

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**HSP70 extracelular interage com o receptor para produtos finais de glicação  
avançada (RAGE) e ativa resposta pró-inflamatória em linhagem celular  
derivada de câncer de pulmão humano (A549)**

Nauana Somensi

Porto Alegre, Março de 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica Professor  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**HSP70 extracelular interage com o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e ativa resposta pró-inflamatória em linhagem celular derivada de câncer de pulmão humano (A549)**

Aluna: Nauana Somensi

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular a fim de obter o grau de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Porto Alegre, Março de 2017

Este projeto foi realizado no Departamento de Bioquímica Professor Tuiskon Dick do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (#400437/2013-9, #443514/2014-3 e #401260/2014-3), FAPERGS (#2299-2551/14-6), CAPES e Pró-Reitoria de Pesquisa desta universidade (PROPESQ/UFRGS).

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por viabilizar este estudo. Ao Departamento de Bioquímica, por fornecer toda a estrutura necessária para a realização deste projeto, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por amparar a minha formação e o desenvolvimento do mestrado e aos órgãos de fomento, pelo financiamento do projeto.

À banca examinadora, pela disponibilidade e prontidão. Professores Zé, Diego, Guido e Cristina, é um prazer contar com a presença de vocês; seus trabalhos são inspiradores.

Ao meu orientador, Daniel, por confiar a mim este projeto e conceder a liberdade de pensamento para realizá-lo. Obrigada por sempre estar disponível e me ajudar a construir um pensamento científico crítico.

Ao Laboratório 32, onde encontrei uma segunda casa. Agradecimentos especiais ao Zé, que está sempre nos engrandecendo com seu conhecimento; ao Juciano, que além de ter me guiado no laboratório desde o princípio e me ensinado tanto, tornou-se um grande amigo; ao Alfeu, por ter auxiliado no planejamento e realização de experimentos; ao Pedro, que abraçou o projeto comigo e foi fundamental para desenvolvê-lo. A todos que colaboraram para a concretização deste estudo. Aos colegas e “caminhões” que se tornaram amigos: vocês tornam o lab um lugar ainda mais agradável!

Aos amigos que estiveram presentes durante esta caminhada, em especial Clarissa, “orgânicos”, gurias da biotec, amigos do yoga, gurias de Concórdia. Muito obrigada por proporcionarem momentos tão felizes e estarem por perto.

Ao meu companheiro, Maurilio, por me apoiar em todos os momentos, seja em casa, no trabalho ou nos caminhos da vida. Obrigada por tornar tudo mais leve e feliz! Você é essencial nessa trajetória.

Finalmente, um agradecimento especial a minha Família. Pai e Mãe, sem vocês nada disso seria possível; vocês são minha base, força e amor maior. Tay, você ilumina minha vida; junto ao Guili e Augusto a torna mais feliz e completa. Obrigada, amores, por estarem sempre ao meu lado e darem sentido a tudo isso.

## Índice

<b>Parte 1</b> .....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Abreviaturas .....	9
1. Introdução.....	11
1.1 Proteínas de Choque Térmico .....	11
1.1.1 HSP70.....	12
1.1.2 HSP70 extracelular .....	13
1.1.2.1 Papel no meio extracelular .....	14
1.2 O Receptor para Produtos finais de Glicação Avançada (RAGE).....	16
1.2.2 Expressão de RAGE.....	18
1.2.3 RAGE e Pulmão .....	19
1.2.3.1 Linhagem celular A549.....	20
1.3 Situação biológica: câncer e inflamação .....	20
1.3.2 Relação entre RAGE e HSP70 .....	21
2 Objetivos.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específico .....	23
<b>Parte 2</b> .....	24
3. Resultados.....	25
<b>Parte 3</b> .....	50
4. Discussão .....	51
5. Conclusão.....	58
6. Perspectivas.....	60
7. Referências Bibliográficas .....	61
8. Lista de Figuras e Tabelas.....	65

## **Parte 1**

## Resumo

A proteína de choque térmico de 70 kD (HSP70) foi bem caracterizada como uma chaperona molecular intracelular. Recentemente, novas funções extracelulares foram descritas para esta proteína, em que a HSP70 é secretada ativamente em condições inflamatórias. Atuando como DAMPs, a HSP70 extracelular (eHSP70) interage com receptores de membrana, como TLRs, e ativa vias inflamatórias. O RAGE, por sua vez, é um receptor de reconhecimento de padrões e possui expressão aumentada em várias doenças relacionadas a um estado pró-inflamatório crônico. Uma das principais consequências da ligação de um agonista ao RAGE é a ativação dependente de ERK1/2 de NF- $\kappa$ B, que leva à expressão de TNF- $\alpha$  e outras citocinas. Neste contexto, o RAGE surge como candidato a interagir com eHSP70 e modular respostas celulares. O objetivo deste trabalho é elucidar se a eHSP70 é capaz de evocar sinalização dependente de RAGE utilizando células de câncer de pulmão humano A549, as quais expressam constitutivamente RAGE. A interação física entre eHSP70 e RAGE foi confirmada por imunoprecipitação. O tratamento com eHSP70 causou a fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK, e o silenciamento de RAGE inibiu apenas a ativação de ERK1/2. Além disso, a transativação de NF- $\kappa$ B relacionada a presença de eHSP70 foi prejudicada pela diminuição dos níveis de RAGE, assim como a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) também estimuladas por eHSP70. Finalmente, o meio condicionado de células A549 tratadas com eHSP70 causou efeitos diferenciais na expressão de citocinas de monócitos U937 quando a expressão de RAGE em A549 é inibida. Juntos, os nossos resultados descrevem a eHSP70 como um possível agonista RAGE capaz de influenciar a interação entre o câncer e as células do sistema imunológico.

## Abstract

Heat shock protein 70 (HSP70) has been well characterized as an intracellular molecular chaperone. Recently, novel extracellular actions have been described for this protein, where HSP70 is actively released in inflammatory conditions. Acting as DAMPs, extracellular HSP70 (eHSP70) interacts with membrane receptors, like TLRs, and activates inflammatory pathways. The receptor for advanced glycation end products (RAGE), in turn, is a pattern-recognition receptor and its expression is increased in several diseases related to a chronic pro-inflammatory state. One of the main consequences of RAGE ligand-binding is the ERK1/2-dependent activation of NF- $\kappa$ B, which leads to expression of TNF- $\alpha$  and other cytokines. At this context, RAGE emerges as a candidate for interaction with eHSP70 and modulate cellular responses. The purpose of this work is to elucidate if eHSP70 is able to evoke RAGE-dependent signaling using A549 human lung cancer cells, which constitutively express RAGE. Physical interaction between eHSP70 and RAGE was confirmed by immunoprecipitation. Treatment with eHSP70 caused ERK1/2, p38 and JNK phosphorylation, and RAGE knockdown inhibited only ERK1/2 activation. Moreover, eHSP70-evoked NF- $\kappa$ B transactivation was impaired by RAGE knockdown. Also, the stimulation of pro-inflammatory cytokines expression (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) by eHSP70 was inhibited in RAGE-silenced cells. Finally, conditioned medium of eHSP70-treated A549 cells caused differential effects in U937 monocytes cytokine expression when A549 RAGE expression is inhibited. Together, our results evidence eHSP70 as a novel RAGE agonist capable of influence the cross-talk between cancer and immune system cells.



## Lista de Abreviaturas

AGE: produto final de glicação avançada (advanced glycation end-products)

APC: célula apresentadora de antígeno (antigen present cell)

ATP: adenosina trifosfato

DAMP: padrão moléculas associado a dano (damage associated molecular pattern)

ERK: cinase regulada por sinais extracelulares (extracellular signal–regulated kinases)

eHSP70: HSP70 extracelular

HMGB1: anfoterina (high mobility group box 1)

HSP: proteína de choque térmico (heat shock protein)

HSP70: proteína de choque térmico de 70 kD

HSR: resposta a choque térmico (heat shock response)

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-13: interleucina 13

JNK: c- Jun N-terminal cinase (c-Jun N-terminal kinases)

MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógenos (mitogen activated protein kinases)

M1: macrófagos com perfil 1, pró-inflamatório

NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)

PAMP: padrão molecular associado à patógeno (patogen associated molecular pattern)

p38: proteína cinase de 38kD

RAGE: receptor para produtos finais de glicação avançada (receptor for advanced glycation endproducts)

S100: família proteica S100

sRAGE: RAGE solúvel

TAMs: macrófagos associados a tumores (tumor associated macrophages)

TGF- $\beta$ : fator de transformação de crescimento fator (transforming growth factor beta)

Th2: linfócitos T auxiliares (helper) com perfil 2, anti-inflamatório

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral (tumor necrosis fator alpha)

T CD4<sup>+</sup>: linfócitos T auxiliares

T CD8<sup>+</sup>: linfócitos T citotóxicos

## 1. Introdução

### 1.1 Proteínas de Choque Térmico

A resposta “Heat Shock” -HSR (do inglês Heat Shock Response) é um dos mais primitivos e conservados sistemas de defesa celular conhecidos. Essa resposta é rápida e ocorre através da atividade de proteínas de choque térmico (do inglês Heat Shock Proteins –HSPs). Um estudo realizado em 1974 demonstrou que a síntese de um grupo de proteínas foi induzida diante de um choque térmico em *Drosophilla* [1]. Mais tarde, foi descrito que essas proteínas também estão presentes em outros organismos, desde bactérias até seres humanos [2].

Atualmente, sabe-se que as HSPs constituem uma família proteica extremamente conservada durante a evolução. Elas são classificadas de acordo com seus pesos moleculares, que variam de 7 a 110 kD, e são encontradas em diversos compartimentos celulares, incluindo núcleo, citoplasma e mitocôndrias.

Algumas proteínas da família das HSPs, além de serem estimuladas durante situações de estresse, possuem expressão constitutiva. Ou seja, elas estão presentes nos organismos sob condições normais e desempenham papéis vitais na célula. Classicamente, essas HSPs funcionam como chaperonas moleculares dependentes de ATP, transportando diversas proteínas intracelulares em células sob estresse ou em condições normais, auxiliam no dobramento e na estabilização de proteínas intracelulares danificadas.

Estudos mostram que, além do choque térmico, as HSPs também respondem a outros tipos de estresse celular ambientais, como exposição a metais pesados, agentes oxidantes, hipóxia [3]. Ainda, estas proteínas exercem um importante papel na proteção celular contra diversas formas de injúria (Tabela I), em que as proteínas da família das HSPs, particularmente as HSP70, têm se destacado.

Condições de estresse ambientais	Condições de injúria	Condições normais
Calor Metais Pesados Compostos orgânicos Elementos oxidantes	Infecção microbiana Trauma tecidual Lesões genéticas	Ciclo celular Desenvolvimento embrionário Diferenciação celular Estímulo hormonal Crescimento microbiano

Tabela I: Indutores de HSPs. Adaptado de Schlesinger et. al [3].

### 1.1.1 HSP70

As HSP70 são uma das famílias de proteínas de HSPs e possuem 70 kD. O seu domínio N terminal é capaz de se ligar a ATP com grande afinidade e o domínio ligante de peptídeos é capaz de interagir com proteínas. Através da ativação destes domínios, as HSP70 exercem seu papel de chaperona no meio intracelular: atuam como um controle fino de qualidade sobre proteínas mal dobradas (previnem agregação) e auxiliam proteínas recém sintetizadas a obterem conformação pós-traducional correta [4].

Exercendo papel citoprotetor em situações adversas, a modulação dos níveis de HSP70 por estímulos exógenos é amplamente considerada como um parâmetro de estresse celular. Em situações de injúria, a expressão e atividade da HSP70 é capaz de ser aumentada. Estas proteínas interagem com reguladores chave de muitas vias de transdução de sinal que controlam a homeostase celular, proliferação, diferenciação e morte celular [4]. Durante eventos de lesão cerebral e isquemia, por exemplo, a HSP70 é capaz de suprimir a resposta imune inata e conduzir a uma melhora neurológica [5, 6].

Sabe-se que a indução de HSP70 é capaz de inibir a apoptose, uma vez que atua sobre a via dependente de caspases em várias etapas [4]. Diante disso, em células tumorais, observou-se que os níveis de HSP70 se correlacionam com o aumento da malignidade e resistência à terapia [7]. Por outro lado, doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, caracterizam-se por apoptose excessiva; em diferentes modelos, a super expressão de HSP70 mostrou ser capaz de reduzir os sintomas neurodegenerativos [8, 9]; estes trabalhos ainda sugerem

tratamentos através da regulação do estresse celular e de vias que envolvem chaperonas.

### 1.1.2 HSP70 extracelular

Quando células são expostas a alterações ambientais, tais como como depleção de nutrientes, elas comunicam-se para ajustar seus metabolismos para a nova condição; o mesmo ocorre quando células estão sob situações estressantes. Neste contexto, liberam sinais para alertar o restante do organismo que uma situação potencialmente prejudicial está se desenvolvendo. Dentre estes sinais, encontram-se as HSPs, que são expressadas e translocadas para o meio extracelular em resposta ao insulto.

Primeiramente, acreditava-se que HSPs estavam presentes no meio extracelular através de eventos de necrose [10]. Entretanto, estudos recentes mostram que as HSP70 podem ser translocadas para o meio extracelular através de mecanismos não-clássicos. Alguns mecanismos foram propostos para explicar tais eventos. Um deles propõe a secreção através da via lisossomal-endossomal [11]. Posteriormente, foi descrito a liberação de HSP70 por grânulos tipo secretores [12]. Outros autores ainda argumentam que há um terceiro mecanismo para a exportação de HSP70, que é mediado por um processo associado à membrana, o qual pode ser exocitose ou evaginação inversa [13, 14].

Na literatura, uma gama de trabalhos relata a presença de HSP70 no meio extracelular particularmente após o estabelecimento de diversas condições patológicas [15]. Evidências mostram que os níveis séricos de eHSP70 aumentam em grupos experimentais com injúria severa após trauma [16]. Os níveis séricos da proteína também se encontram elevados em pacientes com câncer pancreático, o que permite seu uso como biomarcador adjuvante para esta doença [17]. Nosso grupo de pesquisa realizou um trabalho utilizando amostras de soro de pacientes sépticos, nos quais foram quantificados os níveis de HSP70 extracelular e marcadores de estresse oxidativo. Os resultados revelam que os níveis séricos de HSP70 nesses pacientes são modulados de acordo com o estado redox do soro, o qual varia entre estados anti e pró-oxidantes [18]. Observou-se também que houve uma taxa de mortalidade significativamente maior nos pacientes que apresentaram soro pró-oxidante e altos níveis de HSP70.

### 1.1.2.1 Papel no meio extracelular

As HSP70 extracelulares (eHSP70) fazem parte das moléculas classificadas como padrões moleculares associados a dano (do inglês - damage associated molecular pattern, DAMP), assim como proteínas das famílias da HMG e S100 [19]. Uma vez no meio extracelular, as HSP70 reconhecem diversos receptores em diferentes tipos de células [20], como células neuronais, células do sistema imunológico ou, ainda, são capazes de entrar na circulação (Figura 1).

