

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A ALTAS  
CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

BRASÍLIA, 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A ALTAS  
CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA

2016

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A ALTAS  
CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 26 de Julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Taia Maria Berto Rezende (presidente)  
Universidade de Brasília

Bernardo Petriz de Assis  
Centro Universitário do Distrito Federal - UDF

Ana Paula Dias Ribeiro  
Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Vicente e Luciana, que sempre me apoiam e incentivam em tudo, porque uma conquista minha é também uma conquista de vocês. Dedico também aos meus amigos, sempre companheiros. Obrigada, eu amo vocês!*



## AGRADECIMENTOS

À orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taia Maria Berto Rezende**, pela excelente orientação que me foi prestada, suporte e confiança;

Ao co-orientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, pela oportunidade e incentivo de me ver crescer, como pessoa e cientista;

Aos membros da banca avaliadora, em especial à **Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro** pela compreensão em aceitar o convite de última hora e ao **Prof. Dr. Bernardo Petriz de Assis e Profa. Dra. Evelyn Mikaela Kogawa**, pela disponibilidade em me avaliar e contribuir;

Aos amigos de laboratório e de vida **Mirna de Souza Freire, Stella Maris de Freitas Lima, Nelson de Oliveira Júnior, Flávia Pereira Dutra**, por sempre estarem ao meu lado, na alegria ou na tristeza, ou seja, no resultado ou no fracasso, pelas comidas, risadas e festas, sem vocês eu não estaria onde estou e seria uma pessoa menos feliz;

À grande amiga **Ingrid Amorim Aquino**, por todo o companheirismo e ajuda;

Aos amigos **Daniel Amaro, Kelly Mulder, Camila Guimarães**, por sempre me ajudarem, não importando o que fosse;

Ao amigo e importante colaborador **Jeeser Alves de Almeida**, por toda a colaboração na análise estatística;

Aos alunos de iniciação científica **Tarsila de Moura Figueiredo e Danilo César Martins**, por todo o auxílio e dedicação;

À **Arthur Corrêa Rezende Ferreira**, por toda a paciência, compreensão, ajuda nas horas de desespero e principalmente por todo o amor;

À amiga e técnica **Kênia Chaves**, Klena, Krena, Perua, Keninha, por sempre me ajudar em tudo que podia;

Aos meus pais **Vicente Cantuária e Luciana Cantuária**, e ao meu irmão **Vinícius Cantuária**, por todo o incentivo, a preocupação e torcida;

À minha família, minha avó **Edna Castro**, minhas tias e madrinha **Márcia Castro e Christiani Leitão**, meu tio **Márcio Leitão** e meus primos queridos **Matheus, Jonas, Gabriel e Mariana**, por todo o incentivo e a torcida;

Aos amigos de sempre **Henrique Guariento, Phellipe Salomão e Olga Moraes**, que mesmo sem entender muito bem o que eu faço sempre estão na minha torcida e por serem os mais compreensivos;

Aos amigos queridos **Mariana Melo, Diego Rocha, André Phelipy Barbosa e Fernanda Koser**, por todo o apoio e torcida;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** da Universidade de Brasília, pela oportunidade;

Ao **Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas** da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura;

À **CAPES, CNPq, FAPDF, UCB e UnB**, pelo auxílio financeiro;

Meus sinceros agradecimentos.

*“Sucesso consiste em ir de um fracasso à  
outro sem perder o entusiasmo”  
(Winston Churchill)*

