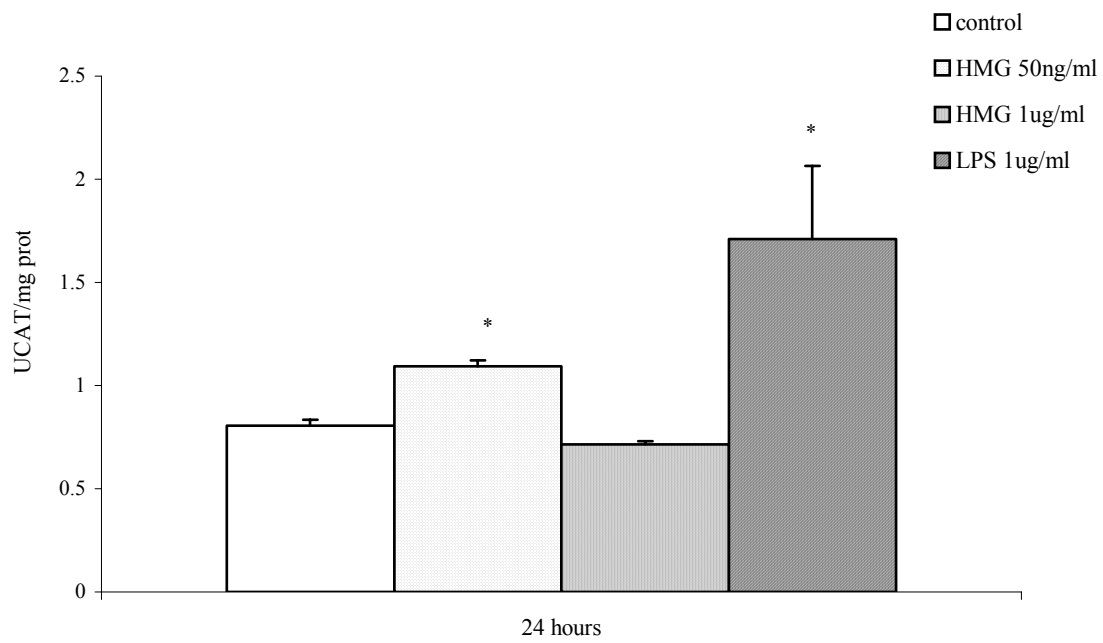
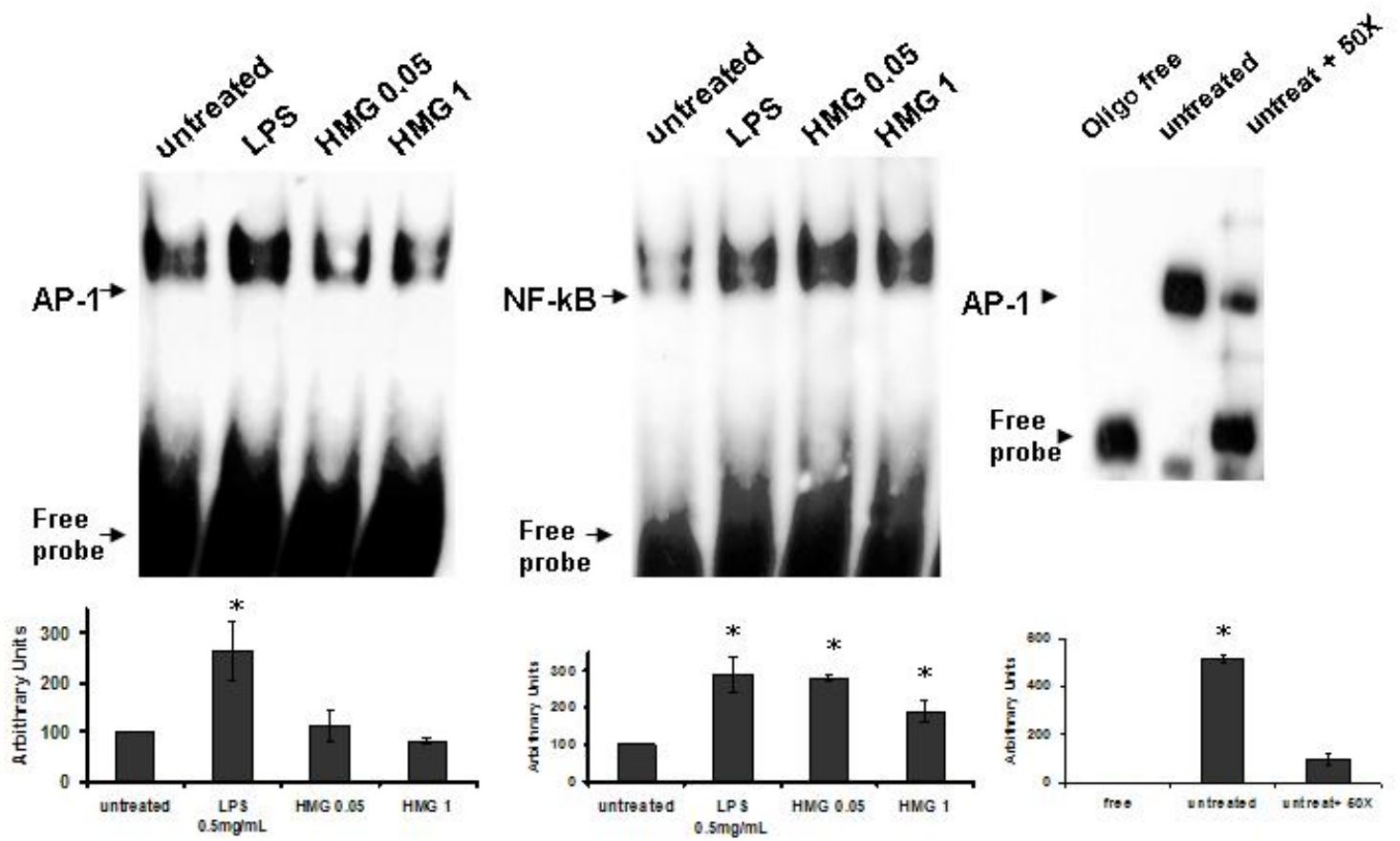