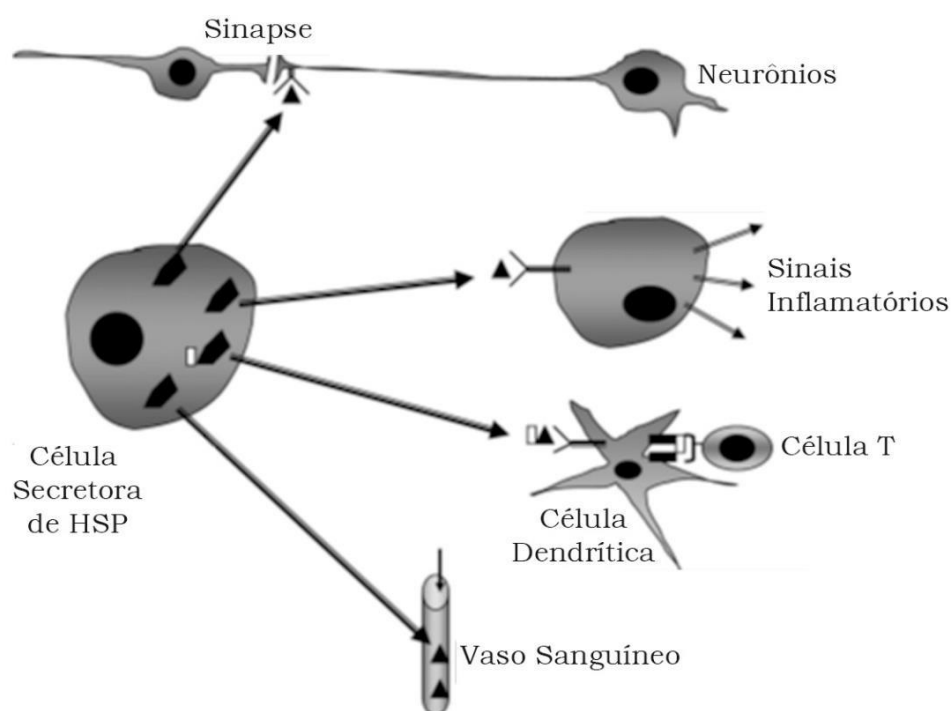


Figura 1: Secreção de HSPs e interação com diversas células-alvo. Adaptado de Calderwood et. al [21]

A multiplicidade de receptores em que as HSP70 conseguem se ligar pode indicar especialização para funções individuais. Receptores reconhecedores de padrão (PRR, do inglês pattern recognition receptors) tais como o TLR (do inglês toll-like receptor), CD40 e CCR5, estão relacionados com a ativação de vias de sinalização intracelular, enquanto que receptores CD91 e SR podem desempenhar papéis mais importantes na internalização das HSPs [21].

Recentemente, pesquisadores de diversas áreas tentam elucidar sua função no meio extracelular. Alguns relatos demonstram que a proteína desempenha um papel cito estimulador através da interação com receptores TLR e CD-14. Uma vez ligada nestes, a eHSP70 ativa vias de sinalização dependentes de NF- $\kappa$ B, que aumenta a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias [22, 23]. Isso atribuiu à HSP70 uma classificação de “chaperocina”, já que possui um papel duplo, atuando como chaperona e citocina [22, 24].

Por outro lado, na literatura também são encontrados trabalhos que mostram o papel anti-inflamatório da HSP70. Autores sugerem que seus efeitos pró-inflamatórios poderiam ser atribuídos ao conteúdo residual de LPS proveniente da produção recombinante de HSP70, e não da proteína em si [25]. Nesse contexto, em células sob condições estressantes, a expressão de HSP70 é importante para a indução, manutenção e ativação específica de células T regulatórias. A eHSP70 também seria capaz de se ligar a TLR2 e ativar produção de IL-10 através de ERK [26], sendo que agonistas deste receptor são capazes de ativar vias celulares anti-inflamatórias [27]. Assim, esses trabalhos atribuem à eHSP70 um papel imunossupressor em determinadas situações.

Exercendo papel imunomodulador, as eHSP70 também são capazes de ativar macrófagos com perfil M1 (pró-inflamatório), estimulando a resposta imune inata e preparando a defesa do organismo. A interação da HSP70 exógena com balsas lipídicas da membrana plasmática promove um aumento de fagocitose de partículas antigênicas. Isso leva ao aumento do processamento e apresentação de antígenos internalizados através da via endocítica MHC de classe II para linfócitos T CD4<sup>+</sup> [28], iniciando assim uma resposta imunológica adaptativa.

Ainda no espaço extracelular, a HSP70 pode ser conjugadas à peptídeos antigênicos, como de tumores ou vírus, e interagir com células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas. Os peptídeos podem ser transferidos para moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I através do processo conhecido como apresentação cruzada; estes complexos podem ser reconhecidos por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, levando à ativação de células T [29]. Ainda, a HSP70 complexada a peptídeos também é capaz de atuar sobre células tumorais, ativando vias de sinalização MAPK e exercendo atividade proliferativa [30].

## 1.2 O Receptor para Produtos finais de Glicação Avançada (RAGE)

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana multi-ligante da superfamília das imunoglobulinas. O RAGE é composto por uma cauda intracelular, domínio transmembrana e um domínio extracelular contendo três domínios do tipo imunoglobulinas (um domínio variável –tipoV- e dois constantes-C1 e C2). O Domínio tipo-V é essencial para a interação com o ligante, e a sua deleção dá origem a forma N-truncada. A forma C-truncada ou solúvel (sRAGE), pode se originar através de splicing alternativo ou clivagem proteolítica. O sRAGE não possui os domínios transmembrana e citoplasmáticos, podendo assim atuar como um bloqueador do receptor: sRAGE forma complexos com antagonistas do receptor, impedindo que estes se liguem ao RAGE na membrana plasmática [31]. A figura abaixo representa o receptor e suas isoformas:

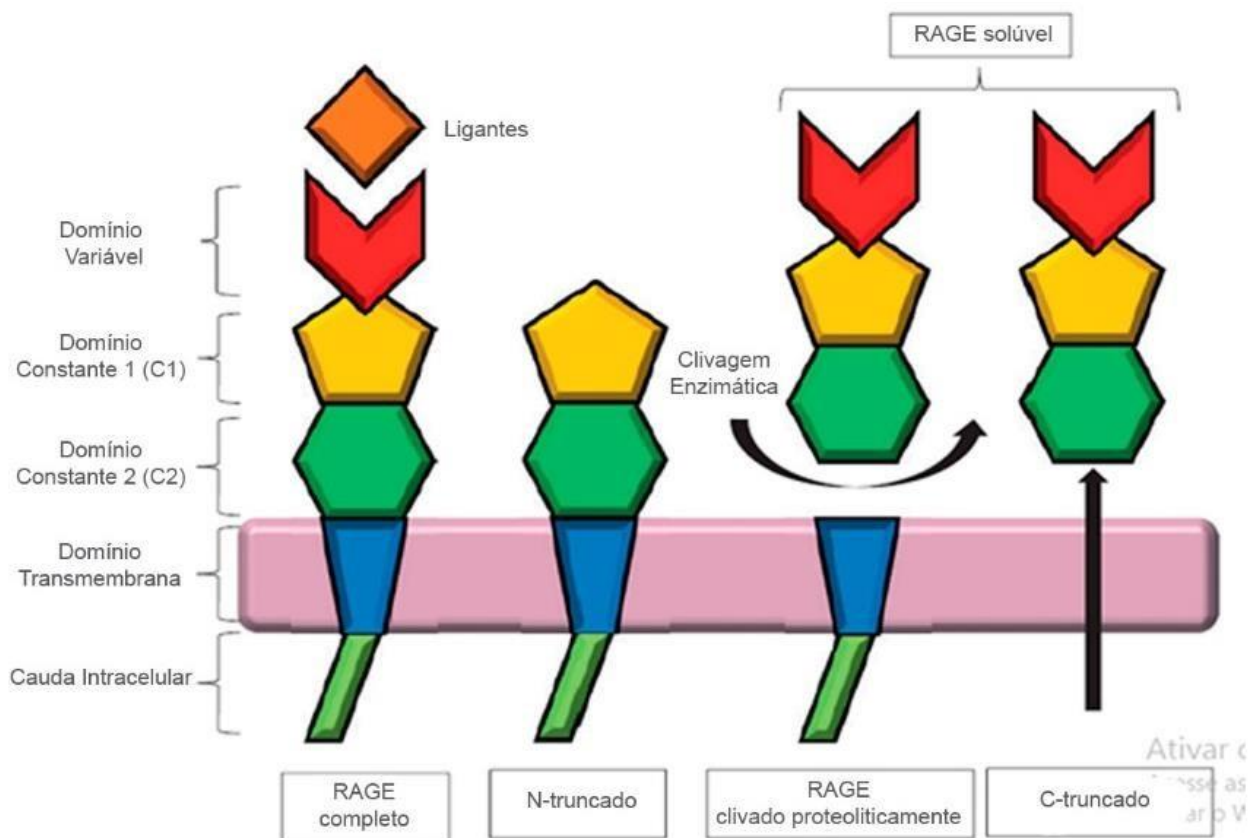


Figura 2: Representação esquemática do RAGE e suas formas variantes. Adaptado de Chuah et. al. [31].



O RAGE é um receptor capaz de reconhecer padrões associados a danos (DAMPs) e a patógenos (PAMPs). Inicialmente, ele foi descrito como receptor para produtos finais de glicação avançada (AGE); atualmente, são conhecidas várias moléculas que atuam como agonistas de RAGE: proteína S100B, anfoterina (HMGB1), peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e lipopolissacarídeo (LPS) [32, 33].

A interação de um ligante com RAGE leva à indução da ativação de múltiplas rotas de sinalização celular que variam de acordo com o agonista, tipo celular e microambiente, mediando assim, diversas respostas celulares (Figura 3). Sabe-se que RAGE é capaz de ligar diretamente à ERK através da sua região citoplasmática [34] e pode participar de transduções de sinais cooperativamente com receptores do tipo Toll-like [35]. Um dos efeitos principais da ativação de RAGE é a ativação de NF- $\kappa$ B e a indução de vias pró-inflamatórias controladas por esse fator de transcrição [36].

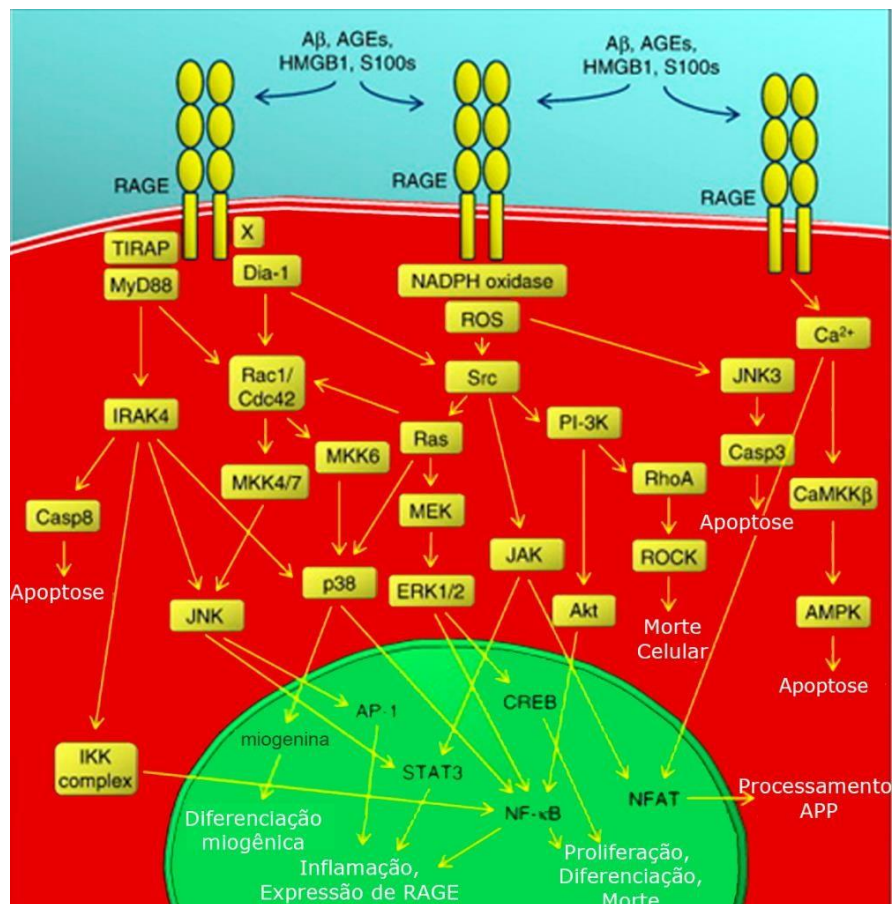


Figura 3: O acoplamento de RAGE por múltiplos ligantes ativa várias vias de sinalização. Adaptado de Sorcia et. al. [37].

Em muitas patologias a RAGE é o principal receptor de moléculas que medeiam a progressão da doença e o estado inflamatório crônico, tais como a artrite reumatoide,

doença de Alzheimer, arteriosclerose, doença renal crônica e alguns tipos de câncer [38]. O acúmulo de agonistas em locais de lesão tecidual e inflamação é capaz de ativar diversas vias de sinalização celular [39].

O gene RAGE é um elemento responsivo à NF-kB, uma vez que possui um sítio de ligação funcional ao NF-kB em seu promotor proximal [40]. Assim, durante a sua ativação, ocorre um mecanismo de retroalimentação positiva da sua própria expressão. Dessa forma, o aumento da expressão de RAGE torna-se um fator de progressão para amplificar ou sustentar respostas imunes e inflamatórias. Nesse contexto, as estratégias destinadas a reduzir a sinalização RAGE podem contribuir para a redução da resposta inflamatória, especialmente em situações inflamatórias crônicas, com potenciais benefícios terapêuticos [41].

### 1.2.1 Expressão de RAGE

Ao contrário da expressão constitutiva de RAGE durante o desenvolvimento embrionário, na vida adulta a expressão de RAGE é estritamente regulada. Ela aumenta em diversas patologias relacionadas a um estado pró-inflamatório crônico, em situações onde há acúmulo de seus ligantes e mediadores inflamatórios.

Em tecidos saudáveis, sua expressão é normalmente basal. Entretanto, identificou-se que algumas células pulmão possuem expressão elevada e constitutiva de RAGE durante a vida adulta (Figura 4), que se distingue significativamente quando comparado a outros tecidos saudáveis [42]. Assim, acredita-se que o RAGE exerça funções distintas no pulmão em relação a outros órgãos.

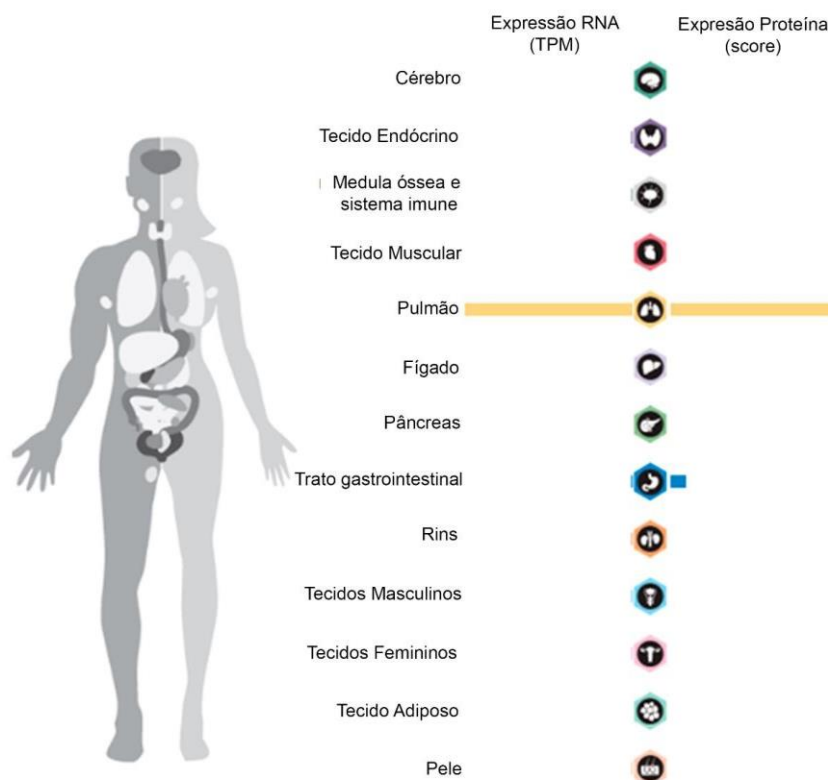


Figura 4: Expressão de RAGE (gene e proteína) de acordo com o tecido. Adaptado de <<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000204305-AGER/tissue>>

### 1.2.2 RAGE e Pulmão

A expressão de RAGE é encontrada elevada no epitélio bronquiolar, macrófagos pulmonares, células epiteliais de pulmão, células alveolares tipo II (ATII) [43] e, mais especificadamente, em células alveolares do tipo I (ATI) [44]. Uma vez que o receptor possui expressão elevada no pulmão e localização específica em células ATI, acredita-se que o mesmo exerça papel importante na manutenção da homeostase pulmonar.

