

# A HSP70 extracelular modula o estado de ativação inflamatória de células de câncer de pulmão humano através da ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE).

Brum, P.O.; Gelain, D.P.

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

## Introdução

A atividade extracelular da proteína de choque térmico 70 (HSP70) foi recentemente descrita em condições inflamatórias, quando é ativamente secretada. A HSP70 extracelular (eHSP70) age como um padrão molecular associado a dano (DAMP), interagindo com receptores que levam a ativação de vias inflamatórias. Neste contexto, o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é um potencial candidato para a interação com a eHSP70. O RAGE é um receptor de reconhecimento de padrões classicamente descrito por sua interação com diversas moléculas de sinalização tais quais produtos finais de glicação avançada (AGE), HMGB1, S100B,  $\beta$ -amyloid, fosfatidilserina e C3a. Uma das principais consequências da ligação por moléculas sinalizadoras ao RAGE é a ativação da via ERK1/2 levando a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e consequente expressão de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias.

## Objetivo

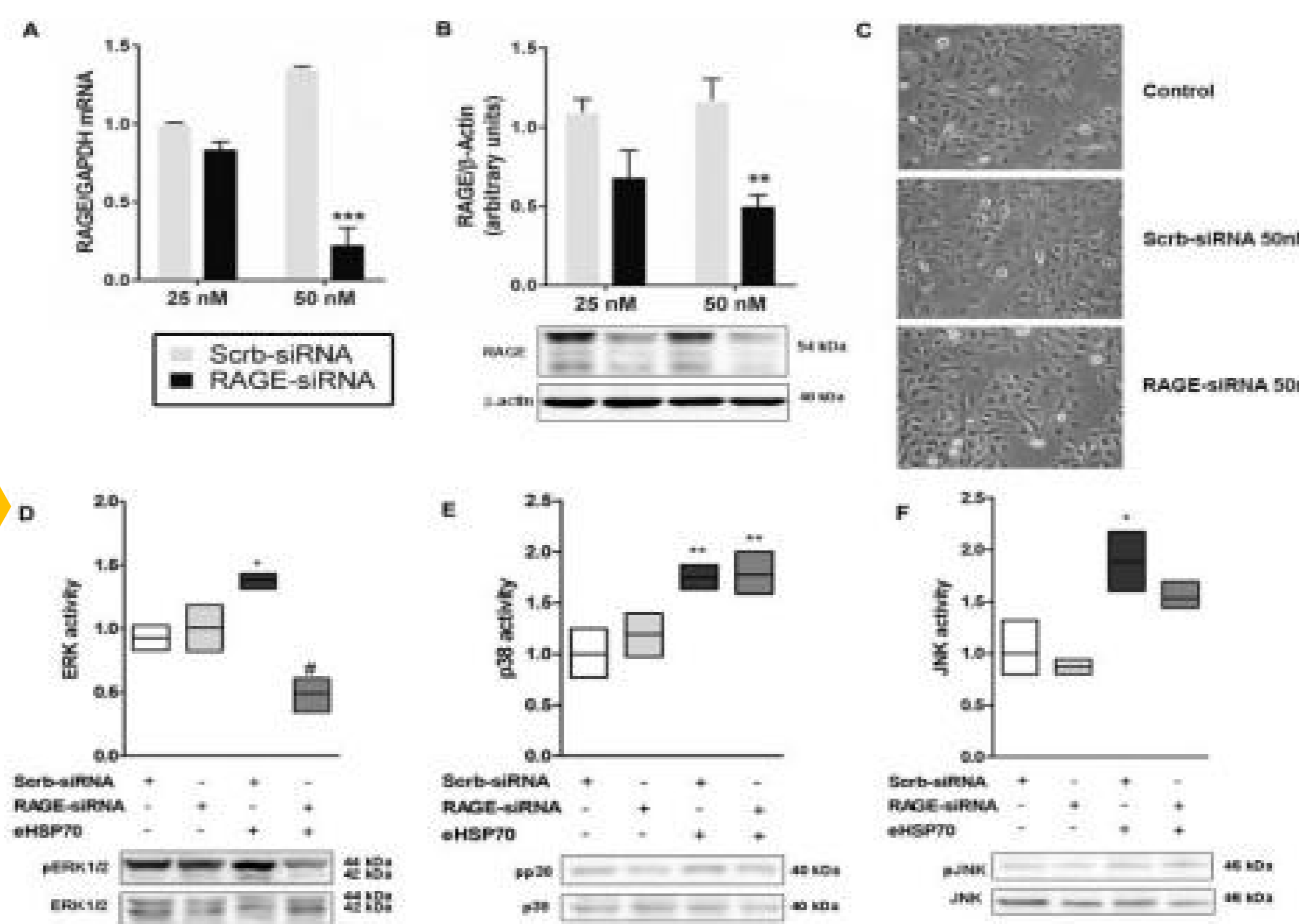
O objetivo deste trabalho foi avaliar se a eHSP70 é capaz de levar a ativação da via ERK1/2 através de RAGE.