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) consiste em uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica que pode levar a lesão de células e tecidos. Uma das possíveis causas das lesões pode ser o desequilíbrio que ocorre no sistema imune. Nesta condição, inúmeros peptídeos já foram descritos com o potencial imunomodulador. Contudo, ainda não foi descrito na literatura o efeito desses peptídeos nas células imunes em condições de elevadas concentrações de glicose, associadas à estímulos infecciosos e inflamatórios. Sendo assim, este estudo objetivou verificar o potencial imunomodulador de peptídeos sintéticos frente a um modelo de hiperglicemia *in vitro*, avaliando a produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios. Para tanto o estudo foi dividido em 3 fases: (1) avaliação da resposta *in vitro* das diferentes concentrações de glicose; (2) seleção dos peptídeos candidatos (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 e DJK-6); e (3) avaliação da produção de citocinas *in vitro* na presença de 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018. Para tanto, foram realizados ensaio de viabilidade celular, seguido da dosagem de citocinas (ELISA e reação de Griess) em células RAW 264.7 incubadas com ou sem D-glicose, lipopolissacarídeo (LPS), recombinante interferon ( $\text{rIFN}$ )- $\gamma$  e peptídeos. Foram determinadas a produção da proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e óxido nítrico (NO) na primeira e terceira fase e apenas IL-6, TNF- $\alpha$  e NO na segunda fase. Na primeira fase, os estímulos de glicose não foram capazes de alterar a viabilidade celular, ocorreu um aumento na produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12, enquanto que a produção de IL-10 diminuiu. Na segunda fase, todos os peptídeos mantiveram a viabilidade das células. Dentre os peptídeos testados, o peptídeo IDR-1018 foi o escolhido para a fase seguinte, por diminuir a produção de TNF- $\alpha$  e manter os níveis basais de produção de NO, juntamente com o peptídeo LL-37, utilizado como peptídeo de comparação. E na terceira fase o IDR-1018 manteve os níveis basais de MCP-1, IL-6, IL-12 e IL-10, diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  e aumentou a produção de NO, semelhante aos resultados obtidos na presença da LL-37. Desta maneira, a partir dos resultados obtidos, o peptídeo IDR-1018 sugere um efeito protetor, promovendo a manutenção dos níveis basais e não permitindo o aumento da produção dos mediadores pró-inflamatórios, para que assim não ocorra um possível dano celular.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Cultura celular; Sistema imune; Peptídeos imunomoduladores; Citocinas; ELISA.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) consists in a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia, which may lead to cells and tissues damage. One of the possible causes of the injury can be the imbalance occurring in the immune system. In this condition, many peptides have been described with the immunomodulatory potential. However, it has not yet been described in the literature these peptides effects on the immune cells in conditions of high glucose concentrations, associated with infectious and inflammatory stimuli. Thus, this study aimed to verify the biotechnological potential of immunomodulatory synthetic peptides front of an *in vitro* hyperglycemia model, evaluating the production of pro- and anti-inflammatory mediators. For this, the study was divided into three phases: (1) assessing the *in vitro* response of different glucose concentrations; (2) selection of candidate peptides (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 and DJK-6); and (3) evaluation of cytokine production *in vitro* in the presence of 64 µg.mL<sup>-1</sup> IDR-1018 peptide. Therefore, there were carried cell viability assay, followed by cytokine assay (ELISA and Griess reaction) in RAW 264.7 cells incubated with or without D-glucose, lipopolysaccharide (LPS), recombinant interferon (rIFN)-γ and peptides. It were determined the production of monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, interleukin (IL) -1α, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-12, IL-10 and nitric oxide (NO) in first and third phase and only IL-6, TNF-α and NO in the second phase. In the first phase, the glucose stimuli were not capable of altering the cell viability. There was an increase in IL-6, TNF-α and IL-12 production, whereas IL-10 production decreased. In the second phase, all the peptides maintained the cell viability. Among the peptides tested, the IDR-1018 peptide was chosen for the next stage, by reducing TNF-α production and maintains basal levels of NO production, along with LL-37 peptide, used as a comparison peptide. And in the third stage, IDR -1018 maintained baseline levels of MCP-1, IL-6, IL-12 and IL-10, decreased TNF-α production and increased NO production, similar to the results obtained in the presence of LL-37. Thus, from the results, the IDR-1018 peptide suggests a protective effect *in vitro*, promoting the maintenance of baseline levels and not allowing the increasing production of pro-inflammatory mediators, which thereby does not happen possible cell damage.

Keywords: Diabetes Mellitus; Cell culture; Immune system; Immunomodulatory peptides; Cytokines; ELISA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fluxograma de desenvolvimento do trabalho.....50
- Figura 2 – Viabilidade celular na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 6, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....59
- Figura 3 – Produção de MCP-1 na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C). A produção da quimiocina MCP-1 foi avaliada a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....60
- Figura 4 – Produção de IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A, D e G), LPS (B, E e H) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C, F e I). Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....63
- Figura 5 – Produção de citocinas com perfil M1 (IL-12) e M2 (IL-10) na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A e D), LPS (B e E) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C e F). A produção das citocinas, IL-12 (A, B e C) e IL-10 (D, E e F) foram avaliadas a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....64
- Figura 6 – Produção de NO na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 24, 48, 72 horas e 7 dias. A produção de NO foi avaliada a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos

os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorvância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....66