No contexto de desenvolvimento, tem sido demonstrado que em pulmões de ratos, os níveis de mRNA e proteína de RAGE apresentam um aumento gradual desde o feto até a idade adulta [45]. Visto que em recém-nascidos o pulmão ainda não está completamente alveolarizado, autores sugerem que o aumento nos níveis de RAGE pode corresponder à alveolarização e expansão da população de células ATI [46].

Além disso, o RAGE também exerce uma série de papéis fisiológicos no pulmão, incluindo a modulação da proliferação celular, adesão aos componentes da matriz

extracelular, proliferação e migração [46]. Acredita-se que no pulmão o RAGE possui papel protetor, e que a diminuição dos seus níveis resulta no desenvolvimento de doenças [47]. Em condições em que os níveis de RAGE são modulados, alguns estados patológicos incluindo câncer e fibrose podem ser desenvolvidos. Estudos mostram que a superexpressão de RAGE em células epiteliais alveolares tipo I saudáveis do pulmão é seguida por uma diminuição rápida da malignidade. Este é um paradoxo impressionante, uma vez que em todos os outros tipos de células o padrão de expressão RAGE segue a direção oposta, sugerindo o envolvimento de RAGE no bom funcionamento das células pulmonares [48].

Acredita-se que o desenvolvimento de patologias podem se associar tanto com a diminuição ou aumento da expressão do receptor, dependendo do tecido de ocorrência; contudo, mais estudos devem ser feitos para esclarecer essa relação [46].

#### 1.2.2.1 Linhagem celular A549

As células da linhagem humana A549 são classificadas como não pequenas células de câncer de pulmão e possuem propriedades alveolares tipo II. [49]. A expressão de mRNA e proteína de RAGE em A549 apresentam níveis menores em relação à uma célula ATII saudável, uma vez que a diminuição da expressão do receptor é proporcional ao nível de tumorigênese no pulmão [50, 51].

Contudo, a expressão de RAGE em A549 é elevada quando comparada à outras linhagens celulares e células não-pulmonares saudáveis, o que a torna um modelo celular válido para o estudo do receptor. [52]

### 1.3 Situação biológica: câncer e inflamação

A inflamação aguda é uma resposta a uma alteração induzida por patógeno ou um insulto físico ou químico, que tem como finalidade eliminar a fonte do dano e restaurar a homeostase no tecido afetado. Caso as células do sistema imunológico não sejam capazes de responder da forma mais eficaz, a situação inflamatória é intensificada. Dessa forma, a inflamação crônica desencadeia eventos celulares que podem levar à transformação maligna das células e promover carcinogênese [53].

No câncer, encontram-se associados ao tumor células do sistema imune, as quais desempenham papel fundamental no combate ou desenvolvimento do tumor. Este, por sua vez, desenvolve diversos mecanismos para contornar a resposta imunológica e modulá-la, a fim de poder crescer e se desenvolver [54]. Vários mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10, estão relacionados com a iniciação e progressão do câncer [53].

A complexidade de eventos celulares e a multiplicidade de respostas envolvidos com o câncer o tornam uma enfermidade difícil de ser tratada. A Organização Mundial de Saúde (OMS), revela que a doença está crescendo em um ritmo considerado alarmante em todo o mundo. Em 2012, os casos registrados chegaram a 14 milhões por ano, número que deve alcançar 22 milhões por ano nas próximas duas décadas. Os tipos de câncer mais comum registrados naquele ano foram o de pulmão (1,8 milhão de casos, 13% do total) – sendo também o tipo com maior mortalidade (1,6 milhão, 19,4% dos falecimentos)-, seguido de mama e intestino grosso.

### 1.3.1 Relação entre RAGE e HSP70

Recentemente, foi demonstrado através de uma triagem de ELISA a ligação do RAGE com a HSP70 [55]. Outro estudo atual realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou através de técnicas de ancoragem molecular (docking molecular) e de fluorescência por proximidade, como a HSP70 extracelular é capaz de interagir fisicamente com o RAGE; adicionalmente, este estudo relatou que o receptor é capaz de formar oligômeros através de seus domínios variáveis (V), aumentando o local de interação com peptídeos, permitindo-o interagir com proteínas maiores, como a HSP70 [56].

A ativação e sinalização de RAGE promove a intensificação da resposta inflamatória durante o desenvolvimento do tumor [57], uma vez que é capaz de se ligar a uma gama de moléculas liberadas no meio extracelular durante este estado patológico [58]. Entre os diversos moduladores da resposta inflamatória mediada por RAGE, as HSP70 aparecem como potenciais reguladores em múltiplos níveis. Elas são capazes de serem secretadas ativamente durante o desenvolvimento do câncer, atuando como sinalizador extracelular capaz de ativar e modular o sistema imunológico e exercer função anti-apoptótica [7, 12, 17, 59]. Dessa forma, as eHSP70s podem contribuir para a sobrevivência, tumorigênese e participar da imunidade tumoral [60].

Vários estudos tentam desvendar os mistérios por trás do desenvolvimento do câncer em busca de mecanismos para combatê-lo. Tendo em vista os processos biológicos em que eHSP70 e RAGE estão envolvidos, torna-se interessante compreender como as vias destas duas proteínas podem se relacionar e modular a resposta tumoral.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Através de uma abordagem *in vitro*, esta dissertação tem como objetivo geral elucidar se HSP70 exógena é capaz de ativar respostas celulares através do receptor para produtor finais de glicação avançada (RAGE), e analisar quais as vias de sinalização estão envolvidas nesse processo.

### 2.2 Objetivos Específico

- I. Demonstrar interação física entre HSP70 extracelular (eHSP70) e RAGE no modelo celular de estudo (linhagem A549);
- II. Avaliar a ativação de vias de sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B frente ao estímulo exercido por eHSP70;
- III. Avaliar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidas nas respostas via eHSP70-RAGE;
- IV. Avaliar o envolvimento de RAGE nas respostas celulares desencadeadas por HSP70, através do silenciamento do receptor;
- V. Avaliar a modulação da resposta imunológica pelo meio tumoral, através do uso do meio condicionado de A549 e monócitos U937.

## Parte 2



### 3. Resultados

Os resultados serão apresentados em forma de artigo, o qual está submetido e em processo de revisão na revista “Cellular Physiology and Biochemistry”.

**Dear Dr. Nauana Somensi,**

Thank you for submitting your manuscript to Cellular Physiology and Biochemistry.

Please use for further correspondence the number: 2016MS1305

For us to start processing your manuscript, we would need you to fill out the attached Submission/Statement form, which should be signed by every co-author with his/her original (handwritten) signature. In addition, find enclosed the Statement/Color form, which should be filled by the corresponding author.

Please return both forms by e-mail to us, so that we could send the manuscript to the reviewers.

Please note that the page charges will be 260,- CHF per printed page.

**Best regards,**

**Tatsiana Castor**

---

**Dear Dr. Nauana Somensi,**

Thank you for sending us the signed Submission/Statement and Statement/Color forms, for the above mentioned manuscript submitted to *Cellular Physiology and Biochemistry*. Your manuscript will be processed by reviewers.

We wish you a very Happy Holiday season and a peaceful and prosperous New Year!

**Best regards,**

**Tatsiana Castor**

Extracellular HSP70 binds to RAGE and activates pro-inflammatory signaling in A549 human lung cancer cells.

**Nauana Somensi<sup>\*,†</sup>, Pedro Ozorio Brum<sup>\*</sup>, Alfeu Zanotto-Filho<sup>‡</sup>, Vitor de Miranda Ramos<sup>\*</sup>, Diana Carolina Rostirolla<sup>\*</sup>, Maurilio da Silva Morrone<sup>\*</sup>, José Claudio Fonseca Moreira<sup>\*</sup>, Daniel Pens Gelain<sup>\*,†</sup>.**

<sup>\*</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-035, Brazil

<sup>†</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

<sup>‡</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

To whom correspondence should be addressed: Nauana Somensi, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Rua Dr Ramiro Barcelos, 2600, anexo, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 90035-003 Telephone: +55 (51) 33085577; E-mail: [nauana.somens@gmail.com](mailto:nauana.somens@gmail.com)

Keywords: eHSP70, RAGE, ERK, NF- $\kappa$ B, inflammation, lung cancer

## Abstract

Heat shock protein 70 (HSP70) has been recently described with extracellular actions, where it is actively released in inflammatory conditions. Acting as DAMPs, extracellular HSP70 (eHSP70) interacts with membrane receptors, like TLRs, and activates inflammatory pathways. At this context, the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) emerges as a possible candidate for interaction with eHSP70. RAGE is a pattern-recognition receptor and its expression is increased in several diseases related to a chronic pro-inflammatory state. One of the main consequences of RAGE ligand-binding is the ERK1/2-dependent activation of NF- $\kappa$ B, which leads to expression of TNF- $\alpha$  and other cytokines. The purpose of this work is to elucidate if eHSP70 is able to evoke RAGE-dependent signaling using A549 human lung cancer cells, which constitutively express RAGE. Physical interaction between eHSP70 and RAGE was confirmed by immunoprecipitation. Treatment with eHSP70 caused ERK1/2 activation and NF- $\kappa$ B transactivation impaired by RAGE knockdown. Moreover, the stimulation of pro-inflammatory

cytokines expression by eHSP70 was inhibited in RAGE-silenced cells. Finally, conditioned medium of eHSP70-treated A549 cells caused differential effects in monocytes cytokine expression when A549 RAGE expression is inhibited. Our results evidence eHSP70 as a novel RAGE agonist capable of influence the cross-talk between cancer and immune system cells.

#### Footnotes

1. This work was funded by Brazilian research funding agencies CNPq (#400437/2013-9, #443514/2014-3 and #401260/2014-3), FAPERGS (#2299-2551/14-6), CAPES and PPGBCM/UFRGS.
2. The abbreviations used in title and manuscript are: Ab, antibody, B2M, beta-2-microglobulin; eHSP70, extracellular heat-shock protein 70 kDa; ERK, extracellular signal-regulated kinases; GNB2L, Guanine nucleotide-binding protein beta-peptide 2-like 1 ; IL-1 $\beta$ , interleukin 1 beta; IL-6, Interleukin 6; IL-13, Interleukin 13; IP, immunoprecipitation; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activate protein kinases; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; RAGE, receptor for advanced glycation endproducts; RAGE-siRNA, siRNA specific for RAGE; Scrb-siRNA, siRNA scrambled sequence; TLR, Toll-like receptor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta.; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; WB, western blot.

#### 1. Introduction

Heat shock proteins (HSP) are highly conserved proteins found in all prokaryotes and eukaryotes. Heat shock protein 70 (HSP70) has been well characterized as an intracellular molecular chaperone <sup>1</sup> involved in nascent and damaged intracellular protein refolding. A wide variety of stressful alterations, including environmental, pathological or physiological stimuli induce a marked increase in intracellular HSP synthesis <sup>2; 3</sup>. Recent studies show that HSP70 can also be found outside the cell, especially under specific stress conditions <sup>4; 5</sup>. It was first believed that origin of extracellular HSP was due to cell necrosis <sup>6</sup>, but other studies described the active secretion of HSP70 by alternatives pathways <sup>7; 8; 9</sup>. In extracellular environment, HSP70 can form complexes with peptides followed by antigen cross-presentation, or HSP70 itself can interact with receptors present in APCs surface <sup>5; 10; 11</sup>. Acting as damage associated molecular pattern (DAMP) and chemokine, extracellular HSP70 (eHSP70) is capable to create potent innate immune response: it induces secretion of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nuclear translocation of Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) <sup>12</sup>. Growing number of surface receptors for HSPs, such as Toll-like receptor (TLR) 2 and 4, have

been associated with phagocytosis and are involved in the induction of pro-inflammatory response<sup>13</sup>.

The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a transmembrane receptor of the immunoglobulin superfamily that can recognize some patterns associated to pathogen (PAMPs) and damage (DAMPs) capable of binding a broad repertoire of ligands<sup>14</sup>. RAGE has constitutive expression during embryonic development, but in adulthood its expression is regulated. Exceptionally, RAGE has been found to be constitutively expressed at high levels in skin and lung<sup>15</sup>. In other tissues, RAGE expression may be induced by accumulation of its ligands and/or inflammatory mediators.

In many pathologies RAGE is the major receptor for molecules that mediate disease progression and chronic inflammatory state, such as rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease, arteriosclerosis, chronic kidney disease and some cancers<sup>16</sup>. Accumulation of agonists at sites of tissue injury and inflammation has been found to induce intracellular activation of diverse cellular pathways. Sustained stimulation of RAGE promotes a positive feedback mechanism that reinforces its own expression, mediated mainly by NF- $\kappa$ B<sup>17</sup>. Thereby, increase of RAGE expression is a progression factor to amplifying or sustain immune and inflammatory responses<sup>18</sup>. At this context, RAGE emerges as a potential mediator of eHSP70 signaling actions. The expression and secretion of this chemokine is increased in several diseases related to a chronic pro-inflammatory state, concomitantly with accumulation of other RAGE ligands. Besides, many intracellular pathways believed to be elicited by eHSP70 solely via other receptors (e.g. TLR2 or TLR4) are strongly influenced by RAGE, such as ERK1/2-mediated activation of NF- $\kappa$ B. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of eHSP70 on the regulation of pro-inflammatory pathways in A549 human non-small lung cancer cells, which constitutively express RAGE, by assessing the signaling modulation of such mechanism via this receptor.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Cell Culture

The human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549 (kindly donated by Prof. Claudia Simoes, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil) was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 $\times$  antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich). Cells were cultured in at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. When cultures reached confluence, adherent A549 were trypsinized and seeded on culture plates at a density of approximately 20 x 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>. When performing phosphorylation and immunoprecipitation

experiments, 10% SFB medium was replaced for fresh serum-free RPMI medium two hours before eHSP70 treatments; for long-time exposition treatments, culture medium was replaced for fresh serum-free RPMI medium. The human myeloid monocyte cell line U937 (kindly donated by Prof. Fábio Klamt, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 × antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich). When reached confluence, non-adherent U937 was washed and resuspended in A549 conditioned medium. After 24 hours medium was replaced for fresh 10% FBS RPMI medium and maintained for additional 24 hours before harvest for RT-qPCR analysis.

## 2.2 Chemicals and Treatments

Human recombinant HSP70 endotoxin-free was purchased from Abcam. Human recombinant HMGB1, U0126, cisplatin and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich. RAGE antagonist FPS-ZM1 was purchased from Merck-Millipore and dissolved in DMSO at 1 mg/mL. All stock solutions aliquots were stored at -20°C. All chemicals were diluted in serum-free medium to perform treatments. Pharmacological inhibitors were added to the cells 30 minutes before adding eHSP70.