## Metodologia

Foram utilizadas células da linhagem A549 de câncer de pulmão humano. Estas células expressam constitutivamente RAGE. Para avaliar a importância do RAGE na resposta celular ao tratamento com eHSP70 utilizamos a técnica de silenciamento por transfecção com siRNA para atenuar a expressão deste receptor e também utilizamos o inibidor farmacológico do RAGE (FPS-ZM1). A ativação das vias de sinalização foi avaliada por meio de imunodeteção por western blot, ensaio do gene repórter da luciferase e PCR em tempo real.

## Resultados e Discussão

**eHSP70 leva a fosforilação de MAPK de maneira tempo-dependente:** Células A549 foram incubadas com eHSP70 (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) em uma curva de tempo (máximo de 120min). Imunodeteção de (A) ERK1/2 (B) p38 e (C) JNK foi realizada utilizando a técnica de Western Blot. Gráficos mostram média  $\pm$  EPM (ANOVA de duas vias seguido de Tukey: \* $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.001 comparado ao controle).

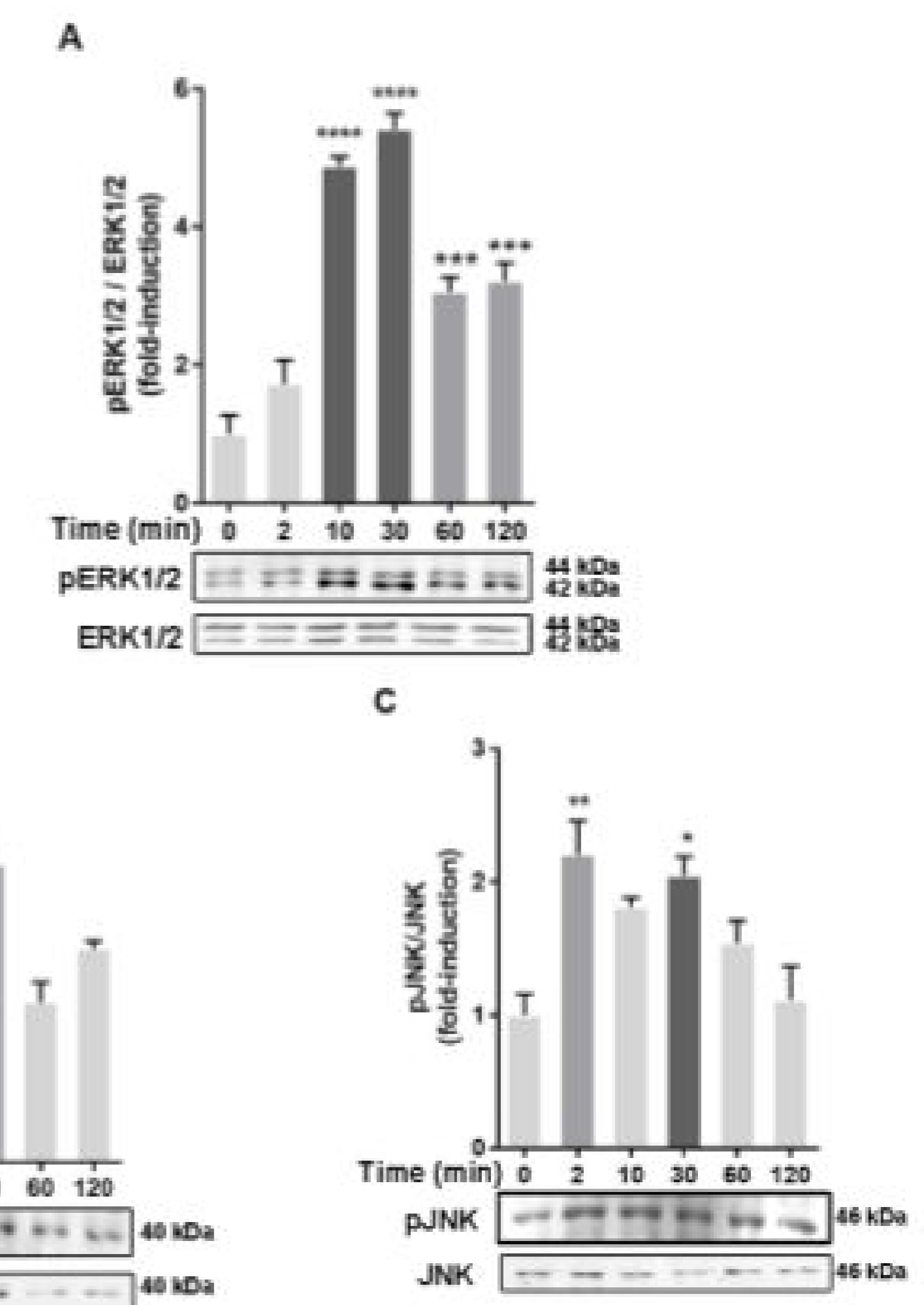


**eHSP70 induz transcrição de citocinas pro-inflamatórias dependente de RAGE:** Células silenciadas para RAGE foram incubadas por 12h com eHSP70. RNA foi extraído para determinar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 e TGF- $\beta$  através de RTqPCR. ANOVA seguida de Bonferroni (\*  $p$ <0.05 e \*\*  $p$ <0.001 comparado ao controle; #  $p$ <0.01 comparado as células silenciadas para RAGE tratadas com eHSP70)

	Scrb-siRNA	RAGE-siRNA	Scrb-siRNA + HSP70	RAGE-siRNA + 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