Figura 7 – Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....72

Figura 8 – Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....75

Figura 9 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....78

Figura 10 – Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....81

Figura 11 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-

glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....84

Figura 12 - Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio padrão de uma réplica biológica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....87

Figura 13 - Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio padrão de uma réplica biológica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....90

Figura 14 - Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Não houveram diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....92

Figura 15 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....95



Figura 16 - Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....99

Figura 17 – Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni..... 103

Figura 18 – Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....106

Figura 19 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni..... 109

Figura 20 – Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....112

Figura 21 – Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 6h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Não houveram diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....116

Figura 22 - Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 24h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.....118

Figura 23 - Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 72h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni .....120

Figura 24 – Produção de MCP-1 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 6h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....122

Figura 25 – Produção de IL-1 $\alpha$  na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....125

Figura 26 – Produção de IL-6 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N),

(E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....127

Figura 27 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....130

Figura 28 – Produção de IL-12 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....132

Figura 29 – Produção de IL-10 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 72h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.....134

Figura 30 – Produção de NO na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 72h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni .....136

Figura 31 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95%.....162

Figura 32 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%.....163

Figura 33 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1002 (1652,1 Da), com pureza superior a 95%.....164

Figura 34 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo DJK-6 (1666,9 Da), com pureza superior a 95%.....165

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de referência dos diferentes testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico de Diabetes Mellitus, de acordo com a Associação Americana de Diabetes.....	25
Tabela 2 – Células e moléculas solúveis dos sistemas imunes inato e adaptativo. Adaptado de Cruvinel et al., 2010.....	28
Tabela 3 – Fases de realização dos experimentos e grupos experimentais testados.....	54
Tabela 4 - Resumo dos resultados da fase 1 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.....	68
Tabela 5 - Resumo dos resultados da fase 2 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.....	114
Tabela 6 – Resumo dos resultados da fase 3 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\alpha$  MEM – *Minimum Essential Medium Alpha Medium*
- ADA – Associação Americana de Diabetes
- AMPs – Peptídeos antimicrobianos
- APCs – Células apresentadora de antígenos
- BSF-2 – Fator estimulante de células B 2
- CATH-2 – Peptídeo catelecidina 2
- CCR2 – Receptor de MCP-1
- CHDPs – Peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro
- CPPs – Peptídeos capazes de penetrar no meio intracelular
- DAMPs – Padrões moleculares associados à danos
- DCs – Células dendríticas
- DDP-4 – Dipeptil peptidase 4
- DM – Diabetes Mellitus
- DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMG - Diabetes Mellitus gestacional
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EGFR – Receptor de fator de crescimento da epiderme
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
- eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
- GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
- HbA1c – Hemoglobina glicada
- HBDs – beta defensinas humana
- HDPs – Peptídeos de defesa do hospedeiro
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- HNPs – Peptídeos de neutrófilos humanos
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
- IDRs – Peptídeos reguladores da defesa inata
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- IL – Interleucina

IL-6R- Receptor de IL-6  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida  
KC – Quimiocina derivada de queratinócitos  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MALDI-ToF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*  
MAPKs - Proteínas quinase ativadas por mitógenos  
MBIC – Concentração inibitória de biofilme mínima  
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade  
MIP-2 – Proteína inflamatória de macrófagos 2  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium brometo  
NF-κB – Fator nuclear kappa B  
NK – Células *natural killer*  
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PCR – Proteína C reativa  
PKC – Proteína quinase C  
rIFN-γ – Recombinante interferon gama  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
RT-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa  
SGLT 2 – Co-transportador de sódio-glicose 2  
TACE – Enzima conversora de TNF-α  
TGF-β – Fator de transformação de crescimento beta  
Th2 – Linfócito T *helper 2*  
TLR – Receptor do tipo *Toll-like*  
TNF – Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>24</b>
2.1 DIABETES MELLITUS.....	24
2.2 SISTEMA IMUNE.....	27
<b>2.2.1 Sistema Imune Inato</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.2 Sistema Imune Adaptativo</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.3 Sistema Imune e o Diabetes Mellitus</b> .....	<b>30</b>
2.3 MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE.....	32
<b>2.3.1 Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP-1)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3.2 Interleucina (IL)-1<math>\alpha</math></b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.3 Interleucina (IL)-6</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.4 Fator de Necrose Tumoral (TNF)-<math>\alpha</math></b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.5 Interleucina (IL)-12</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3.6 Interleucina (IL)-10</b> .....	<b>38</b>
<b>2.3.7 Óxido Nítrico (NO)</b> .....	<b>39</b>
2.4 PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES.....	41
<b>2.4.1 Peptídeo LL-37</b> .....	<b>43</b>
<b>2.4.2 Peptídeos IDRs</b> .....	<b>44</b>
2.4.2.1 Peptídeo IDR-1018.....	45
2.4.2.2 Peptídeo IDR-1002.....	46
2.4.2.3 Peptídeo DJK-6.....	47
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	50
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS (LL-37, DJK-6, IDR-1018 E IDR-1002).....	51
<b>4.2.1 Purificação e quantificação dos peptídeos (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 e DJK-6)</b> .....	<b>51</b>
4.3 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS .....	52
<b>4.3.1 Cultura de Células RAW 264.7 e Grupos Experimentais</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.2 Avaliação da Viabilidade Celular</b> .....	<b>55</b>
<b>4.3.3 Avaliação da Atividade Imunomoduladora dos Peptídeos</b> ...55	
4.3.3.1 Dosagem de quimiocina e citocinas por <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> (ELISA).....	56
4.3.3.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	56
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>