## 2.3 Immunoprecipitation

A549 cells were treated with eHSP70 or HMGB1 for thirty minutes and collected in cold PBS. Cells were centrifuged at 5,000 x g for 5 minutes and lysed in extraction buffer (pH7.4) containing 20 mM HEPES, 0,8% IGEPAL, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF in the presence of a mixture of protease inhibitors (Roche Applied Science). Cells were incubated on ice for 30 minutes and centrifuged for 1 minute at 14,000 x g, 4°C, and then the supernatant was transferred to a new tube. To remove non-specific binding, cells were incubated with 25 µL protein A/G (Pierce) for 15 minutes on ice and centrifuged at 2000 x g for 1 minute. A volume of 50 µL of supernatant was collected as lysate control and the remaining were mixed to NaCl 0.9% (proportion of 1:1 to extraction buffer). Cell homogenates were incubated overnight with polyclonal anti-RAGE (Santa Cruz, sc-5563), anti-HSP70 (Santa Cruz, sc-1060) or anti-HMGB1 (Santa Cruz sc-26351) at 2 µg per mg of total protein by reaction. The solutions were then incubated with 50 µL protein A/G for 4 hours by gentle rocking at 4°C followed by centrifugation for 30 seconds at 3000 x g (4°C). Pellet was washed three times with 500 µL of cell lysis buffer:NaCl 0.9% (1:1). Immunoprecipitates were resuspended in 2x Laemmli buffer (65.8 mM Tris-HCl, 26.3% glycerol, 2.1% SDS, 0.01% bromophenol blue, pH 6.8) with 10% 2-mercaptoethanol and then immunoblotted.

## 2.4 Western Blotting

After treatments, cells were washed in cold PBS and collected in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 % bile salt, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF, pH 7.5), sonicated and protein lysates were clarified by centrifugation. Protein quantification was performed by BCA Protein Assay kit (Sinapse), denatured in Laemmli 4 X 10% 2-mercaptoethanol buffer and heated at 95 °C for 5 minutes. A total of 30 µg of protein was loaded in 11% polyacrylamide gel and transferred by semi-dry system (Trans-blot® SD transfer cell Bio-Rad) to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare Lifesciences). Membranes were washed in Tris-buffered saline Tween-20 [TBS-T; 20 mM Tris– HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20] and blocked in solution of TBS-T with 5% BSA or non-fat milk for 1 hour at room temperature. After, membranes were washed three times in TBS-T and incubated overnight at 4°C with primary antibodies in a dilution of 1:1000: anti-RAGE (Abcam ab37647), anti-RAGE (Santa Cruz , sc-5563), β-actin (Sigma, #1978), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, #4376S and #9101), anti-ERK1/2 (Cell Signaling, #9102), anti-phospho-JNK (Cell Signaling, #9251), anti-JNK (Santa Cruz, sc-571), anti-phospho-p38 (Cell Signaling, #9215S), anti-p38 (Santa Cruz, sc-7972). Afterward, membranes were washed and incubated with species-specific HRP-conjugated secondary antibodies at 1:3000 in TBS-T with 5 % BSA for 2 hours at room temperature. The blot was analyzed by adding SuperSignal® West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) and captured by CCD camera (GE ImageQuant LAS 4000).

## 2.5 siRNA knockdown

Human RAGE (#9438) and scrambled sequence (AM4635) small-interfering RNA were purchased from Invitrogen. Reverse transfection of siRNAs was performed using siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent (Ambion®, Applied Biosystems Inc.) and Opti-MEM following manufacturer's instructions. A549 cells were transfected with 25 nM and 50 nM of siRNAs for 48 hours in 10 % SFB medium without antibiotic. Knockdown efficiency was evaluated by RT-qPCR and western blotting.

## 2.6 Real Time qPCR

After treatments, cells were washed in cold PBS buffer and samples and scrapped in TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). RNA extraction was performed following manufacturer's instructions. RNAs were treated with DNase I (Invitrogen®) following reverse transcription (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix Invitrogen®). Real time quantitative polymerase

chain reaction (RT-qPCR) was performed using GoTaq qPCR MasterMix (Promega), 150 ng cDNA and 100nM of each primer: GAPDH (forward: 5' AATCCCATCACCATCTTCCAG 3', reverse: 5' TTCACACCCATGACGAACAT 3'); GNB2L (forward: 5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG 3', reverse: 5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTC 3'); B2M (forward: 5' TGCTGTCTCCATGTTTGAT 3', reverse: 5' TCTCTGCTCCCCACCTCTA 3'); RAGE (forward: 5' GTGAAGGAACAGACCAG 3', reverse: 5' GAAGCTACAGGAGAAGGTGG 3'); TNF- $\alpha$  (forward: 5' GATCCCTGACATCTGGAATCTG 3', reverse: 5' GAAACATCTGGAGAGAGGAAGG 3'); IL1- $\beta$  (forward: 5' GCATCCAGCTACGAATCTC 3', reverse: 5' ATTCTCCTGGAAGGTCTGT 3'); IL-6 (forward: 5' AATGAGGAGACTTGCCTGGTG 3', reverse: 5' GCAGGAACTGGATCAGGACTTT 3'); IL-13 (forward: 5' GTCATTGCTCTCACTTGCCTTG 3', reverse: 5' GTCAGGTTGATGCTCCATACCA 3'); TGF- $\beta$  (forward: 5' TTCCTGCTTCTCATGGCCAC 3', reverse: 5' GAGGTCCTTGCGGAAGTCAA 3'). Results were expressed in relation to constitutive normalization gene ( $\Delta$ Ct) and internal non-treated control group ( $\Delta\Delta$ Ct).

### 2.7 Reporter Gene (Luciferase) Assay

A549 cells were plated in 96-well plates and after 24 hours transfected with 100 ng of a vector containing a responsive element to NF- $\kappa$ B driving firefly luciferase (pGL4.32 Luc2P-NF- $\kappa$ B® Promega) and 10 ng constitutive Renilla-luciferase construct (pRL-TK® Promega) per well. The transfection was carried by ViaFect® reagent (Promega) and Opti-MEM. siRNAs particles were transfected along with the plasmids. Cells were also transfected with GFP vector to monitor the efficiency of transfection, and an empty vector was used as negative control. When more than 60% of cells display green fluorescence, NF- $\kappa$ B-luciferase and Renilla transfected cells were treated. At the end of treatments, the cells were lysed and luciferase activity was assessed using the Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Results are expressed in ratio Luciferase/Renilla luminescence relative to control groups.

### 2.8 FACS Analysis

For cell cycle analysis, A549 cells were treated with eHSP70 (1  $\mu$ g/mL) and cisplatin (10  $\mu$ g/mL) for 48 and 72 hours. After these times, 12-well plated cells were trypsinized, centrifuged and washed two times by adding 1 mL of PBS, centrifuging at 1,000 x g for 5 minutes, and the pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of cycle buffer (PBS 1x, 1 mg/mL spermine, 5 mM EDTA, 0,1% IGEPAL, 3  $\mu$ g/mL propidium iodide, 10  $\mu$ g/mL RNase, pH 7.4). Cells were mixed and incubated



on ice for 10 minutes and DNA content was determined by flow cytometry. Ten thousand events were counted per sample. FACS analyses were performed in the Flowjo tree star Software (Ashland, OR, USA) <sup>19</sup>.

### 2.9 Cell Viability Sulforhodamine B Assay

This colorimetric assay evaluates cell numbers indirectly by staining total cellular protein with SRB <sup>20</sup>. A549 cells were plated onto 96-well plates and when culture reached 60% confluence, the culture medium was removed. Increasing concentrations of eHSP70 and FSP-ZM1 or 50nM of siRNAs were added to the cells. After 24 hours of treatment, culture medium was discarded and cells were fixed with 10 % trichloroacetic acid for 1 h at 4°C. Plates were then stained for 30 minutes with 0.4% (wt/vol) sulforhodamine B (SRB) dissolved in 1% acetic acid. Overdye was removed by four washes with 1% acetic acid, until only the dye adhering to the cells was left. Stained cells were dissolved in 100 µL of 10 mM Tris base solution (pH 10.5). The absorbance (OD) of each well was read using SpectraMAX i3 (Molecular Devices) spectrophotometer set at 515 nm. Cell survival was measured as the percentage absorbance compared to the absorbance of a control (non-treated cells).

### 2.10 Statistical Analyses

Analyses were performed with GraphPad Prism 5 and GraphPad Prism 7 softwares. Statistical tests were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple groups comparison or Bonferroni post hoc test to compare selected groups (two parameters) when applicable. Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test was applied to compare multiple groups (two parameters). A  $p < 0.05$  value was considered statistically significant. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard error (SEM). All data presented here are the result of three or more independent experiments. For HeatMap analysis, we first calculate standard score by using the formula  $z = \frac{x-\mu}{\sigma}$ , where  $x$  is the calculate value,  $\mu$  is the mean of the population and  $\sigma$  is the standard deviation of the population. Graph was designed by GraphPad Prism 7 software.

## 3. Results

### 3.1 RAGE physically interacts with eHSP70

To investigate the mechanism and biological consequence of eHSP70 on cells, we sought to first confirm the engagement of this protein to RAGE by immunoprecipitation assay (IP). Human lung carcinoma (A549) cell line, which constitutively expresses RAGE, was treated with eHSP70 for

30 minutes prior to IP. As shown in Figure 1 A, IP of treated cell extracts with anti-HSP70 antibody followed by WB with anti-RAGE on the precipitate, demonstrated the interaction of eHSP70-RAGE. The same result was found when cell extract was immunoprecipitated with anti-RAGE followed by WB with anti-HSP70. The content of RAGE co-precipitating with eHSP70 seems to be higher compared to HMGB1-RAGE co-precipitate, used as a positive control for RAGE binding (Figure 1 B).

### 3.2 eHSP70 enhances MAPK phosphorylation in a time-dependent manner

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of proteins involved in a wide range of cell responses mediated by inflammatory stimuli and previous works observed that RAGE activation leads to fast cell responses involving MAPK signaling cascade<sup>21; 22; 23; 24</sup>. Thus, we analyzed the effect of eHSP70 on the activation state of the MAPKs ERK1/2, p38 and JNK. Recombinant eHSP70 (1µg/mL) was added to medium bathing A549 cells for increasing periods up to 120 min and immunoblots were performed to detect the phosphorylated (active) forms of these protein kinases. As shown in Figure 1, the activity of ERK 1 and 2 (Fig. 1C), p38 (Fig. 1 D), JNK (Fig. 1 E) was significantly increased by eHSP70 in a time-dependent manner. In 10 minutes of exposition, there was a peak in MAPK phosphorylation and this activation signal continues until 30 minutes. After this time, the phosphorylation of kinases decreases.

### 3.3 eHSP70 activates ERK1/2 through RAGE, but not p38 and JNK.

Previous studies have shown that some RAGE agonists are also able to bind others receptors also involved in stress and inflammation, such as TLRs<sup>23</sup>, and may initiate a cellular response via MAPK. In addition, eHSP70 has been described as TLR ligand and to play a key role in inflammation progression<sup>13</sup>. Considering these observations, we focused to determine the extent of RAGE involvement in MAPK phosphorylation evoked by eHSP70.

We first set out the RAGE knockdown by siRNA transfection assay (Figure 2). Levels of mRNA and protein expression decreased when cells were transfected with highest RAGE siRNA concentration (50 nM) up to 48 hours (Figure 2 A and B). Varying periods of transfection were tested and shorter times of incubation yielded more pronounced inhibition in RAGE mRNA expression (data not shown). Nonetheless, RAGE protein levels were more efficiently decreased after 48 hours of transfection with 50 nM of siRNA sequence. Phase contrast microscopy shows no change in cell morphology (Figure 2 C) and SRB-incorporation assay shows that silencing does not affect the cell viability (Supplemental Figure 1 D). Together, these results allowed us to use RAGE siRNA at 50 nM to knockdown the receptor for following experiments.

Next, RAGE-silenced A549 cells were stimulated with eHSP70 for 30 minutes and MAPKs activation were evaluated by western blotting (Figure 2 D, E, F). eHSP70 activated ERK1/2 in a RAGE-dependent manner (Figure 2 D), once RAGE silencing impaired the phosphorylation of these kinases. On the other hand, activation of p38 and JNK were not affected by RAGE knockdown, suggesting that this effect is not dependent on RAGE activation (Fig. 3E and F).

#### 3.4 eHSP70 stimulates NF- $\kappa$ B activation via RAGE and ERK1/2

Activation of RAGE has been found to induce many cell responses, which lead the activation of transcription factors associated to cell proliferation, migration and inflammation, like NF- $\kappa$ B<sup>25</sup>. Here, we determined the transcriptional activation of eHSP70-induced NF- $\kappa$ B by reporter gene assay (Figure 2 G). There was a 3-fold increase in luciferase luminescence by eHSP70 compared to control, indicating that eHSP70 activates NF- $\kappa$ B transcriptional activity. RAGE knockdown by siRNA transfection blocked NF- $\kappa$ B activation by eHSP70. This effect was also observed with RAGE pharmacological inhibition with FPS-ZM1 (1  $\mu$ g/mL). Pharmacological inhibition of MEK1/2 by UO126 (10  $\mu$ M) also led to blockage of NF- $\kappa$ B activation by eHSP70. These results evidenced the role of eHSP70 on RAGE/ERK/NF- $\kappa$ B pathway.

#### 3.5 eHSP70 induces RAGE-dependent pro-inflammatory cytokine transcription in A549 cells

Many of the extracellular ligands that elicit RAGE activation are worth noticing to be involved in acute and chronic immune responses<sup>14</sup>. In turn, HSP70 is released to extracellular medium in conditions of stress and inflammation, and once there, eHSP70 may induce cytokine production<sup>5</sup>. To determinate if eHSP70 is able to activate inflammatory responses through RAGE, A549 cells were treated with eHSP70 for 12 hours and the expression of different cytokines that regulate inflammatory processes was evaluated (Figure 3 A). RT-qPCR analysis shows that TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression markedly increased with eHSP70 treatment, and this effect was blocked when RAGE was knockdowned (Table 1, Figure 3 A). Also, eHSP70 reduced IL-13 mRNA expression, and RAGE knockdown upturned this effect. Expression of TGF- $\beta$  appears to increase with eHSP70 stimulation, but it did not significantly change compared to control.

#### 3.6 Conditioned medium from A549 stimulated with eHSP70 modulates immune response

To address if modulation of cytokines expression by eHSP70 in lung cancer cells is a relevant step in cancer immune response regulation, collected culture supernatants from A549 cells treated with eHSP70 were added to U937 monocyte cell line and samples were collected for RT-qPCR analysis (Table 2, Figure 3 B). A549 conditioned medium of eHSP70-treated cells attenuates expression of

pro-inflammatory cytokines and led to a rise in expression of anti-inflammatory IL-13 mRNA. The conditioned medium of RAGE-silenced A549 cells treated with eHSP70 did not cause any effect on U937 pro-inflammatory activation. Expression of TGF- $\beta$  in U937 was not affected by any treatment.

#### 4. Discussion

HSP70, an intracellular chaperone, has been recently identified as a modulator of pro-inflammatory cytokines when released from the cytoplasm into the extracellular milieu<sup>8; 9; 26</sup>. Previous studies reported that eHSP70 can bind many receptors present in APCs and the differences in binding affinities between each cell type is probably due to differences in eHSP70 receptors expression<sup>13; 27</sup>. RAGE is a promiscuous receptor that interacts with several inflammation and stress mediators including AGEs, HMGB1, S100 family proteins, DNA and RNA to activate the inflammatory pathway<sup>28</sup>. In most adult tissues, RAGE expression is suppressed in normal conditions, except in lungs and some endothelial cell types. In this study, we used a human lung cancer-derived A549 cell line, which constitutively expresses RAGE, to show the interaction between eHSP70 and this receptor by a cellular study-based approach. Besides, current work by our group evidenced RAGE-eHSP70 interaction by molecular docking<sup>29</sup>. Together, these data lead us to describe eHSP70 as a new RAGE ligand.