Figure 3



**PARTE III**



## Discussão

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que uma baixa concentração de HMGB1 altera parâmetros oxidativos.

As duas doses de tratamento foram estabelecidas usando como referência o trabalho de Wang e colaboradores, que quantificou níveis séricos de pacientes com sepse - inflamação sistêmica disseminada - sobreviventes e não sobreviventes. Assim estipulamos como dose leve 50ng/mL HMGB1, que correspondia a uma concentração intermediária entre pacientes sobreviventes ou não. A maior dose foi determinada após revisão de trabalhos [Andersson et al. 2000, Fiuza et al. 2003, Mullins et al. 2004] mostrando ativação em tipos celulares diferentes com 1µg/mL HMGB1.

O tratamento de macrófagos peritoneais com 50ng/mL HMGB1 gerou um aumento na atividade da enzima antioxidante catalase após 24 horas e translocação nuclear de NF-κB com 1 hora de incubação.

A quantificação de nitritos em meios de cultivo celular é amplamente usada como forma indireta de mensurar a produção de NO<sup>•</sup>. A molécula de lipopolissacarídeo é classicamente usada como controle positivo para ativação inflamatória em diversos tipos celulares incluindo macrófagos [Abbas e Lichtman, 2003]. É digno de nota que em todos os nossos experimentos, o seu papel foi evidenciado com a dose de 1µg/mL LPS. Todavia também era esperado que a maior dose de HMGB1 elevasse os níveis de nitritos, no entanto isto não ocorreu.

Surgem dois pontos questionáveis que podem estar facilitando a geração de um resultado de falso-negativo: (i) sabemos por experiência prática e por comparação com

números absolutos de diversos trabalhos, que o modelo de cultura primária reflete diferenças menores entre controle e tratamento quando comparada a linhagens celulares; (ii) a dose de 1µg/mL HMGB1 usada em nossos tratamentos é no mínimo cinco vezes inferior quando comparada a inúmeros os trabalhos [Kuniyasu et al. 2005, Yu et al. 2006]. Ainda não podemos descartar tais hipóteses, e para confirmar nossos resultados, onde HMGB1 não induz ativação da iNOS, devemos dosar a atividade enzimática da enzima e ainda a quantificar a proteína presente nas células.