5.1 FASE 1 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS OU NÃO POR LPS E/OU rIFN- $\gamma$ , EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE D-GLICOSE.....	58
<b>5.1.1 Viabilidade celular.....</b>	<b>58</b>
<b>5.1.2 Produção da quimiocina MCP-1.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.3 Produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1<math>\alpha</math>, IL-6 e TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.4 Produção das citocinas pró-inflamatória com perfil M1 (IL-12) e anti-inflamatória com perfil M2 (IL-10).....</b>	<b>63</b>
<b>5.1.5 Produção de óxido nítrico (NO).....</b>	<b>65</b>
5.2 FASE 2 – SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS CANDIDATOS (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 E DJK-6).....	69
<b>5.2.1 Peptídeo LL-37.....</b>	<b>69</b>
5.2.1.1 Viabilidade celular.....	69
5.2.1.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6.....	73
5.2.1.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .....	76
5.2.1.4 Produção de óxido nítrico (NO).....	79
<b>5.2.2 Peptídeo IDR-1018.....</b>	<b>82</b>
5.2.2.1 Viabilidade celular.....	82
5.2.2.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6.....	85
5.2.2.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .....	88
5.2.2.4 Produção de óxido nítrico (NO).....	91
<b>5.2.3 Peptídeo IDR-1002.....</b>	<b>93</b>
5.2.3.1 Viabilidade celular.....	93
5.2.3.2 Produção de óxido nítrico (NO).....	96
<b>5.2.4 Peptídeo DJK-6.....</b>	<b>100</b>
5.2.4.1 Viabilidade celular.....	100
5.2.4.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6.....	104
5.2.4.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .....	107
5.2.4.4 Produção de óxido nítrico (NO).....	110
5.3 FASE 3 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS CITOCINAS PRODUZIDAS NA PRESENÇA DOS PEPTÍDEOS LL-37 E IDR-1018.....	115
<b>5.3.1 Peptídeos LL-37 e IDR-1018.....</b>	<b>115</b>
5.3.1.1 Viabilidade celular.....	115
5.3.1.1.1 Viabilidade celular em 6 horas.....	115
5.3.1.1.2 Viabilidade celular em 24 horas.....	117
5.3.1.1.3 Viabilidade celular em 72 horas.....	119
5.3.1.2 Produção da quimiocina MCP-1.....	121
5.3.1.3 Produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$ .....	123
5.3.1.4 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6.....	126
5.3.1.5 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .....	128
5.3.1.6 Produção da citocina pró-inflamatória com perfil M1 (IL-12).....	131

5.3.1.7 Produção da citocina anti-inflamatória com perfil M2 (IL-10).....	133
5.3.1.8 Produção de óxido nítrico (NO).....	135
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>139</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>147</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>148</b>
<b>9 ANEXO A – ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES.....</b>	<b>162</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) consiste em uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção, de resistência periférica dos tecidos à mesma, ou até mesmo de ambos. A desordem metabólica causada pelo DM pode acarretar no comprometimento do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Esta doença apresenta uma resposta secretora de insulina deficiente e conseqüentemente, pode ocorrer o uso inadequado de carboidratos para a obtenção de glicose, gerando assim, uma hiperglicemia sistêmica e crônica (1-3).