The interaction between RAGE and ligand can activate many several cellular pathways. The type of response is signal-tissue specific and depends on the type of ligand, the precise environment and the cell type. In general, RAGE engagement by its agonists leads to the activation of key elements of the MAPK signaling pathways, which include ERK1/2, p38 and JNK<sup>25</sup>. On the other hand, eHSP70 complexed to peptides promote activation of JNK through TLR2 and TLR4<sup>30</sup>. Our study showed that eHSP70 itself can induce activation of ERK1/2, p38 and JNK (Figure 1 C, D and E). Interestingly, RAGE mediates only ERK1/2 responses evoked by eHSP70: phosphorylation of these kinases decrease when RAGE expression was inhibited by siRNA transfection, while eHSP70-mediated p38 and JNK activation were not affected when RAGE was knockdowned (Figure 2 D, E and F).

JNK and p38 pathway are correlated with proliferation, differentiation and changes in cell cycle<sup>30; 31</sup>, responses that are not evoked by eHSP70 in A549 cells, as shown by FACS analysis of cell cycle progression and SRB-incorporation viability assays (Supplementary Fig. 1 A and B). Since cell response is not an isolated event, but dynamically activates many pathways to set a specific

effect, many studies also describe involvement of ERK in those events <sup>32</sup>. The rapid phosphorylation of ERK1/2 is described as a typical intracellular response to RAGE activation <sup>33</sup>. Importantly, ERK activation is also correlated with inflammation studies that involve RAGE intracellular domain docking of ERK, leading to activation of kinase activity <sup>23; 34</sup>. These results, together with previous evidence showing the effect of eHSP70 through TLRs, strongly indicate that the modulatory actions of eHSP70 are dependent on multiple receptors activation. In this context, the multiple effects evoked by eHSP70 in different cells/tissues may be ascribed to the differential expression of TLRs subtypes and RAGE by each cell type.

By gene reporter luciferase assay, we showed that eHSP70 itself activates NF- $\kappa$ B (Figure 2 G). RAGE siRNA transfection impaired luciferase luminescence, and this result was confirmed by RAGE antagonist treatment. Downstream activation of ERK1/2 was also involved in gene response, once pharmacological inhibitor UO126 blocked the effect of eHSP70 on NF- $\kappa$ B activation. These results showed eHSP70 is able to evoke cellular downstream NF- $\kappa$ B gene activation through RAGE ligation and ERK signaling pathway. This is a significant data as the ERK1/2-NF- $\kappa$ B signaling axis is considered a classical hallmark of RAGE-mediated signal transduction.

Recently, there has been considerable interest in the biological role of HSP70 molecular chaperone in the extracellular space, particularly in the modulation of immune response. It has been described that eHSP70 can bind with high affinity to plasma membrane receptors, eliciting activation of NF- $\kappa$ B and regulating the expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in human monocytes <sup>5</sup>. In the present study, eHSP70 was able to drive the expression of these cytokines in A549 cells, a human non-small lung cancer line. TNF- $\alpha$  is an inflammatory mediator that has been implicated in carcinogenesis and can be produced at early stages of cell pro-inflammatory activation. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 promote cancer invasiveness <sup>35</sup> and malignancy <sup>36</sup>, respectively; mRNA expression levels of these pro-inflammatory mediators were observed to be modulated by eHSP70 in a RAGE-dependent fashion. Importantly, RAGE knockdown was able to completely block the effect of eHSP70 on modulatory cytokines.

It is well described that eHSP70 promotes cytokine production in APCs via TLR and other c-type lectin members, but it was also reported that eHSP70 can keenly bind to non-APC cell lines, especially those from epithelial or endothelial background <sup>37</sup>. Our results indicate that RAGE is an important recognizer of eHSP70, and particularly in our cell model this receptor is essential to promote cytokines expression by eHSP70. This is probably because RAGE is the major pattern recognizer in A549 lung epithelial cell line, and its constitutive expression is higher than TLR and other c-type lectine receptors. Similar effects by HMGB1 were described in normal human

bronchial epithelial (NHBE) cells, once RAGE blockage impairs the production of inflammatory cytokines stimulated by this agonist <sup>23</sup>.

Expression of IL-13 was also decreased by eHSP70 via RAGE. IL-13 is a Th2 cytokine that act as central mediator of the physiologic changes induced by allergic inflammation, but also inhibits the production of pro-inflammatory cytokines, up-regulates monocyte MHCII and CD23 and induces IgG and IgM synthesis in B cells, among other effects <sup>38</sup>. Its expression in lung is well correlated with mucus hyper secretion, which contributes to progression of airway allergic diseases <sup>39; 40; 41</sup>. Nonetheless, chronic inflammation is important in generating malignancy through the exposure of pro-inflammatory cytokines and sustained activation of signaling pathways such as NF- $\kappa$ B <sup>36</sup>. In this context, eHSP70 inhibition of IL-13 may contribute to drive cancer cells to a pro-inflammatory environment. Our results suggest that RAGE is the main receptor mediating the pro-inflammatory effects of eHSP70 in carcinoma A549 cell line.

Recent works have revealed that tumor cells do not act alone to promote tumorigenesis, cancer progression, angiogenesis, and metastasis, but instead collaborate with an activated microenvironment <sup>42</sup>. In this context, it seemed important to evaluate how the effects of RAGE activation by eHSP70 in A549 could modulate immune cells responses. Thus, to contextualize tumor biology, we studied the effects of A549 conditioned medium on the modulation of U937 monocyte gene transcription. In response to conditioned medium of A549 cells treated with eHSP70, monocytes produced a marked reduction of pro-inflammatory and increase in anti-inflammatory profile (Table 2, Figure 3 B): expression of IL-6 mRNA was remarkably decreased in U937 and IL-13 was highly expressed in those conditions. Changes in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  seem to decrease, although presented no significant difference; TGF- $\beta$  also did not change expression levels, as in A549 cells. In U937 monocytes incubated with conditioned medium of RAGE-silenced A549 cells treated with eHSP70, cytokine expression returned to levels similar to observed in monocytes exposed to unstimulated A549 conditioned medium. It is known that IL-13 down-regulates macrophage activity, by inhibition of pro-inflammatory cytokines and chemokines <sup>43; 44</sup>. Here, increased IL-13 expression by monocytes might regulate the reduction of mRNA levels TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, as part of an immunosuppressive response to compensate the pro-inflammatory state of tumor cells.

Tumor associated macrophages (TAM) secrete several factors that contribute to tumor growth and metastasis, while maintaining the immunosuppressive milieu <sup>42; 45</sup>. This cross-talking between tumor cells and their microenvironment determine tumor's outcome, that is, if it will be able to grow (and ultimately invade other tissues) or if it will be terminated by the immune system. Here, monocyte cells expressed an immunosuppressed profile in response to modulators released by

A549 cells stimulated with eHSP70. There are many candidate molecules which may be secreted by A549 and drive monocyte responses, as HMGB1, that can drive pro-tumoral activities of M2 macrophages<sup>46</sup>, or TGF- $\beta$ , which together with other factors can ‘educate’ TAMs and create a promising immunosuppressive micro-environment for tumor progression<sup>47</sup>. As the identification of the factors secreted by A549 after HSP70 stimulation was not the initial focus of our work, our study is limited to these data. Nonetheless, this seems to be an interesting analysis to be performed by future studies, as it may further contribute to a deeper understanding of the biological significance of the eHSP70-RAGE interaction.

It is known that eHSP70 can mediate pro-inflammatory cytokine production via the MyD88/IRAK/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway through TLR2 and TLR4 interaction<sup>5; 13; 48</sup>. Our study was the first to show the relevancy of RAGE on NF- $\kappa$ B transcriptional activity by eHSP70. In some conditions, RAGE can act as co-receptor along with other receptors to interact with ligands, and its absence could impair the function of other receptors<sup>49</sup>. In other situations, RAGE itself, in monomeric or oligomeric form, can bind agonists to produce different responses<sup>50</sup>. Here, lack of RAGE prevented downstream signal transduction by eHSP70, showing the essentiality of this receptor to A549 responsiveness.

## 5. Conclusion

In conclusion, we show here that eHSP70 evokes important pro-inflammatory changes in A549 cells via RAGE. The incubation of human lung cancer cells with eHSP70 produced a binding interaction with RAGE, evidenced by co-immunoprecipitation. Besides, eHSP70 provoked the activation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B and altered the expression level of different cytokines in a RAGE-dependent manner. This modulatory action of eHSP70 on A549 inflammatory response through RAGE was able to evoke important expression changes in immune system cells. Our present findings indicate that eHSP70 is a novel RAGE agonist.

**Acknowledgments:** The Brazilian research funding agencies and all technical staff involved in this work.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Author contributions:** NS conducted most of the experiments, analyzed the results, and wrote most of the paper. POB conducted experiments of western blot and knockdown. AZF assisted immunoprecipitation and luciferase assay procedure and analysis. VMR supported luciferase assay. DCR conducted experiments of FACs analysis. MSM conducted viability assay. JCFM

supported the idea for the project and participated in planning and discussion of experiments. DPG conceived the idea for the project and wrote the paper with NS.

## 6. REFERENCES

- <sup>1</sup> LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet**, v. 22, p. 631-77, 1988. ISSN 0066-4197 (Print) 0066-4197 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2853609](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2853609)>.
- <sup>2</sup> NOVER, L.; SCHARF, K. D. Heat stress proteins and transcription factors. **Cell Mol Life Sci**, v. 53, n. 1, p. 80-103, Jan 1997. ISSN 1420-682X (Print)1420-682x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- <sup>3</sup> PILON, M.; SCHEKMAN, R. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. **Cell**, v. 97, n. 6, p. 679-82, Jun 11 1999. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- <sup>4</sup> SINGH-JASUJA, H. et al. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. **Biol Chem**, v. 382, n. 4, p. 629-36, Apr 2001. ISSN 1431-6730 (Print)1431-6730. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1515/bc.2001.074>>.
- <sup>5</sup> ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nat Med**, v. 6, n. 4, p. 435-42, Apr 2000. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10742151](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10742151)>.
- <sup>6</sup> BASU, S. et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **Int Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1539-46, Nov 2000. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11058573](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11058573)>.
- <sup>7</sup> HUNTER-LAVIN, C. et al. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, n. 2, p. 511-7, Nov 12 2004. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.075>>.
- <sup>8</sup> MAMBULA, S. S.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 7849-57, Dec 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- <sup>9</sup> LANCASTER, G. I.; FEBBRAIO, M. A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 23349-55,



Jun 17 2005. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502017200> >.

<sup>10</sup> BECKER, T.; HARTL, F. U.; WIELAND, F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. **J Cell Biol**, v. 158, n. 7, p. 1277-85, Sep 30 2002. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

<sup>11</sup> THERIAULT, J. R.; ADACHI, H.; CALDERWOOD, S. K. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. **J Immunol**, v. 177, n. 12, p. 8604-11, Dec 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

<sup>12</sup> ASEA, A. Chaperokine-Induced Signal Transduction Pathways. **Exerc Immunol Rev**, v. 9, p. 25-33, 2003. ISSN 1077-5552 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

<sup>13</sup> ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 15028-34, Apr 26 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11836257](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11836257) >.

<sup>14</sup> CHUAH, Y. K. et al. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **Int J Inflamm**, v. 2013, p. 403460, 2013. ISSN 2090-8040 (Print)2042-0099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/403460> >.

<sup>15</sup> BRETT, J. et al. Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. **Am J Pathol**, v. 143, n. 6, p. 1699-712, Dec 1993. ISSN 0002-9440 (Print)1525-2191 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

<sup>16</sup> RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. 2016. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00018-002-8491-x> >.

<sup>17</sup> SIMS, G. P. et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 367-88, Mar 2010. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20192808](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20192808) >.

<sup>18</sup> SCHMIDT, A. M. et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.108, 2001. p.949-55. ISBN 0021-9738 (Print).

<sup>19</sup> ZANOTTO-FILHO, A. et al. The pharmacological NFκB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. **Cancer Letters**, v. 288, n. 2, p. 192-203, 2010/02/28 2010. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.cancerletters.info/article/S0304383509004637/abstract> >. Disponível em: < <http://www.cancerletters.info/article/S0304383509004637/fulltext> >. Disponível em: < <http://www.cancerletters.info/article/S0304383509004637/pdf> >.

- <sup>20</sup> SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, Jul 4 1990. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2359136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2359136)>.
- <sup>21</sup> QIN, Y.-H. et al. HMGB1 Enhances the Proinflammatory Activity of Lipopolysaccharide by Promoting the Phosphorylation of MAPK p38 through Receptor for Advanced Glycation End Products. 2009-11-15 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/183/10/6244>>.
- <sup>22</sup> ARUMUGAM, T. et al. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). **J Biol Chem**, v. 279, n. 7, p. 5059-65, Feb 13 2004. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M310124200>>.
- <sup>23</sup> LIANG, Y. et al. HMGB1 binding to receptor for advanced glycation end products enhances inflammatory responses of human bronchial epithelial cells by activating p38 MAPK and ERK1/2. **Mol Cell Biochem**, v. 405, n. 1-2, p. 63-71, Jul 2015. ISSN 1573-4919. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862459>>.
- <sup>24</sup> ZHU, P. et al. Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. **Exp Dermatol**, v. 21, n. 2, p. 123-9, Feb 2012. ISSN 0906-6705. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01408.x>>.
- <sup>25</sup> LECLERC, E. RAGE and Its Ligands in Melanoma. 2015-04-01 2015. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/melanoma-current-clinical-management-and-future-therapeutics/rage-and-its-ligands-in-melanoma>>.
- <sup>26</sup> VEGA, V. L. et al. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. **J Immunol**, v. 180, n. 6, p. 4299-307, Mar 15 2008. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.
- <sup>27</sup> THERIAULT, J. R. et al. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. **FEBS Lett**, v. 579, n. 9, p. 1951-60, Mar 28 2005. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.046>>.
- <sup>28</sup> XIE, J. et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cell Signal**, v. 25, n. 11, p. 2185-97, Nov 2013. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23838007>>.
- <sup>29</sup> GRUNWALD, M. S. et al. Putative model for heat shock protein 70 complexation with receptor of advanced glycation end products through fluorescence proximity assays and normal mode analyses. **Cell Stress Chaperones**, Nov 17 2016. ISSN 1355-8145. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12192-016-0746-9>>.

- <sup>30</sup> ZHE, Y. et al. Extracellular HSP70-peptide complexes promote the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via TLR2/4/JNK1/2MAPK pathway. **Tumour Biol**, Aug 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492456> >.
- <sup>31</sup> DE BITTENCOURT PASQUALI, M. A. et al. Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF-κB in human lung cancer A549 cells. **Cell Signal**, v. 25, n. 4, p. 939-54, Apr 2013. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23333461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23333461) >.
- <sup>32</sup> BROOM, O. J. et al. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? **Clin Exp Immunol**, v. 158, n. 3, p. 272-80, Dec 2009. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04033.x> >.
- <sup>33</sup> YEH, C.-H. et al. Requirement for p38 and p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinases in RAGE-Mediated Nuclear Factor-κB Transcriptional Activation and Cytokine Secretion. 2001-06-01 2001. Disponível em: <[http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/6/1495?ijkey=7c6e82a91308dd4b6449c37a613d9a993427feb8&keytype=tf\\_ipsecsha](http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/6/1495?ijkey=7c6e82a91308dd4b6449c37a613d9a993427feb8&keytype=tf_ipsecsha) >.
- <sup>34</sup> ISHIHARA, K. et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. **FEBS Lett**, v. 550, n. 1-3, p. 107-13, Aug 28 2003. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- <sup>35</sup> APTE, R. N. et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 387-408, Sep 2006. ISSN 0167-7659 (Print)0167-7659. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-006-9004-4> >.
- <sup>36</sup> LANDSKRON, G. **Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment**. MARJORIE DE LA FUENTE, P. T., CHANITRA THUWAJIT, AND MARCELA A. HERMOSO. Journal of Immunology Research: Hindawi Publishing Corporation. 2014 2014.
- <sup>37</sup> Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. v. 579, n. 9, p. 1951–1960, 28 March 2005 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.046> >.
- <sup>38</sup> SUZUKI, A. et al. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 79-88, Sep 2015. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26088753> >.
- <sup>39</sup> ZHU, Z. et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.103, 1999. p.779-88. ISBN 0021-9738 (Print).
- <sup>40</sup> WHITTAKER, L. et al. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 27,

n. 5, p. 593-602, Nov 2002. ISSN 1044-1549 (Print)1044-1549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.4838> >.

