



Guilherme Danielski Viola,
Daniel Pens Gelain
(Guilherme_viola_10@Hotmail.com)

Centro de estudos em Estresse Oxidativo
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Ação da proteína HSP70 extracelular sobre o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) em modelo celular

Resultados

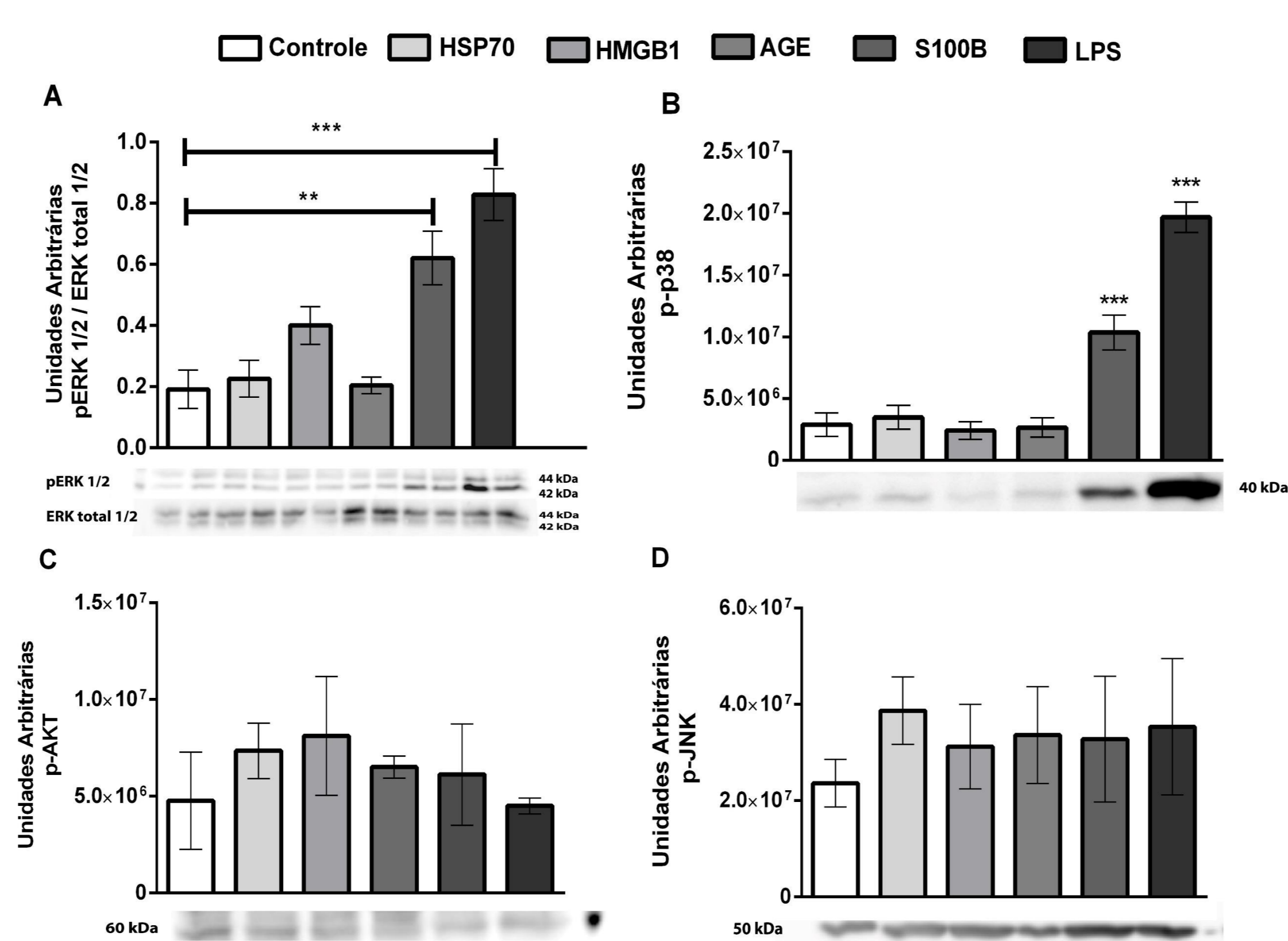


Figura 1. Agonistas RAGE. Western blots das cinases do tratamento de 20 minutos com agonistas de RAGE. A) ERK1/2. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. Diferença estatística **P<0.005, **P<0.001, ***P<0.001 (ANOVA seguida de pós-teste Tukey).