A enzima óxido nítrico sintase induzível é modulada pelo fator de transcrição NF-κB [ Sen e Packer, 1996], logo, o aumento de sua expressão gênica está relacionado com a ativação do processo inflamatório. A HMGB1 liga-se ao RAGE, ligação esta que possui sete vezes mais afinidade do que a ligação do receptor e seus primeiros ligantes descritos RAGE-AGE [Yang et al. 2005]. Enzimas da família Rho-GTPases são ativadas e acabam ativando rotas de MAPK, estas por fim promovem a translocação do dímero NF-κB para o núcleo celular [Chen e Greene, 2004]. Também a ligação HMGB1-TLRs desencadeia a ativação de transcrição NF-κB via MAPK e outras quinases [Yang et al. 2005]. Assim, com a utilização de técnicas mais apuradas poderemos confirmar ou não nossos resultados.

Quando os macrófagos foram tratados com LPS ambas as enzimas sofreram ativação. A dose de 50ng/mL HMGB1 elevou apenas a atividade enzimática da CAT. Tal dado sugere que houve um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e provavelmente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, mas não detectamos nenhuma alteração na atividade da SOD. Se levarmos em conta que a enzima SOD possui em sua região promotora uma região de reconhecimento para NF-κB promovendo assim sua transcrição gênica [Visner et al. 1990], devemos realizar outros testes para confirmar os níveis de SOD e descartar o aumento de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que poderia estar mascarado com o aumento da expressão de SOD.

Já esta descrita a função de sinalizador celular do  $H_2O_2$  [Augusto, 2006], e através de experimentos induzindo a superexpressão tanto de SOD como de CAT conseguiu-se descobrir uma relação direta com NF- $\kappa$ B [Sen e Packer, 1996]: células com superexpressão de SOD possuem mais  $H_2O_2$  e, quando estimulado, a ação de NF- $\kappa$ B é potencializada e células que superexpressam CAT, quando tratadas com TNF- $\alpha$  não apresentam resposta pró-inflamatória via NF- $\kappa$ B.

Esse dado tornou-se importante quando somado aos nossos próprios resultados. Uma nova hipótese pode ser testada: será que o aumento de catalase protegeria o macrófago para um possível sinal pró-inflamatório no futuro? Então, além do tratamento inicial com HMGB1, um segundo tratamento nas células e posterior avaliação de parâmetros inflamatórios, oxidativos e fatores nucleares poderá elucidar nossos primeiros achados.

A ausência de ativação do fator nuclear AP-1 sugere que, mesmo ele podendo ser ativado pela cascata Rho-GTPases-MAPKs [Eferl e Wagner, 2003] e ser também um fator redox-sensível como NF- $\kappa$ B [Sen e Packer, 1996], não estão envolvidas as mesmas quinases que promoveram sinal positivo para NF- $\kappa$ B. Corroborando com nossos resultados, alguns dados indicam que a regulação de AP-1 é diferente de NF- $\kappa$ B como é o exemplo da ação da tiorredoxina nos fatores [Sen e Packer, 1996].

A ativação de NF- $\kappa$ B nas duas doses não diferiu, talvez a baixa dosagem já seria suficiente para translocar grande quantidade do fator nuclear. Surge a hipótese de regulação diferente pelas doses da proteína, por exemplo, poderiam ser dímeros diferentes para cada concentração e talvez por isso não apresentarem respostas iguais. O tipo de dímero formado é uma forma de regulação tanto para NF- $\kappa$ B quanto para AP-1 [Eferl e Wagner, 2003]. Outras regulações: acetilações, fosforilações e interações com histonas [Sen e Packer, 1996] são propriedades do NF- $\kappa$ B e interações com tióis [Sen e

Packer, 1996] no caso de AP-1, não podem ser esquecidas. Desde sua descoberta na década de 70, mais funções tem sido atribuídas, inclusive a HMGB1 tem sido citada como proteína ancestral em modelos evolutivos de sinalização celular [Bianchi, 2004]. A liberação no meio extracelular de uma proteína nuclear, teria sido uma forma de proto-comunicação célula-célula indicando que algo de anormal estaria ocorrendo [Bianchi, 2004].

Os resultados aqui apresentados mostram que HMGB1 possui efeito biológico em células do sistema imune, mas mais testes são necessários para podermos relacionar concentrações diferentes de HMGB1 com ativação de rotas inflamatórias também diferentes. Nossos resultados impulsionam novas abordagens para um maior entendimento das funções da HMGB1.