41 CORREN, J. Role of interleukin-13 in asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 13, n. 5, p. 415-20, Oct 2013. ISSN 1529-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-013-0373-9> >.

42 WHIPPLE, C. A. Tumor talk: understanding the conversation between the tumor and its microenvironment. **Cancer Cell Microenviron**, v. 2, n. 2, p. e773, Apr 26 2015. ISSN 2331-091X (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.14800/ccm.773> >.

43 ZHU, C. et al. Interleukin-13 inhibits cytokines synthesis by blocking nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase in human mesangial cells☆. In: (Ed.). **J Biomed Res**, v.24, 2010. p.308-16. ISBN 1674-8301 (Print).

44 IL13 interleukin 13 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. RefSeq, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596> >.

45 TYAN, S. W. et al. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15313, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015313> >.

46 ROJAS, A. et al. HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism. **Tumour Biol**, v. 37, n. 3, p. 3321-9, Mar 2016. ISSN 1010-4283. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3940-y> >.

47 KOMOHARA, Y. et al. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **The Journal of Pathology**, v. 216, n. 1, p. 15-24, 2016. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2370/abstract> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2370/full> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2370/pdf> >.

48 SCHMITT, E. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 15-27, Jan 2007. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931602> >.

49 TIAN, J. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. **Nat Immunol**, v. 8, n. 5, p. 487-96, May 2007. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni1457> >.

50 ZONG, H. et al. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. **J Biol Chem**, v. 285, n. 30, p. 23137-46, Jul 23 2010. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.133827> >.

## TABLES

**Table 1.** eHSP70 induces RAGE-dependent pro-inflammatory cytokine transcription in A549 cells. RAGE silenced A549 cells were incubated with eHSP70 for 12 hours and RNA was extracted to determine cytokine translation by RT-qPCR. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 and TGF- $\beta$  mRNA expression are expressed in relation to GNB2L mRNA levels. Statistical analysis were performed using ANOVA followed by Bonferroni (\*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.001$  compared to control; #  $p < 0.01$  compared to RAGE knockdowned A549 cells treated with HSP70).

**Table 2.** Conditioned medium from A549 stimulated with eHSP70 modulates immune response. U937 monocyte cells were treated with conditioned medium from A549 cells previous stimulated with eHSP70. RNA was extracted to determine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 and TGF- $\beta$  mRNA expression by RT-qPCR. Results are expressed in relation to B2M mRNA levels. Statistical analysis were performed using ANOVA followed by Bonferroni (\*\*  $p < 0.001$  compared to control; #  $p < 0.01$  compared to RAGE knockdowned A549 cells treated with HSP70).

## FIGURES LEGEND

**FIGURE 1.** eHSP70 physically interacts with RAGE and enhances MAPK phosphorylation in a time-dependent manner. A549 cells were treated with HSP70 or HMGB1 for 30 minutes and immunoprecipitation assay was carried with antibodies against RAGE, HSP70 and HMGB1. Western Blotting analysis was performed using A) anti-RAGE and anti-HSP70 antibodies for HP70-treated cells and B) anti-RAGE to compare HMGB1 and HSP70 treated-cells. A549 were incubated with eHSP70 (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) in a time-curve (up to 120 minutes) assay and the immunocontent of proteins was assessed by western blot: C) ERK1/2, D) p38, E) JNK (phosphorylated and total isoforms). Graphs present mean  $\pm$  SEM values (two-way ANOVA statistical analysis followed by Tukey: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  compared to control group).

**FIGURE 2.** eHSP70 activates ERK1/2 and NF- $\kappa$ B through RAGE. RAGE knockdown was performed with small interference RNA (siRNA) methodology; siRNA with scrambled sequence (control) and RAGE-specific sequence were transfected in concentrations of 25 nM and 50 nM. After 48 hours samples were collected and RAGE content was measured by A) RT-qPCR mRNA expression and B) Western blot protein immunocontent (ANOVA followed by Tukey: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). C) Morphology assessment of 48 hours after transfection. Transfected cells were treated with eHSP70 (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) for 30 minutes and phosphorylation of D) ERK1/2, E) p38 and F) JNK was evaluated (ANOVA followed by Bonferroni: \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$  compared to control, #  $p < 0.0004$  compared to scrambled-transfected cells treated with eHSP70). NF- $\kappa$ B gene reporter assay was performed in cells knockdowned with siRNA or pretreated with pharmacological inhibitors FPS-ZM1 and UO126 cells before eHSP70 treatment (12 hours). Luciferase activity was measured and results are expressed as fold-induction of Luciferase/Renilla luminescence control (ANOVA followed by Tukey: \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

**FIGURE 3.** eHSP70 induces RAGE-dependent pro-inflammatory cytokines mRNA transcription in A549 cells and conditioned medium from these cells modulate immune response. A) RAGE silenced A549 cells were incubated with eHSP70 for 12 hours and RNA was analyzed by RT-qPCR. B) U937 monocyte cells were treated with conditioned medium from A549 cells previous stimulated with eHSP70. The cytokines mRNA levels of U937 were measured by RT-qPCR. All cytokines expression were converted to standard score and plotted

in a HeatMap. White color represents the lowest expression level and red indicates high mRNA levels.

**Supplementary Figure 1.** eHSP70 did not change A549 cell cycle and viability. RAGE antagonist and siRNA treatments also did not affect cell viability. (A) A549 cells were incubated with eHSP70 or cisplatin (control for induction of cell cycle changes) for 48 and 72 hours. Cells were labeled with propidium iodide and staining was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). A549 cells were treated with (B) eHSP70, (C) FSP-ZM1 in a concentration-curve or with (D) siRNA 50 nM and SRB incorporation was evaluated to measure number of cells. Treatments did not change cell viability (ANOVA followed by Tukey with p=0.05).

Table 1

	siRNA scramble	siRNA RAGE	siRNA scramble + HSP70	siRNA RAGE + HSP70
TNF- $\alpha$	0.7494 $\pm$ 0.3462	0.7994 $\pm$ 0.2375	1.4 $\pm$ 0.4546*	0.6804 $\pm$ 0.2101#
IL-1 $\beta$	0.7781 $\pm$ 0.4669	0.3992 $\pm$ 0.2943	2.867 $\pm$ 0.1872 **	0.582 $\pm$ 0.2736 #
IL-6	1.068 $\pm$ 0.2776	0.7442 $\pm$ 0.1806	2.344 $\pm$ 0.5795 *	0.6369 $\pm$ 0.4117 #
IL-13	2.362 $\pm$ 0.5030	2.173 $\pm$ 0.1743	0.6378 $\pm$ 0.09187 **	2.264 $\pm$ 0.5148 #
TGF- $\beta$	0.6446 $\pm$ 0.5194	0.6788 $\pm$ 0.2826	1.513 $\pm$ 0.1365	1.025 $\pm$ 0.8332

Table 2

Conditioned medium from A549-treated cells					
	U937 control	siRNA scramble	siRNA RAGE	siRNA scramble + HSP70	siRNA RAGE + HSP70
TNF- $\alpha$	1.003 $\pm$ 0.09674	1.054 $\pm$ 0.2402	0.8594 $\pm$ 0.4197	0.5456 $\pm$ 0.1324	1.169 $\pm$ 0.3594
IL-1 $\beta$	1.079 $\pm$ 0.5363	1.011 $\pm$ 0.1976	1.387 $\pm$ 0.4723	0.5409 $\pm$ 0.06922	1.878 $\pm$ 0.6171 #
IL-6	0.6860 $\pm$ 0.3057	0.9081 $\pm$ 0.2354	1.612 $\pm$ 0.1658	0.3163 $\pm$ 0.03409**	1.937 $\pm$ 0.1578 #
IL-13	1.061 $\pm$ 0.5030	1.638 $\pm$ 0.3881	1.452 $\pm$ 1.018	11.36 $\pm$ 3.251**	2.039 $\pm$ 0.6882 #
TGF- $\beta$	0.8575 $\pm$ 0.1835	0.9339 $\pm$ 0.2509	0.8587 $\pm$ 0.1259	0.9614 $\pm$ 0.5716	1.307 $\pm$ 0.5947