Os quadros de hiperglicemia crônica podem levar à lesão de células e tecidos, devido ao desequilíbrio gerado no sistema imune, resultando em cegueira, aterosclerose, doença renal e lesões periapicais. Além disso, devido à má circulação sanguínea, tecidos lesionados podem culminar em processos de lenta recuperação (4). Vários sintomas podem estar relacionados à patologia, sendo as principais manifestações: poliúria, polidipsia, polifagia, perda involuntária de peso, fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, além de infecções de repetição (5).

Neste contexto, sabe-se que a hiperglicemia crônica pode causar uma alteração no sistema imunológico. A alteração ocorre através da inibição do sistema complemento, diminuição da opsonização e da atividade bactericida e quimiotática de leucócitos, além da diminuição da atividade das células polimorfonucleares. Tal diminuição pode acarretar em menor resposta das células ao estímulo provocado por citocinas (6). Toda essa alteração do sistema imune, em associação à infecções, por exemplo na presença de lipopolissacarídeos (LPS) presente na parede de bactérias Gram-negativas, provoca uma exacerbação de citocinas pró-inflamatórias, tanto relacionado a quantidade de citocina produzida, quanto ao tempo de atuação, aumentando assim, o dano tecidual.

Nesta condição, inúmeros peptídeos já foram descritos com o potencial de modular o sistema imune (7, 8). Sabe-se que a LL-37, derivada de catelecidina humana, a proteína hCAP-18 e os peptídeos sintéticos IDR-1018, IDR-1002 e DJK-6, derivados do peptídeo batenecina, são pertencentes à família dos peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) e exibem grande capacidade imunomoduladora, sem comprometer as células imunes que são necessárias para a resolução de infecções

e retorno da homeostase. Quanto à capacidade imunomoduladora, podem ser capazes de promover a quimiotaxia, estimular a produção de quimiocinas e citocinas, regular a função e a diferenciação de células imunes, além de induzir a angiogênese e a cicatrização de feridas (9). Entretanto, ainda não foi descrita na literatura a capacidade desses peptídeos de modular a ação das células imunes em condições de elevadas concentrações de glicose, associada à estímulos infecciosos e inflamatórios. Desta forma, este trabalho visa verificar o potencial biotecnológico de peptídeos sintéticos imunomoduladores frente à um modelo de hiperglicemia *in vitro*, avaliando o efeito frente à aspectos imunológicos, como a produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DIABETES MELLITUS

O DM consiste em uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina, de resistência periférica dos tecidos à mesma, ou até mesmo de ambos. A desordem metabólica causada pelo DM pode acarretar no comprometimento do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Esta doença apresenta uma resposta secretora de insulina deficiente e conseqüentemente, há o uso inadequado de carboidratos para a obtenção de glicose, gerando assim, uma hiperglicemia sistêmica e crônica (1-3).

Apesar da classificação correta do diabetes ser importante e possuir implicações nos tratamentos que serão utilizados, a classificação não tem sido uma tarefa fácil, principalmente em se tratando de jovens adultos (2, 10). A classificação clássica proposta em 1997 pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e a mais utilizada até hoje, divide o diabetes mellitus em tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e o diabetes mellitus gestacional (DMG) (2, 3).

O DM1 pode ser resultado da destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, levando a uma perda de secreção de insulina e assim, uma subsequente hiperglicemia e ocorre geralmente em crianças e/ou jovens adultos. Esse tipo corresponde a cerca de 5 a 10% da população diabética (11). O DM2 pode ser resultado de uma resistência periférica dos tecidos à insulina, conhecido também como o tipo não dependente de insulina e ocorre geralmente em indivíduos adultos. Esse tipo corresponde a cerca de 90 a 95% dos indivíduos diabéticos (3, 12). Já o DMG pode ser definido como tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez, podendo persistir ou não após o parto (5).