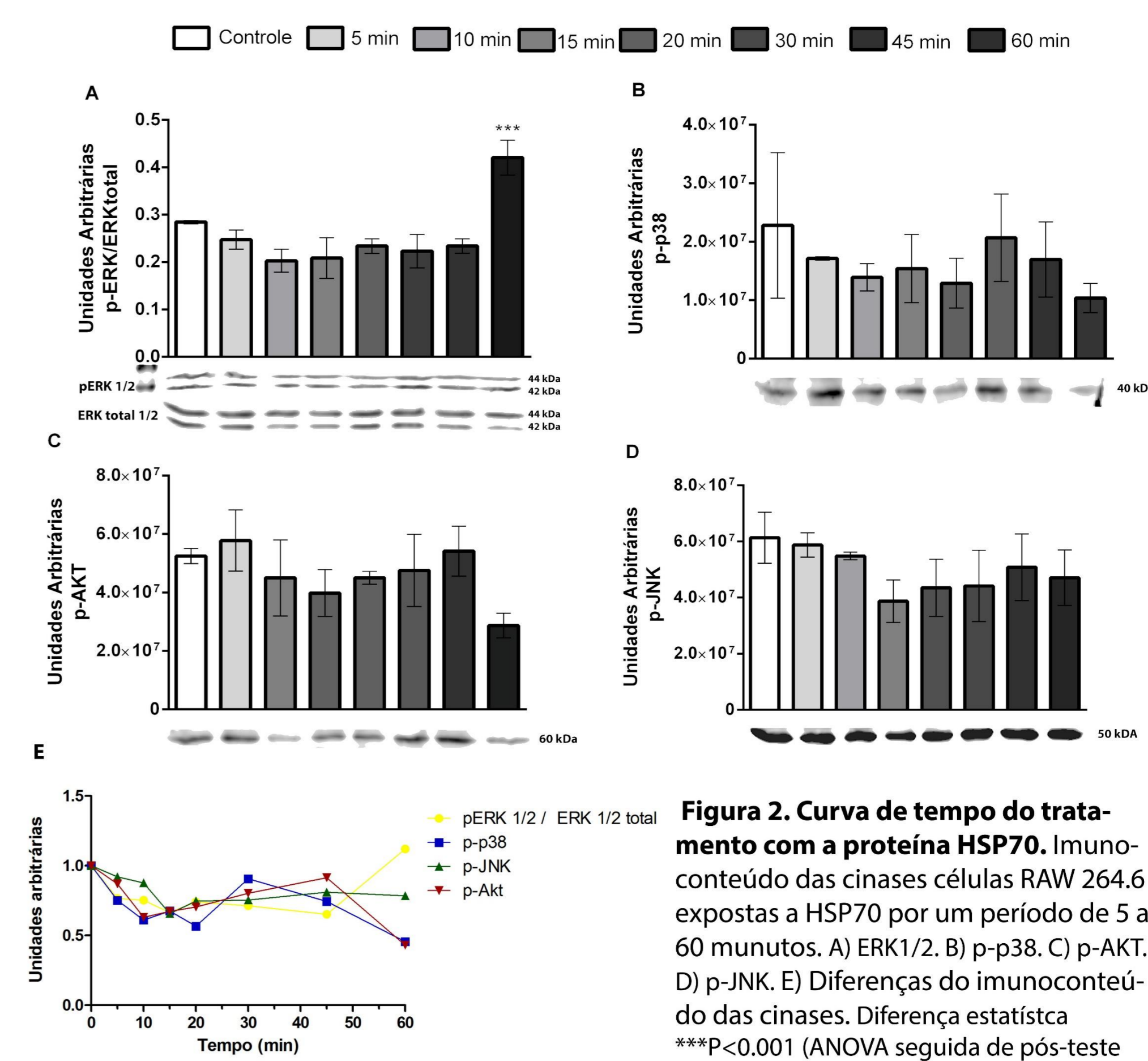


Figura 2. Curva de tempo do tratamento com a proteína HSP70. Imunocontéudo das cinases células RAW 264.6 expostas a HSP70 por um período de 5 a 60 minutos. A) ERK1/2. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. E) Diferenças do imunocontéudo das cinases. Diferença estatística ***P<0.001 (ANOVA seguida de pós-teste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