Figure 1

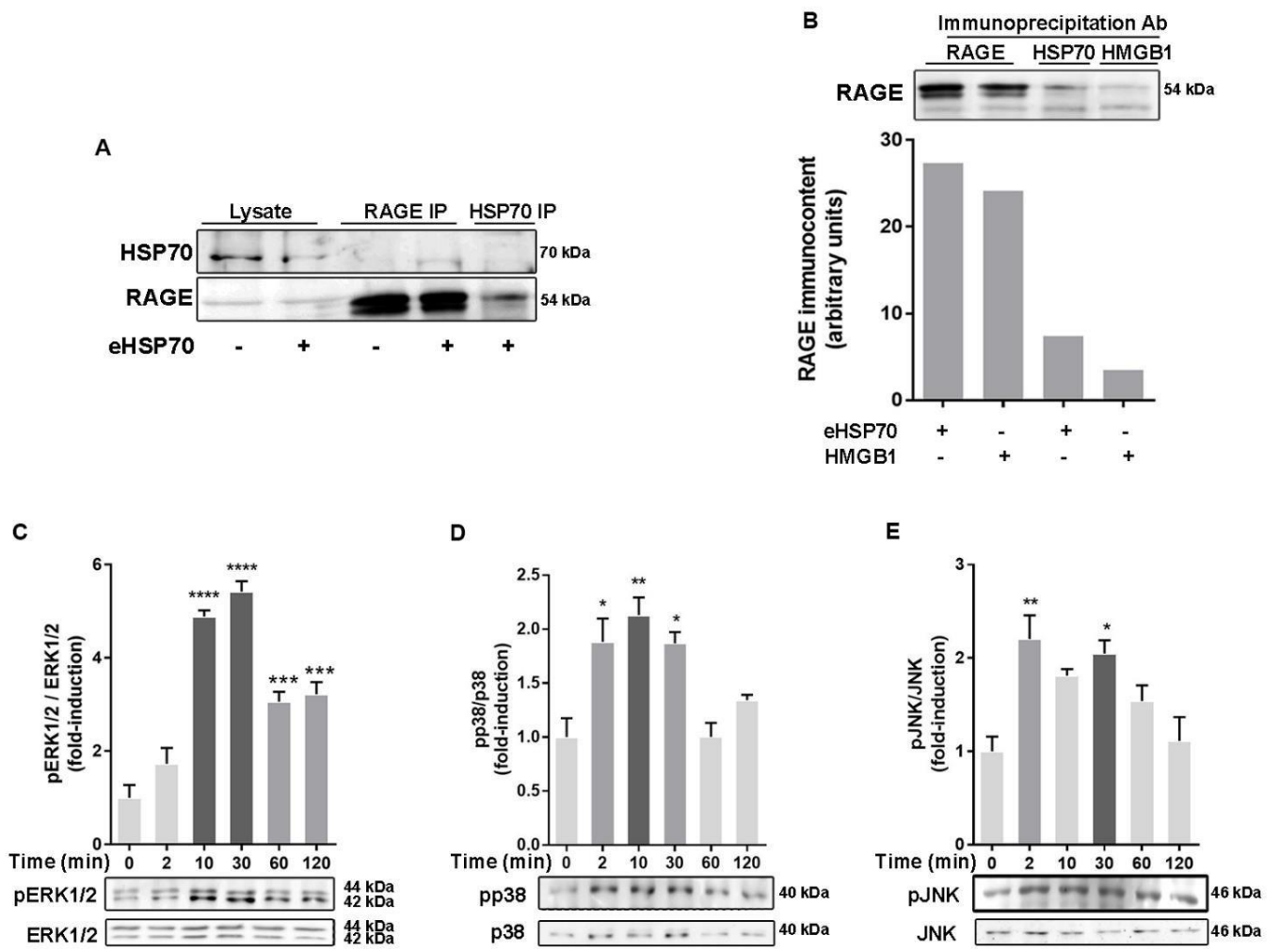


Figure 2

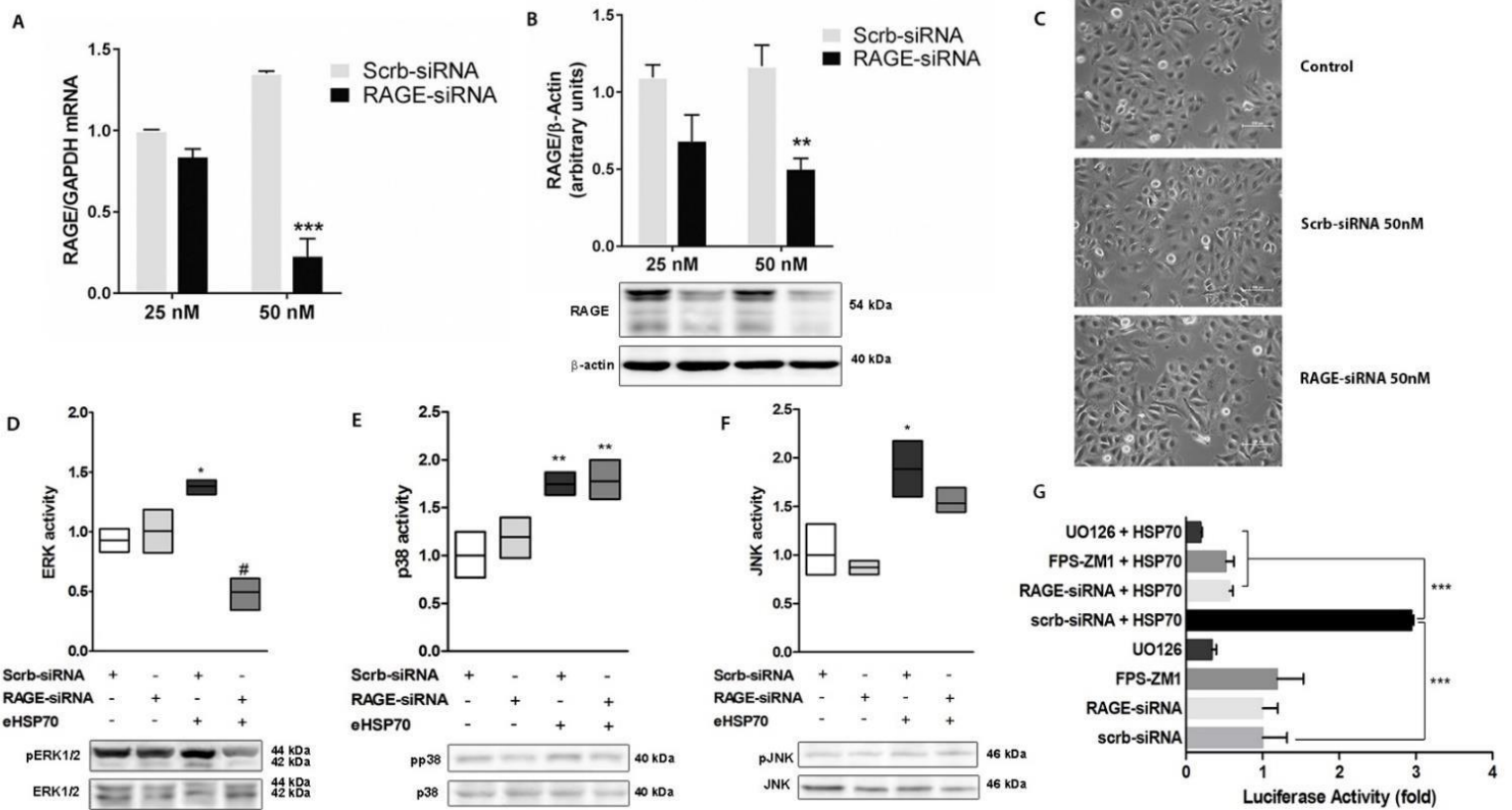
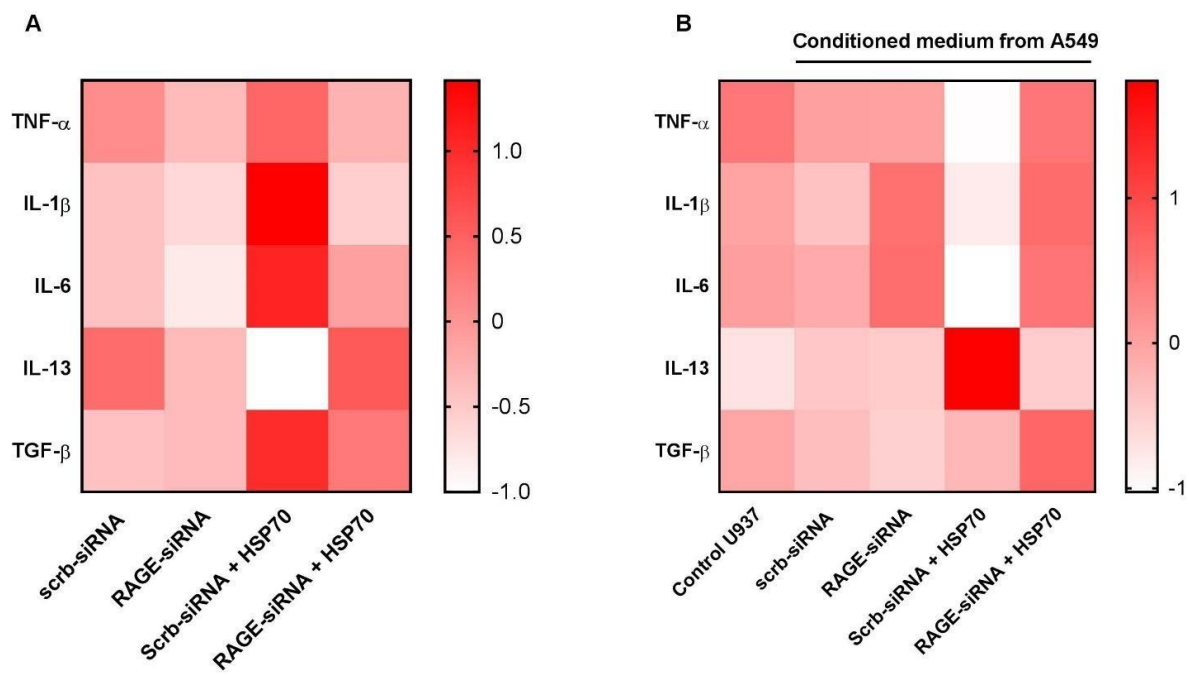
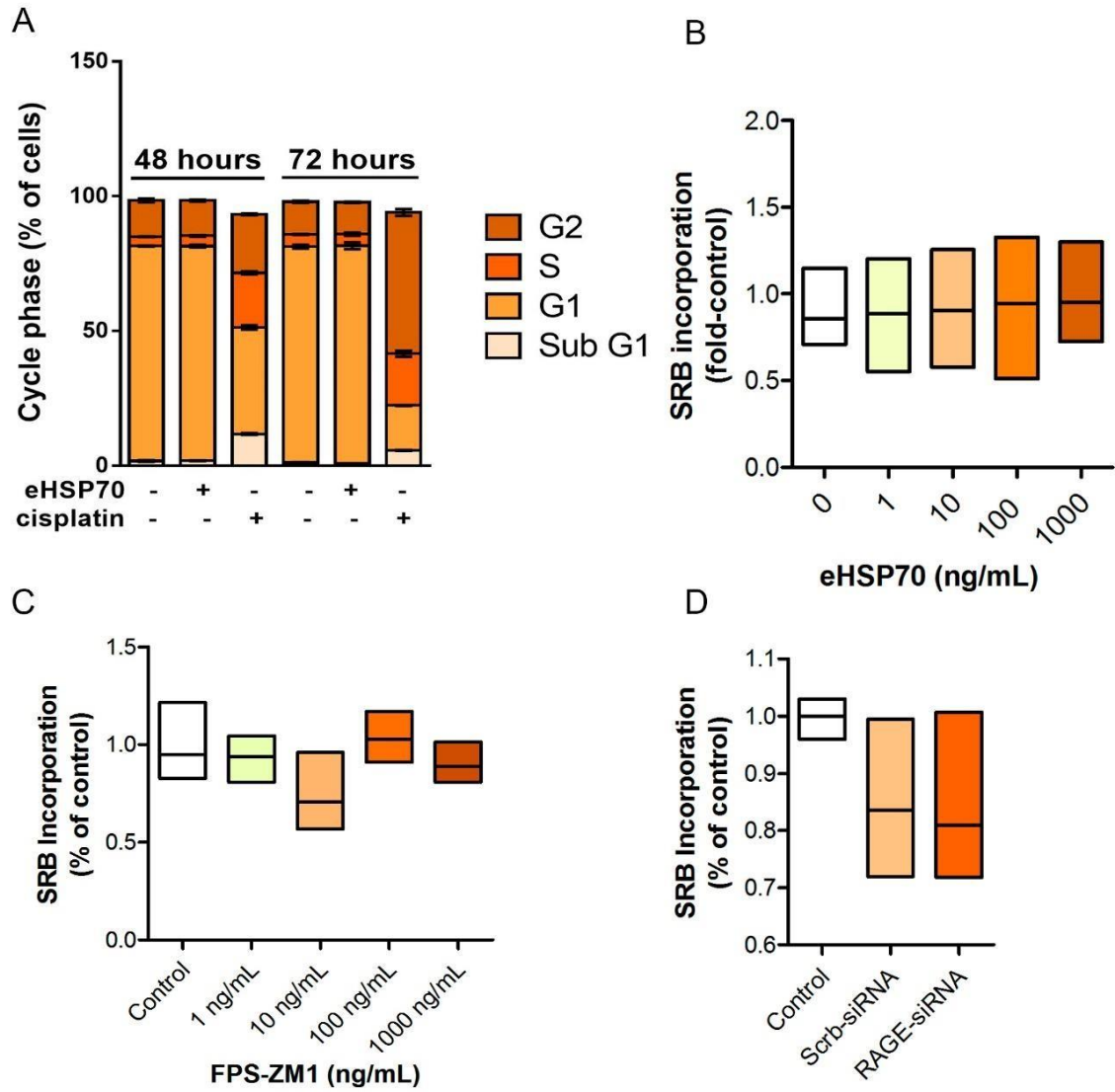


Figure 3





Supplementary Figure 1



### **Parte 3**

#### 4. Discussão

Estudos atuais relevam que as funções da HSP70 vão muito além da atividade de chaperona primeiramente descrita. Recentemente, essas proteínas têm sido encontradas no soro após diversas formas de estresse (processos inflamatórios, câncer, choque séptico e trauma); em um primeiro momento, essa característica foi atribuída à ruptura necrótica da membrana celular e posterior extravasamento do conteúdo celular. Logo após, foi demonstrado que a HSP70 poderia ser ativamente secretada para o ambiente extracelular, conduzindo à hipótese de que essa proteína poderia ter um papel muito mais complexo e importante na sinalização celular durante processos patogênicos.

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), por sua vez, é um receptor transmembrana promíscuo, capaz de reconhecer e se ligar a padrões moleculares que sinalizam situações de dano (DAMPs). Dentre essas moléculas, encontra-se a HMGB1, que é uma proteína intracelular que apresenta secreção para o meio extracelular similar à HSP70. Uma vez que o agonista interage com o RAGE, desencadeiam-se diversas respostas celulares, que variam de acordo com o tipo celular e situação fisiológica. Em geral, a ativação do receptor está relacionada com um estado pró-inflamatório agudo ou até mesmo crônico

Esta dissertação descreve um estudo com o intuito de elucidar a ação da HSP70 extracelular sobre o receptor RAGE. Para isso, utilizou-se como modelo células da linhagem A549, que por apresentarem expressão constitutiva de RAGE, permitem regular os níveis de expressão do receptor e avaliar o seu envolvimento e relevância nas respostas evocadas pela HSP70 exógena.

Trabalhos na literatura mostram que a HSP70 é capaz de se ligar a RAGE [55, 56], e para comprovar essa interação utilizamos ensaios de co-imunoprecipitação. Na Figura 1 A e B do artigo mostramos que a HSP70 extracelular é capaz de se ligar fisicamente no receptor. Esses resultados ainda revelam que a HSP70 é capaz de interagir com maior intensidade ao RAGE quando comparado à interação HMGB1-RAGE, que já possuem interação descrita na literatura [69].

Confirmada a interação, foi necessário avaliar se a célula estaria responsiva à HSP70 extracelular. O tipo de resposta mediada por MAPK é a primeira a ser ativada por RAGE; paralelamente, trabalhos mostram que a eHSP70 é capaz de ativar essas vias de sinalização em modelos celulares [30]. As MAPK (do inglês Mitogen Activated Protein Kinases – Proteínas cinases ativadas por mitógenos) são uma sub-família de proteínas cinases capazes de serem fosforiladas em seus resíduos serina/tirosina/treonina e, conseqüentemente, fosforilam outras proteínas alvo. Estímulos extracelulares levam à ativação de uma da cascata de sinalização (fosforilação) das MAPK; inicia-se pela ativação de uma proteína MAP cinase-cinase-cinase (MKKK, MEKK ou MAP3K), que fosforila proteínas MAP cinase-cinase (MKK, MEK ou MAP2K), que por sua vez ativam eventos múltiplos de fosforilação em MAP cinases (MAPK), que são responsáveis pela amplificação do sinal [61]. A resposta celular mediada por fosforilação/defosforilação corresponde a uma das maneiras da célula responder de forma mais rápida e eficaz à um estímulo, uma vez que não depende da síntese de proteínas, apenas da adição e remoção de grupamentos fosfato.

O tratamento realizado com HSP70 por diferentes tempos foi capaz de ativar as proteínas MAPK ERK1/2, p38 e JNK (Figura 1, C) em A549. O tempo de estímulo capaz de causar maior fosforilação das cinases foi de 30 minutos, sendo então o escolhido para os experimentos seguintes. A fim de excluir resultados falso-positivos, foi realizado um teste de viabilidade celular para verificar se a dose de HSP70 utilizada (1 µg/mL) [62] não estaria danificando a célula; os resultados mostram a proteína não interfere na viabilidade celular (Figura suplementar, B), inclusive na concentração mais alta, que foi a utilizada neste trabalho.

Os primeiros experimentos obtidos validam nosso modelo de estudo, uma vez que as células são capazes de responder ao estímulo da eHSP70. Para investigar o envolvimento do RAGE nestas respostas, realizamos o silenciamento do receptor através da técnica que utiliza pequenas moléculas de RNAs interferentes (siRNAs) para atenuar a expressão de proteínas. A figura 2 do artigo mostra que os níveis de mRNA (A) e imunoconteúdo (B) de RAGE diminuíram significativamente com o uso dessa metodologia. Embora alguns trabalhos mostrem que uma baixa expressão de RAGE em

A549 cause alterações celulares [46, 47], não detectamos mudanças significativas em relação a morfologia (Figura 2, C) e viabilidade celular (Figura suplementar, D).

As células com expressão reduzida de RAGE foram desafiadas com eHSP70; os resultados revelaram que, dentre as respostas celulares envolvendo MAPK, apenas a via da ERK1/2 se relaciona com a ativação de RAGE por eHSP70, uma vez que o silenciamento do receptor levou a uma diminuição da fosforilação desta cinase (Figura 2, D), e não de p38 (E) e JNK (F). Esses resultados corroboram com dados da literatura, os quais mostram que fosforilação rápida de ERK1/2 é uma resposta intracelular típica à ativação de RAGE: pode ser ativada através de espécies reativas (ER), que atuam como segundos-mensageiros em pelo menos uma das etapas da ativação de RAGE [33, 63] ou através da ligação direta de ERK à cauda citosólica do receptor [34]. A ativação de ERK1/2, por sua vez, está estritamente relacionada com respostas inflamatórias da célula [64].

Em contraste com a via ERK1/2 relativamente isolada (ativação específica por MAP2K, MEK1/2), as vias de sinalização das cinases p38 e JNK possuem vários ativadores MAP3K e MAP2K em comum. Uma vez que a resposta celular é dinâmica e não isolada, as cinases p38 e JNK também participam de processos inflamatórios, porém, alguns trabalhos indicam que elas estão diretamente relacionadas com proliferação, diferenciação e alterações no ciclo celular [30, 52]. Esse tipo de respostas celulares não foram moduladas por eHSP70 em A549, como mostrado nas análises de ciclo (Figura suplementar, A) e viabilidade celular (Figura suplementar, B).

A proteína cinase ERK1/2 quando ativada é capaz de fosforilar outras proteínas e conduzir a ativação fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B. Este fator de transcrição, por sua vez, pode ser ativado através da via clássica ou alternativa, dependendo do receptor celular que gerou o sinal e das vias de sinalização desencadeadas [65]. Quando ativo, o NF- $\kappa$ B é translocado para o núcleo, onde é capaz de se ligar à sítios do DNA de aproximadamente 9-10 pares de bases, os quais possuem uma grande variabilidade. Dessa forma, o NF- $\kappa$ B regula a expressão de um amplo espectro de genes, atribuindo um papel importante no controle de processos biológicos, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias, processos de desenvolvimento, crescimento celular e

apoptose [65]. A disfunção de NF- $\kappa$ B associa-se com diversas enfermidades, por isso o monitoramento da sua atividade é essencial para desvendar o mecanismo de doenças.

A fim de avaliar a propagação do sinal eHSP70/RAGE/ERK1/2, realizou-se ensaio de gene repórter utilizando um plasmídeo contendo um elemento responsivo ao NF- $\kappa$ B fusionado ao gene da luciferase. O estímulo proveniente da eHSP70 foi capaz de aumentar em até 3 vezes a ativação do fator de transcrição (Figura 2, G); este efeito foi bloqueado em células com o RAGE comprometido - células silenciadas para o receptor e células pré-incubadas com o antagonista comercial FPS-ZM1. O papel inibidor do FPS-ZM1 é atribuído ao seu antagonismo, e não à morte celular, como comprovando no teste de viabilidade (Figura suplementar C). A via da ERK1/2 também está envolvida na ativação de NF- $\kappa$ B mediada por eHSP70, uma vez que o inibidor farmacológico de MEK 1/2 (UO126) bloqueou a indução. Estes resultados são extremamente significativos, pois o eixo de sinalização ERK1/2 /NF- $\kappa$ B é considerado uma característica clássica da sinalização celular mediada por RAGE.

Dados da literatura mostram que a HSP70 extracelular pode se ligar à receptores da membrana plasmática, provocar a ativação de NF- $\kappa$ B e regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em monócitos humanos [22]. Nós avaliamos se a eHSP70 seria capaz de modular a inflamação em não pequenas células de câncer de pulmão da linhagem A549, e qual seria a relevância do RAGE neste processo. Ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) revelaram que eHSP70 é capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 3, A; Tabela 1). O TNF- $\alpha$  é um mediador inflamatório que tem sido implicado na carcinogênese e pode ser produzido nos estágios iniciais da inflamação; já as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 promovem a invasividade e a malignidade do câncer [53, 66]. A indução da expressão dessas citocinas estão envolvidas diretamente com RAGE, pois uma vez silenciado o receptor é silenciado, os efeitos pró-inflamatórios visualizados foram revertidos.