Os testes laboratoriais mais importantes para a identificação e diagnóstico do DM são: o teste de glicemia em jejum, o teste de hemoglobina glicada (HbA1c) e o teste oral de tolerância à glicose, onde cada teste precisa ser repetido em um dia diferente para a confirmação do diagnóstico. O teste de glicemia em jejum verifica os níveis plasmáticos de glicose em jejum de pelo menos 8h. O teste de HbA1c determina a glicemia média dos últimos 2 a 3 meses, tempo médio de vida das

hemácias. Além disso, o teste oral de tolerância à glicose pode determinar o nível glicêmico antes e após 2h da ingestão de 75 g de glicose diluída em água, desta forma é possível verificar como o organismo processa a glicose (13). Os valores de referência para a determinação do diagnóstico estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de referência dos diferentes testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico de Diabetes Mellitus, de acordo com a Associação Americana de Diabetes

	<b>Glicemia em jejum</b>	<b>Teste aleatório de glicose plasmática</b>	<b>HbA1c</b>	<b>Teste oral de tolerância à glicose</b>
<b>Normal</b>	< 100 mg/dL	-	<5,7%	< 140 mg/dL
<b>Pré-diabetes</b>	100 a 125 mg/dL	-	5,7% a 6,4%	140 a 199 mg/dL
<b>Diabetes</b>	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL	≥ 6,5%	≥ 200 mg/dL

O DM consiste em uma das mais prevalentes doenças crônicas não comunicáveis e é um importante problema de saúde pública, reconhecido como importante causa de incapacidade e morte prematura (14). Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, mais de 422 milhões de adultos com mais de 18 anos viviam com diabetes, correspondendo a 8,5% da população geral. Enquanto que em 1980, esse número era de 108 milhões ou 4,7% da população (15). Já em 2016, de acordo com o perfil de diabetes por país traçado pela OMS, o Brasil possui uma prevalência de 8,1%, o que representa mais de 16 milhões de pessoas vivendo com o diabetes (16).

No ano de 2006, estimava-se que mais de 356 milhões de pessoas no mundo tinham DM2 e que, de 15 a 25% dessa população provavelmente desenvolveria úlceras devido à condição de pé diabético durante a sua vida (17). Além disso, devido ao rápido aumento na prevalência do DM ao redor do mundo, complicações oculares, como a retinopatia diabética e a catarata, têm se tornado a maior causa de cegueira no mundo (18).

As terapias existentes e disponíveis atualmente para o tratamento do DM2 são indicadas quando a dieta e o aumento de atividades físicas não são capazes de controlar a glicemia em níveis normais. Desta forma, existem os medicamentos capazes de aumentar a sensibilidade à ação da insulina endógena, como por exemplo as biguanidas; os medicamentos que diminuem a absorção intestinal de

glicose, como a meglitinidas; ou ainda os medicamentos que aumentam a secreção de insulina, como as sulfanilureias. A indicação do uso da insulina para o tratamento de DM2 deve ser apenas para diabéticos com hiperglicemia severa com cetonemia ou cetonúria, ou que não respondam ao tratamento com dieta, exercício e/ou hipoglicemiantes orais (19-22).

Como o DM possui alta prevalência mundial, desta forma há também muitos estudos acerca da patogênese, fatores de risco associados e do desenvolvimento de novas terapias (23, 24). Atualmente, relacionado ao DM1, os estudos que vem sendo realizados envolve o uso de terapia gênica a fim de tornar o pâncreas um órgão funcional novamente por meio de transplante de organoides, ou seja células intactas produtoras de insulina produzidas *in vitro* (25, 26). Já para o DM2, foram desenvolvidos dois novos medicamentos orais para o controle da glicemia, a fim de retardar as complicações causadas pela doença. O primeiro é um inibidor de Dipeptil peptidase 4 (DPP-4), afeta tanto as células  $\alpha$  quanto  $\beta$  pancreáticas, diminuindo a produção do glucagon e aumentando a secreção de insulina (27). O segundo é um inibidor de co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2) que reduz as concentrações de HbA1c, aumentando a excreção urinária de glicose (28).

Até o momento, em termos de modulação do sistema imune, apenas o uso de anticorpos anti-citocinas pró-inflamatórias, a fim de retornar os níveis a normalidade, foram descritos. Levando em conta que o DM altera vários aspectos do sistema imune, que serão descritos a seguir, novos tratamentos que tenham como alvo uma possível modulação desse sistema podem ser desenvolvidos para o uso em associação com os tratamentos já existentes. Todavia, ainda não se sabe se essa possível modulação do sistema imune seria de fato benéfica em uma infecção *in vivo*, fato que motiva a realização de novos estudos complementares.

## 2.2 SISTEMA IMUNE

O sistema imune possui a função fisiológica de defender o organismo contra microrganismos infecciosos ou substâncias estranhas não infecciosas. É constituído por uma complexa rede de células, os leucócitos e moléculas ou mediadores de resposta, como citocinas pró- e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e anticorpos. Esses mediadores de resposta e anticorpos circulam por todo o organismo e possuem a capacidade de reconhecer especificamente determinadas estruturas moleculares, os chamados antígenos. Ao se reconhecer um antígeno, uma resposta efetora é desenvolvida provocando a destruição ou inativação da molécula ou organismo estranho (29-31).