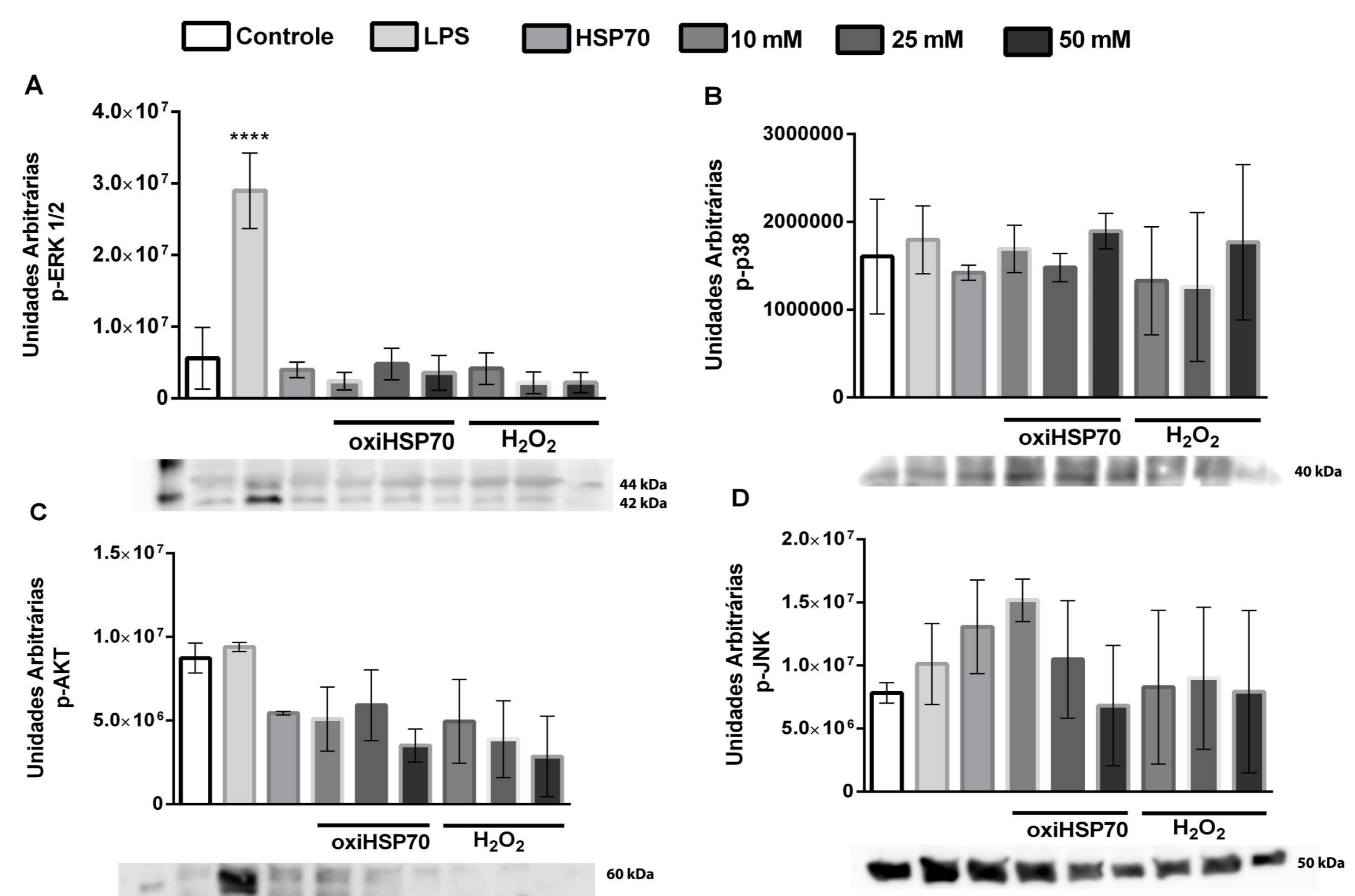


Figura 3 HSP70 oxidada. Western blot das cinases provenientes do tratamento de 20 minutos das células RAW 264.7. A) p-ERK. B) p-p38. C) p-AKT. D) p-JNK. ****P<0.0001 (ANOVA seguida de pós-teste Tukey).