### **Referências bibliográficas**

Abbas A K, Lichtman A H. 2003. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders, Fifth edition.

Andersson BU, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang H, Tracey KJ. 2000. High mobility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*; 4:565-570.

Augusto O. 2006. Radicais Livres: Bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos,

Bianchi ME. 2004. Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death. *Trends Cell Biol*; 14(6):287-93

Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*; 22(20):5551-60.

Bowie A, O'Neil LA. 2000. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of the recent discoveries. *Biochem Pharmacol*; 59: 13-23.

Bustin M. 1999. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol and Cell Biol*; 19:5237-5246.

Chang W, Alvarez-Gonzalez R. 2001. The Sequence-specific DNA Binding of NF- $\kappa$ B Is Reversibly Regulated by the Automodification Reaction of Poly (ADP-ribose) Polymerase 1. *J Biol Chem*; 276(50):47664-47670.

Chen L, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. 2004. *Nat Rev Mol Cell Bio*; 5:392-401.

Das, KC Lewis-Molock Y, White W. 1995. Thiol modulation of TNF and IL-1 induced MN-SOD gene expression and activation of NK Mol Cell Bioch; 148:45-57.

Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. 2005. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol*; 26(7):381-387.

Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. 2005. Release of High Mobility Group Box 1 by Dendritic Cells Controls T Cell Activation via the Receptor for Advanced Glycation End-Products. *J Immunol*; 174:7506-7515.

Dy M, Vazquez A, Bertoglio J, Thèze J. Overview: General aspects of cytokine properties and functions. In: Thèze J, editor. 1999. *The cytokine network and immune function*. Oxford: Oxford University Press: 1-13.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double edged sword in tumotgenesis. 2003. *Nat Rev Cancer*; 3:859-868.

Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. 2003. Inflammation-promoting activity on human microvascular endothelial cells. *Blood*; 101:2652-2660.

Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. 2002. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep*; 3(10):995-1001.

Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. 1973 A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*; 38(1):14-19.

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*; 3:23-35.

Ji LL, Hollander J, 2000. Antioxidant defense: Effects of aging and exercise. in *Free radicals in exercise and aging*. Ed Radák Z. Champaign: Human Kinetics.35-71.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. Third edition.

Kuniyasu H, Yano S, Sasaki T, Sasahira T, Sone S, Ohmori H. 2005. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphoterin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am J Pathol*; 166(3):751-60.

Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Muller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. 2005. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation. *Circ Res*; 97(8):e73-83.

Lotze1M T, Tracey K J. 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*; 5: 331-342.

Matsuo M, Kaneko T. 2000. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. in *Free radicals in exercise and aging*. Ed Radák Z. Champaign: Human Kinetics. 1-33.

Mullins GE, Sunden-Cullberg J, Johansson AS, Rouhiainen A, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ, Rauvala H, Palmblad J, Andersson J, Treutiger CJ. 2004. Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand J Immunol*; (6):566-73.

Nelson DL, Cox MM. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers. Thirth edition.



- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*; 418(6894):191-5.
- Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med*; 30:1191-1212.
- Sen CN, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. 1996. *FASEB J*; 10:709-720.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. 2000. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*; 405(6784):354-60.
- Thèze J, editor. 1999. *The cytokine network and immune function*. Oxford: Oxford University Press.
- Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IM, Nick HS. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by necrosis factor. *J Biol Chem*; 265:2856-2864.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*; 285: 248–251.

Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED, Thomas JO. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J*; 12:1311-19 .

Yang H, Wanh H, Czura C, Tracey KJ. 2005. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*; 78:1-8.

Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H. 2006. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*; 26(2):174-9.

**ANEXOS**

## **Lista de figuras e tabelas**

### Parte I

Tabela - Espécies reativas de oxigênio

### Parte II

Figura 1 “Figure 1: Nitrite concentration in cultured media of rat peritoneal macrophages treated with HMGB1 or LPS”

Figura 2 “Figure 2: SOD (A) and CAT (B) activities of rat peritoneal macrophages treated with HMGB1 or LPS “

Figura 3 “Figure 3: Electrophoretic mobility shift analyses: AP-1 (A) and NF- $\kappa$ B (B) activities in nuclear extracts from rat peritoneal macrophages exposed for 1 h with HMGB1 or LPS”

**Trabalhos extras realizados durante a duração do mestrado**