Representa um sistema eficaz de defesa contra o desenvolvimento de infecções provocadas por microrganismos ou contra a transformação maligna de células para o desenvolvimento de tumores. A capacidade de defesa do sistema imune depende da ativação de células efetoras por meio do reconhecimento de antígenos e da produção de anticorpos para a neutralização desses antígenos, ativação do sistema complemento e eliminação dos microrganismos dependentes de leucócitos (30, 31). De forma didática, o sistema imune pode ser dividido em duas categorias sendo uma o sistema imune inato e a outra o sistema imune adaptativo, como representado na tabela 2.



Tabela 2 – Células e moléculas solúveis dos sistemas imunes inato e adaptativo. Adaptado de Cruvinel et al., 2010

<b>Componente</b>	<b>Sistema Imune Inato</b>	<b>Sistema Imune Adaptativo</b>
<b>Celular</b>	Fagócitos	
	- macrófagos	
	- neutrófilos	Linfócitos T e B
	- células dendríticas (DCs)	Células dendríticas
		Células NK
	Células <i>natural killer</i> (NK)	Células apresentadoras de antígenos (APCs)
	Mastócitos	
	Basófilos	
<b>Solúvel</b>	Eosinófilos	
	Proteínas do sistema complemento	Anticorpos
	Proteínas de fase aguda	Citocinas
	Citocinas	Quimiocinas
	Quimiocinas	

### 2.2.1 Sistema Imune Inato

A imunidade inata pode ser a responsável pela primeira linha de defesa contra agentes estranhos. Possui uma resposta rápida a um grande número de estímulos, porém com capacidade limitada de distinguir o agente invasor, agindo de forma semelhante contra a maioria dos antígenos. Todavia, essa ação ocorre de forma imediata e não apresenta memória imunológica. Seus principais componentes são as barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais, as células e citocinas (30-32).

As células responsáveis por esse processo são as células fagocitárias, como os monócitos, macrófagos, DCs, células NK e neutrófilos. Desta forma, os principais mecanismos do sistema imune inato englobam a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda e a produção citocinas e quimiocinas (30, 33).

Sendo assim, a fagocitose consiste no primeiro evento em que ocorre a tentativa de eliminação do patógeno e acontece a partir da ligação do antígeno à receptores de membrana dos fagócitos, promovendo assim a internalização do patógeno em vesículas denominadas fagossomos, onde ocorre a sua digestão e eliminação (33). Caso a fagocitose falhe e ocorra um possível dano tecidual, a primeira defesa do organismo é a resposta inflamatória aguda, processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e solúveis. Os sinais clínicos característicos da inflamação aguda são, o rubor, calor, edema, dor e perda de função. A finalidade do processo inflamatório é erradicar o estímulo indutor e iniciar a recuperação tecidual local. As substâncias solúveis que são liberadas possuem curto tempo de meia vida, a fim de serem degradadas após exercerem sua ação (30). As células residentes no tecido iniciam a resposta inflamatória aguda imediatamente após o dano, liberando citocinas inflamatórias como a interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e quimiocinas e ocorre a diapedese dos leucócitos de acordo com o gradiente de citocinas e quimiocinas no local da inflamação. Uma vez no tecido, o patógeno é fagocitado e se inicia o reparo da lesão (34).

Já a inflamação crônica pode ser ocasionada pela persistência do estímulo indutor, onde o processo inflamatório se mantém provocando destruição e reparo tecidual de forma concomitante e contínua, sendo caracterizada pelo infiltrado de células mononucleares, sinais de angiogênese e fibrose (1). Desta forma, a resposta imune inata contribui fundamentalmente para a ativação do sistema imune adaptativo, uma vez que os macrófagos e DCs ativadas são capazes de ativar os linfócitos T e iniciar a resposta imune adaptativa (31).

### **2.2.2 Sistema Imune Adaptativo**

A resposta imune adaptativa possui mecanismos de defesa mais especializados e ocorre em função de um estímulo reconhecido como não próprio que atravessa as barreiras de entrada. O sistema age de forma lenta em um contato inicial com um antígeno, contudo, desenvolve a chamada memória imunológica e em um contato subsequente responde de forma rápida e eficaz (35). As principais

características desse tipo de resposta são a especificidade e a diversidade de reconhecimento de antígenos, memória imunológica, resposta especializada, autolimitação e a tolerância à componentes do próprio organismo (31, 33).