A expressão de IL-13 foi diminuída nas células expostas a eHSP70 via RAGE. A IL-13 é uma citocina tipo Th2, ou seja, de perfil anti-inflamatório, e atua como mediador central das alterações fisiológicas induzidas por inflamação alérgica. A sua expressão no

pulmão está correlacionada com a hipersecreção do muco, o que contribui para a progressão das doenças alérgicas das vias aéreas [67]. Paralelamente, IL-13 é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e regular MHCII de monócitos [68]. Neste contexto, a inibição da expressão de IL-13 por eHSP70 pode contribuir para conduzir células cancerosas para um perfil pró-inflamatório. A expressão da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$ , por sua vez, não foi alterada por eHSP70. Juntos, nossos resultados sugerem que o RAGE exerce um papel central sobre os efeitos pró-inflamatórios de eHSP70 na linhagem celular de câncer de pulmão A549. É importante ressaltar que esses efeitos foram causados exclusivamente por eHSP70 e não por um possível conteúdo residual de LPS presente na proteína recombinante. Certificamo-nos de utilizar uma proteína livre de endotoxina (0.07EU/mL), o que exclui os riscos de resultados falsos-positivos.

É bem reconhecido que eHSP70 pode promover a produção de citocinas em APCs via TLR e outros receptores classificados como lectina do tipo c [20]. Nossos resultados indicam que RAGE é um receptor importante de eHSP70, e particularmente em nosso modelo celular, este receptor é essencial para promover a expressão de citocinas através do estímulo exercido pela eHSP70. Isto acontece, provavelmente, porque o RAGE é o principal reconhecedor de padrões na linhagem celular de pulmão A549, e a sua expressão constitutiva é superior em relação aos TLRs e outros receptores. Efeitos semelhantes foram descritos em células epiteliais bronquiolares humanas (NHBE, do inglês normal human bronchial epithelial), uma vez que o bloqueio de RAGE prejudicou a produção de citocinas inflamatórias estimuladas por HMGB1 extracelular [69].

Embora alterações genóticas e exposições a agentes tóxicos sejam cruciais para a tumorigênese, é de extrema importância entender relações fisiológicas entre diferentes células dentro da massa tumoral. Diferentes trabalhos mostram que o desenvolvimento tumoral e malignidade são o resultado de processos que envolvem tanto as próprias células cancerígenas como as células não cancerosas, compondo uma massa tumoral com heterogeneidade celular. As células imunológicas encontradas com maior frequência no microambiente do tumor são macrófagos associados a tumores (TAMs) e células T. Os TAMs promovem principalmente o crescimento tumoral e desempenham papel

determinante na angiogênese, invasão e metástase [54]. Sendo assim, é extremamente relevante compreender a interação entre células tumorais e seu microambiente, pois esta determina se o tumor será capaz de crescer (e invadir outros tecidos) ou se ele será combatido pelo sistema imunológico e “destruído”.

Nesse contexto, torna-se interessante estudar como os efeitos da ativação de RAGE por eHSP70 em A549 poderiam modular respostas de células imunes. A fim de contextualizar a biologia tumoral, estudamos os efeitos do meio condicionado A549 sobre a modulação da transcrição de gene de citocinas em monócitos da linhagem celular U937. Em resposta ao meio condicionado de células A549 tratadas com eHSP70, os monócitos apresentaram uma redução acentuada no perfil pró-inflamatório e aumento do perfil anti-inflamatório (Figura 3, B; Tabela 2): a expressão de IL-6 diminuiu significativamente e, em contraste, a IL-13 foi altamente expressada nessas condições. Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pareceram diminuir, embora não tenham apresentado diferença significativa; a expressão de TGF- $\beta$  também não alterou, tal como nas células A549. Por outro lado, a expressão das citocinas nos monócitos apresentaram níveis basais quando tratados com meio condicionado de células A549 com RAGE nocauteado e tratadas com eHSP70, reforçando, desta forma, que a interação eHSP70-RAGE é importante tanto para a resposta tumoral quanto para a polarização de monócitos associados a tumores.

Sabe-se que a IL-13 regula negativamente a atividade de macrófagos através da inibição da transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias [70, 71]. Aqui, possivelmente, a expressão aumentada de IL-13 pelos monócitos poderia regular a redução dos níveis de mRNAs de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 nas próprias células, como parte de uma resposta imunossupressora para compensar o estado pró-inflamatório das células tumorais.

Os macrófagos associados a tumores (TAM) liberam fatores de crescimento que contribuem para o desenvolvimento e metástase do tumor, mantendo o meio com propriedades anti-inflamatórias [54, 72]. Neste estudo, as células de monócitos



expressaram um perfil imunossupressor em resposta a moduladores secretados por células A549 estimuladas com eHSP70. Existem muitas moléculas candidatas que podem estar sendo secretadas por A549 e capazes impulsionar respostas de monócitos, como HMGB1, que podem conduzir atividades pró-tumorais de macrófagos M2 [54, 73] ou TGF- $\beta$ , que juntamente com outros fatores contribui para a progressão tumoral.

Por fim, dados presentes na literatura mostram que a eHSP70 pode intermediar a produção de citocinas pró-inflamatórias através da via de transdução de sinal MyD88/IRAK/NF- $\kappa$ B através da interação TLR2 e TLR4 [23]. Nosso estudo foi o primeiro a mostrar a relevância de RAGE na atividade transcricional de NF- $\kappa$ B e modulação da resposta inflamatória exercida por eHSP70. A diminuição dos níveis de RAGE impediu a transdução provenientes da eHSP70, mostrando a essencialidade deste receptor para a responsividade de A549 e modulação da interação destas células com o sistema imunológico.

## 5. Conclusão

Os objetivos do trabalho foram alcançados e os resultados podem ser sumarizados

em:

- I. Foi possível estabelecer uma interação física entre a eHSP70 e RAGE em não pequenas células de câncer de pulmão humano, A549;
- II. A interação entre a proteína extracelular e o receptor foi capaz de desencadear efeitos celulares típicos da ativação de RAGE, como fosforilação de ERK, ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. e aumento da expressão de citocinas com perfil pró-inflamatório;
- III. Adicionalmente, e ainda mais importante, foi comprovado que o RAGE exerce papel fundamental como mediador das respostas celulares ativadas por eHSP70, pois uma vez que silenciado o receptor, os efeitos de sinalização foram inibidos;
- IV. A ação moduladora de eHSP70 sobre a resposta inflamatória de A549 através de RAGE foi capaz de evocar importantes alterações imunológicas em monócitos, mostrando sua relevância em influenciar a interação entre o câncer e as células do sistema imune.

Sendo assim, estes resultados representam uma novidade no processo de elucidação dos mecanismos de sinalização celular envolvendo a HSP70 extracelular e o receptor RAGE, atribuindo à eHSP70 propriedades que a permitem atuar como agonista de RAGE.

## 6. Perspectivas

A identificação dos fatores secretados pelas A549 após o estímulo com eHSP70 não foi o foco inicial de nosso trabalho, por isso este estudo está limitado a esses dados. No entanto, esta é uma análise interessante a ser realizada em estudos futuros, uma vez que pode contribuir para uma compreensão mais profunda da importância biológica da interação eHSP70-RAGE. A fim de dar continuidade ao trabalho e aprofundar o estudo da ação da proteína HSP70 extracelular sobre o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), também desejamos avaliar respostas fisiológicas como apoptose, invasividade e angiogênese em A549.

Nesse contexto, também é interessante compreender como a HSP70 extracelular seria capaz de modular o sistema imunológico através de RAGE. Uma vez que os níveis de expressão do receptor aumentam quando monócitos são diferenciados a macrófagos, estes modelos se tornam bastante promissores para investigar o papel de HSP70 na resposta inflamatória.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs*. J Mol Biol, 1974. **84**(3): p.389-98.
2. Schlesinger, M.J., Tissibres, A., and Ashburner, M., *Heat Shock: From Bacteria to Man*. Genetics Research, 1983. **42**(1): p. 111-114.
3. Schlesinger, M.J., *Heat shock proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12111-4.
4. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism*, in *Cell Mol Life Sci*. 2005. p. 670-84.
5. Nuri Kim, J.Y.K., Midori A. Yenar, *Anti-inflammatory properties and pharmacological induction of Hsp70 after brain injury* | SpringerLink. Inflammopharmacology, 2012(3): p. 177-185.
6. Kim, J.Y. and M.A. Yenari, *The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury*. Anat Cell Biol, 2013. **46**(1): p. 1-7.
7. Nylandsted, J., et al., *Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7871-6.
8. Klucken, J., et al., *Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25497-502.
9. Bonini, N.M., *Chaperoning brain degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99** Suppl 4: p. 16407-11.
10. Basu, S., et al., *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway*. Int Immunol, 2000. **12**(11): p. 1539-46.
11. Mambula, S.S. and S.K. Calderwood, *Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7849-57.
12. Evdonin, A.L., et al., *The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(6): p. 443-55.
13. Vega, V.L., et al., *Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4299-307.
14. De Maio, A., *Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa*. Cell Stress Chaperones, 2011. **16**(3): p. 235-49.
15. Campisi, J., T.H. Leem, and M. Fleshner, *Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system*. Cell Stress Chaperones, 2003. **8**(3): p. 272-86.
16. Ren, B., et al., *Serum levels of HSP70 and other DAMP proteins can aid in patient diagnosis after traumatic injury*, in *Cell Stress Chaperones*. 2016. p. 677-86.
17. Dutta, S.K., et al., *Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer*. Pancreas, 2012. **41**(4): p. 530-4.
18. Gelain, D.P., et al., *Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis*. Shock, 2011. **35**(5): p. 466-70.
19. Chen, G.Y. and G. Nuñez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
20. Theriault, J.R., et al., *Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(9): p. 1951-60.

21. Calderwood, S.K., S.S. Mambula, and P.J. Gray, Jr., *Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 28-39.
22. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 435-42.
23. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
24. Asea, A., *Chaperokine-Induced Signal Transduction Pathways*. Exerc Immunol Rev, 2003. **9**: p. 25-33.
25. Borges, T.J., et al., *The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70*. Front Immunol, 2012. **3**: p.95.
26. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
27. Yamazaki, S., et al., *TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18833.
28. Wang, R., et al., *Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens*. 2006.
29. Milani, V., et al., *Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation*. Int J Hyperthermia, 2002. **18**(6): p. 563-75.
30. Zhe, Y., et al., *Extracellular HSP70-peptide complexes promote the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via TLR2/4/JNK1/2MAPK pathway*. Tumour Biol, 2016.
31. Chuah, Y.K., et al., *Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases*. Int J Inflam, 2013. **2013**: p. 403460.
32. Schmidt, A.M., et al., *The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1498**(2-3): p. 99-111.
33. Yamamoto, Y., et al., *Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 3248-57.
34. Ishihara, K., et al., *The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site*. FEBS Lett, 2003. **550**(1-3): p. 107-13.
35. Ibrahim, Z.A., et al., *RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours?* Mol Immunol, 2013. **56**(4): p. 739-44.
36. Xie, J., et al., *Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. Cell Signal, 2013. **25**(11): p. 2185-97.
37. Guglielmo Sorcia, F.R., Ileana Giambanco, Rosario Donatoa, *RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration*. 2013. **1833**(1): p. 101–109.
38. Bucciarelli, L.G., et al., *RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(7): p. 1117-28.
39. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
40. Li, J. and A.M. Schmidt, *Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16498-506.
41. Yan, S.F., et al., *Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation*. Ann Med, 2009. **41**(6): p. 408-22.
42. Brett, J., et al., *Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1699-712.
43. Morbini, P., et al., *The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease?* Mod Pathol, 2006. **19**(11): p. 1437-45.
44. Shirasawa, M., et al., *Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells*. Genes Cells, 2004. **9**(2): p. 165-74.

45. Lizotte, P.P., et al., *Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 15.
46. Buckley, S.T. and C. Ehrhardt, *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 917108.
47. Queisser, M.A., et al., *Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(3): p. 337-45.
48. Marinakis, E., et al., *Critical role of RAGE in lung physiology and tumorigenesis: a potential target of therapeutic intervention?* Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(2): p. 189-200.
49. Nakano, N., et al., *Association of advanced glycation end products with A549 cells, a human pulmonary epithelial cell line, is mediated by a receptor distinct from the scavenger receptor family and RAGE*. J Biochem, 2006. **139**(5): p. 821-9.
50. Schraml, P., I. Bendik, and C.U. Ludwig, *Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3669-71.
51. Hofmann, H.S., et al., *Discrimination of human lung neoplasm from normal lung by two target genes*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(5): p. 516-9.
52. de Bittencourt Pasquali, M.A., et al., *Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B in human lung cancer A549 cells*. Cell Signal, 2013. **25**(4): p. 939-54.
53. Landskron, G., *Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment*, P.T. Marjorie De la Fuente, Chanitra Thuwajit, and Marcela A. Hermoso, Editor. 2014, Hindawi Publishing Corporation: Journal of Immunology Research.
54. Whipple, C.A., *Tumor talk: understanding the conversation between the tumor and its microenvironment*. Cancer Cell Microenviron, 2015. **2**(2): p. e773.
55. Ruan, B.H., et al., *Complement C3a, CpG oligos, and DNA/C3a complex stimulate IFN- $\alpha$  production in a receptor for advanced glycation end product-dependent manner*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4213-22.
56. Grunwald, M.S., et al., *Putative model for heat shock protein 70 complexation with receptor of advanced glycation end products through fluorescence proximity assays and normal mode analyses*. Cell Stress Chaperones, 2016.
57. Gebhardt, C., et al., *RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development*, in *J Exp Med*. 2008. p. 275-85.
58. Tesarova, P., et al., *RAGE and its ligands in cancer - culprits, biomarkers, or therapeutic targets?* Neoplasma, 2015. **62**(3): p. 353-64.
59. Schmitt, E., et al., *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 15-27.
60. Dodd, K., et al., *Tumor-Derived Inducible Heat Shock Protein 70 (HSP70) is an Essential Component of Anti-Tumor Immunity*. Oncogene, 2015. **34**(10): p. 1312-22.
61. Ferrell, J.E., Jr., *Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(12): p. 460-6.
62. Grunwald, M.S., et al., *The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity*. Cell Stress Chaperones, 2014. **19**(6): p. 913-25.
63. Srikanth, V., et al., *Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(5): p. 763-77.
64. Yeh, C.-H., et al., *Requirement for p38 and p44/p42 Mitogen-Activated Protein Kinases in RAGE-Mediated Nuclear Factor- $\kappa$ B Transcriptional Activation and Cytokine Secretion*. 2001.
65. Gilmore, T.D., *Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-6684.

66. Apte, R.N., et al., *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 387-408.
67. Zhu, Z., et al., *Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production*, in *J Clin Invest*. 1999. p. 779-88.
68. Suzuki, A., et al., *Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy*. *Cytokine*, 2015. **75**(1): p. 79-88.
69. Liang, Y., et al., *HMGB1 binding to receptor for advanced glycation end products enhances inflammatory responses of human bronchial epithelial cells by activating p38 MAPK and ERK1/2*. *Mol Cell Biochem*, 2015. **405**(1-2): p. 63-71.
70. Zhu, C., et al., *Interleukin-13 inhibits cytokines synthesis by blocking nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase in human mesangial cells* ☆, in *J Biomed Res*. 2010. p. 308-16.
71. *IL13 interleukin 13 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596>.
72. Tyan, S.W., et al., *Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p.e15313.
73. Rojas, A., et al., *HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(3): p. 3321-9.

## 8. Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Secreção de HSPs e interação com diversas células-alvo.

Figura 2: Representação esquemática do RAGE e suas formas variantes.

Figura 3: O acoplamento de RAGE por múltiplos ligantes ativa várias vias de sinalização.

Figura 4: Expressão de RAGE (gene e proteína) de acordo com o tecido.

Tabela 1: Indutores de HSPs.