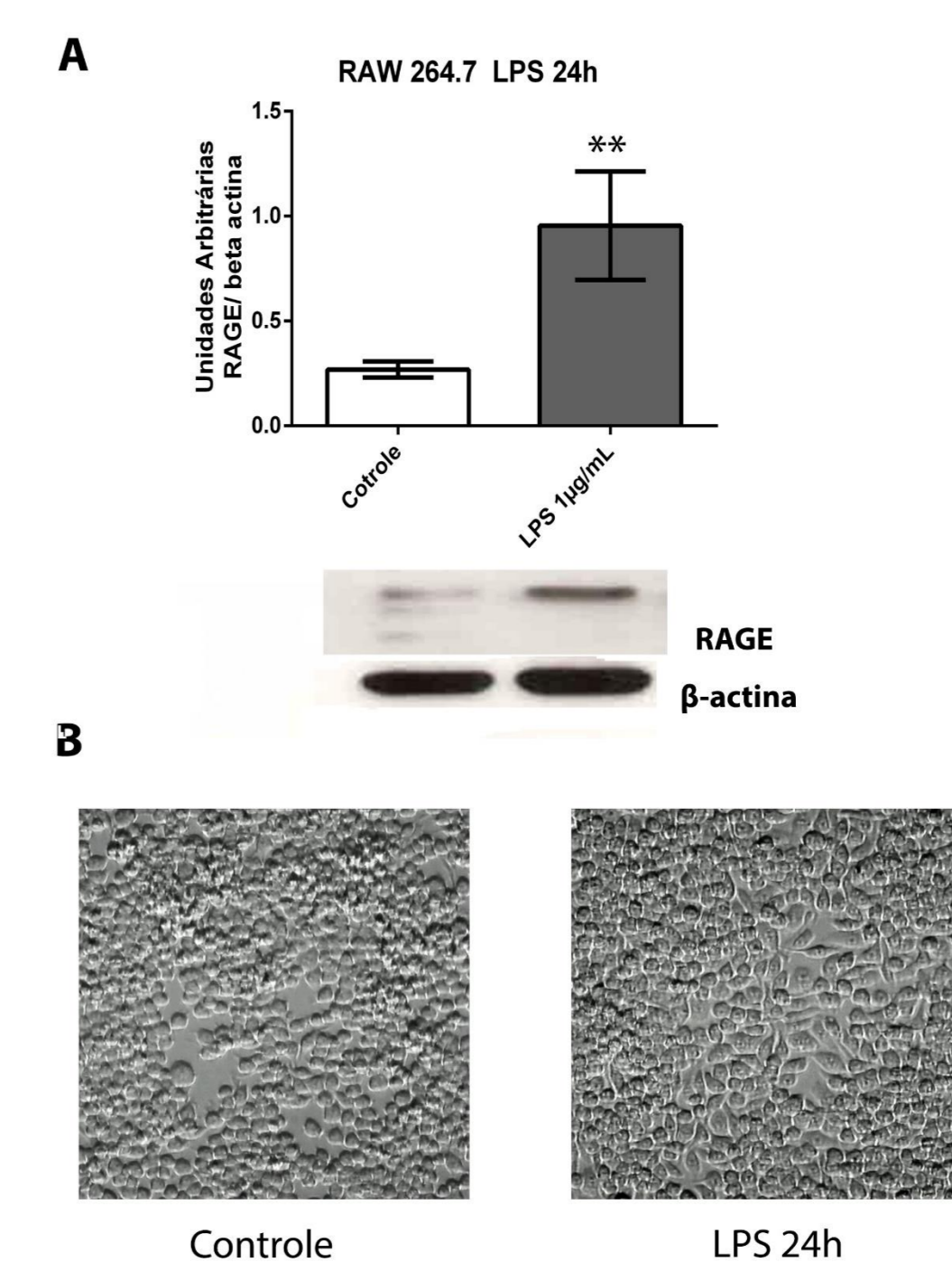


Figura 4. RAGE em RAW 264.6. A) As células foram tratadas por 24h com LPS; o imunocontéudo de RAGE foi analisado por western blot. *P<0.05 (Teste t não paramétrico). B) Microscopia das células.

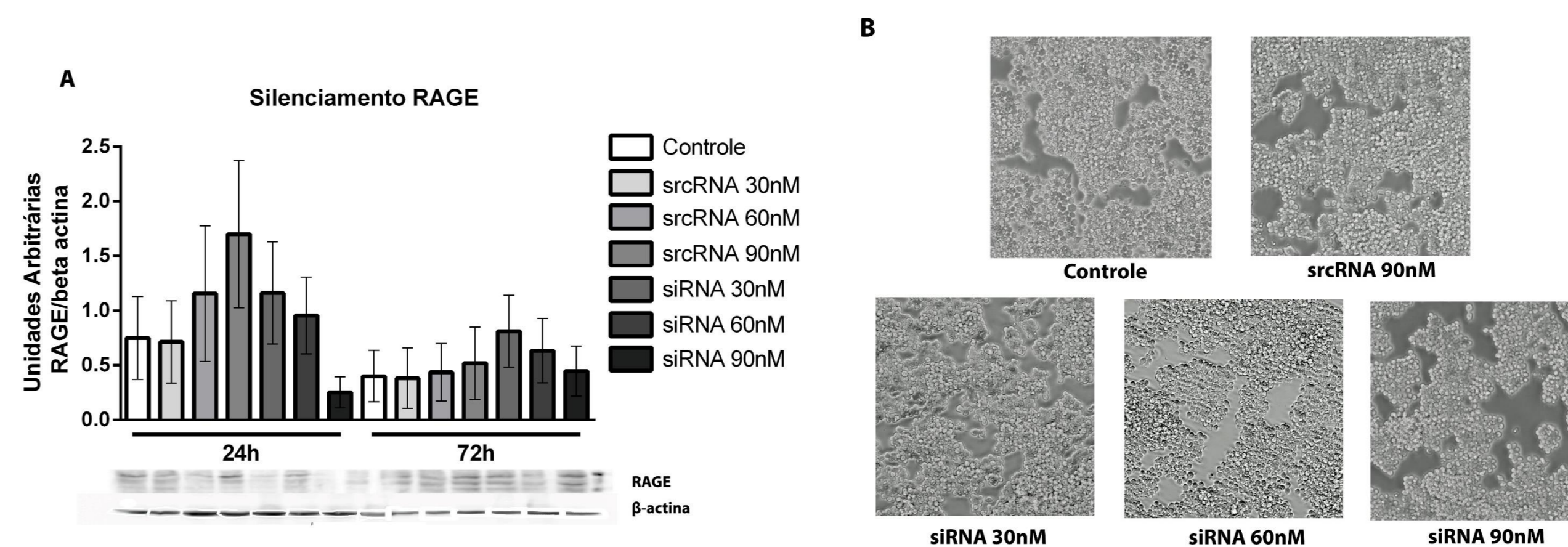


Figura 5. Silenciamento de RAGE. A) Silenciamento por 24h e 72h realizado com três diferentes concentrações de si RNA (30, 60, 90nM); o controle negativo (srcRNA) também foi usado nestas concentrações. Teste estatístico ANOVA seguido de pós-teste Tukey. B) Microscopia das células em 72h de tratamento (aumento 20x)