## Conclusão

Observamos que o tratamento com eHSP70 levou a um aumento da ativação das vias de sinalização ERK1/2 e consequente transativação de NF- $\kappa$ B enquanto nas células onde o RAGE foi silenciado houve uma atenuação desta ativação. A expressão de citocinas pró-inflamatórias nas células tratadas com eHSP70 e silenciadas para RAGE foi reduzida. Baseado nestes resultados concluímos que os efeitos pró-inflamatórios da eHSP70 nas células A549 são mediados pela ativação extracelular do RAGE. Estes dados indicam que a via eHSP70-RAGE pode exercer um importante papel regulatório do estado imunológico em células de câncer de pulmão.



**eHSP70 ativa ERK1/ERK2 através de RAGE:** Silenciamento do RAGE foi realizado utilizando a técnica de siRNA. Após 48h as amostras foram coletadas e o conteúdo de RAGE foi mensurado utilizando (A) RTqPCR para expressão de mRNA e (B) imunodeteção por western blot (ANOVA seguido de Tukey: \*\*  $p$ <0.01, \*\*\*  $p$ <0.001). (C) Análise da morfologia após 48h de transfecção. Células transfectadas foram tratadas com eHSP70 (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) por 30min e a fosforilação de (D) ERK1/ERK2, (E) p38 e (F) JNK foi avaliada (ANOVA seguida de Bonferroni: \*  $p$ <0.01, \*\*  $p$ <0.001, #  $p$ <0.0004 comparado a células transfectadas com scramble tratadas com eHSP70)

**Através do RAGE, eHSP70 leva a um aumento da ativação de NF- $\kappa$ B:** O ensaio do gene repórter da luciferase foi realizado em células silenciadas com siRNA ou tratadas com inibidores farmacológicos para RAGE previamente ao tratamento com eHSP70 (12 horas). Atividade da luciferase foi medida (ANOVA seguida de Tukey: \*\*\*  $p$ <0.0001).