Introdução

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana multi-ligante da superfamília das imunoglobulinas. Um dos efeitos principais da ativação de RAGE é a ativação de cinases da família das MAPK e ativação redox-dependente de NF- κ B, a qual leva à produção de TNF- α . Sendo caracterizado como um processo de retroalimentação positiva, este mecanismo vem sendo sugerido como o eixo principal da intensificação/perpetuação de estados pró-inflamatórios. Entre os diversos moduladores da resposta inflamatória mediada por RAGE, as HSP70, proteínas de choque térmico, aparecem como potenciais reguladores em múltiplos níveis. Estudos recentes do nosso grupo de revelaram que os níveis séricos de HSP70 em pacientes sépticos são modulados de acordo com o estado redox do soro; estudos complementares baseados em modelagem computacional indicam uma possível interação entre a proteína extracelular HSP70 e o receptor.

Nosso objetivo

Sabendo que RAGE é um receptor promíscuo de reconhecimento de padrões pró-inflamatórios extracelulares, o presente estudo visa elucidar o mecanismo de ação da HSP70 extracelular em um modelo de resposta inflamatória celular e avaliar a modulação deste mecanismo via RAGE.

Como?

Cultura de células:
Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0.28 μ g/ μ L de gentamicina e 250 μ g de Anfotericina B em incubadora com 5% de CO₂ e a 37°C.

Tratamentos:
As células foram tratadas com moléculas já conhecidas como agonistas de RAGE: HMGB1 (1 μ g/mL), S100B (20 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) e AGE (Albumina Glicada) (1mg/mL). A proteína HSP70 bovina purificada foi adicionada às células (1 μ g/mL) e seu efeito foi observado em diferentes tempos.

Para mimetizar o espaço extracelular oxidante, as HSP70 foram submetidas a um protocolo de oxidação com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações. O imunocontéudo de MAPK e de RAGE foi detectado por Western Blotting.

Silenciamento do receptor:
A expressão de RAGE nas células RAW 264.7 foi inibida através do ensaio de "silenciamento" de RNA mensageiro (mRNA) por RNA interferente.

Resultados

Foi possível visualizar aumento do imunocontéudo das MAPK fosforiladas ERK e p38 nos tratamentos com S100B e LPS. O mesmo padrão não foi visualizado na presença das outras proteínas, inclusive no grupo tratado com HSP70. Posteriormente, HSP70 foi adicionada às células em diferentes tempos de tratamento; após 60 minutos foi detectada uma ativação significativa de ERK, e nenhuma alteração na ativação de p38. A expressão de RAGE foi validada em nossa linhagem; o imunocontéudo do receptor encontra-se em níveis basais na célula, porém na presença de LPS, por um período de 24h, verificou-se um aumento significativo no imunocontéudo do receptor e ativação dos macrófagos de acordo com a morfologia observada. Os resultados envolvendo o silenciamento de RAGE mostraram uma leve diminuição do imunocontéudo, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Conclusão

Com a finalidade de estudar melhor o papel extracelular da proteína HSP70, sua interação com o receptor para produtos finais de glicação avançada e ação intracelular via RAGE-dependente, mais estudos devem ser realizados. Os agonistas de RAGE, uma vez ligados nesse receptor, ativam vias de sinalização como a das MAPK; a proteína HSP70 também foi capaz de causar mudanças na resposta das células através da via MAPK da ERK 1/2, em um tempo de exposição mais prolongado (Figura 2, tratamento de 60 minutos). A expressão de RAGE nos macrófagos RAW 264.7 encontra-se em níveis basais, sendo aumentada na presença de estímulos por agonista. O silenciamento não foi tão eficaz como desejado, sendo necessário a realização de novos experimentos. Para uma melhor compreensão entre a importância da relação entre a proteína HSP70 e o receptor RAGE durante processos inflamatórios, mais estudos serão realizados a fim de elucidar o processo. Tem-se como perspectiva avaliar as respostas celulares downstream da via de sinalização e de retroalimentação positiva, além da utilização de outras linhagens celulares.