Existem dois tipos de resposta imune adaptativa, a humoral e a celular, ambas com a função de eliminar os diversos tipos de microrganismos. A imunidade humoral é mediada pelas moléculas presentes no sangue e nas secreções de mucosas, os chamados anticorpos. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B ativados e são responsáveis pelo reconhecimento, neutralização e eliminação de antígenos extracelulares e suas toxinas (30, 35).

Já as principais células envolvidas na resposta celular são os linfócitos T e B, as DCs, as células NK e as APCs, as quais promovem a eliminação dos chamados reservatórios de infecção. Os reservatórios de infecções são as células do hospedeiro ou fagócitos infectados por microrganismos intracelulares que são capazes de se reproduzir nesse ambiente a fim de se protegerem contra anticorpos circulantes (30, 35). Desta forma, o objetivo da resposta imune adaptativa consiste em ativar um ou mais mecanismos de defesa contra uma variedade de agentes agressores.

### **2.2.3 Sistema Imune e o Diabetes Mellitus**

Como já mencionado anteriormente, a hiperglicemia presente no DM, pode afetar o sistema imune em vários aspectos, aumentando assim a susceptibilidade de infecções virais, bacterianas e fungicas. A alteração do sistema imune promove deficiências, principalmente no processo da resposta imune inata, onde as principais células, tais como os monócitos, macrófagos e neutrófilos, são atingidas. Além disso, provoca efeitos diretos na microcirculação, nas proteínas do sistema complemento e nas citocinas (36).

Os estados de hiperglicemia, tanto aguda como crônica, podem causar disfunção na adesividade, migração, quimiotaxia, fagocitose e na capacidade bactericida e de apresentação de antígenos, principalmente de neutrófilos (37, 38). Além disso, a hiperglicemia pode alterar vários eventos na resposta inflamatória à infecções ou dano tecidual, como por exemplo a redução da vasodilatação do

endotélio vascular por meio da diminuição da produção de óxido nítrico (NO), indução de estresse oxidativo e disfunção endotelial mediada pelo aumento de radicais livres (39, 40).

A disfunção causada pela hiperglicemia pode estar relacionada à adesividade dos neutrófilos, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1. Tais moléculas são expressas no endotélio vascular em resposta à exposição à lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, presente na aterosclerose e à grande produção de IL-1. Esse aumento de ICAM-1 não permite a transmigração dos leucócitos para a camada íntima arterial e, conseqüentemente, dificulta a resolução da inflamação (41, 42). Uma vez a adesividade aumentada, as células não são capazes de migrar para o sítio de infecção e sendo assim, não são capazes de liberar citocinas que promovem a quimiotaxia de outros leucócitos, nem de realizar a fagocitose propriamente dita. Se a fagocitose não é realizada, os macrófagos e neutrófilos ativados não são capazes de apresentar os antígenos aos linfócitos T e B, para que assim as células B sejam capazes de liberar anticorpos (30, 36).

A ativação do sistema complemento é parte essencial da resposta imune inata. Esse sistema consiste em proteínas, tanto de superfície quanto circulantes, cuja principal função é promover a opsonização e a fagocitose de microrganismos por macrófagos e neutrófilos. Pode ainda causar a lise direta do patógeno, além de liberar mediadores que irão promover a migração e quimiotaxia de leucócitos. Desta forma, a elevação da concentração de glicose inibe a opsonização devido a ligação direta da glicose ao sítio bioquímico ativo do componente C3 e bloqueia a fixação nas superfícies microbianas (43).

Já as citocinas, fazem parte da sinalização celular e modulam o equilíbrio entre as respostas da imunidade celular e humoral. Sabe-se que no DM, a hiperglicemia e o desequilíbrio na tolerância à glicose estão associados com o aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína C reativa (PCR), responsáveis por causar inflamação. Estudos sugerem que a alta na produção de citocinas pró-inflamatórias está relacionado com o aumento da transcrição do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B, aumentando assim a expressão dos genes dessas citocinas (36). Assim, a ação das citocinas estudadas nesse trabalho e o efeito da hiperglicemia sobre elas serão detalhados no próximo tópico.

## 2.3 MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE

Citocinas são proteínas, denominadas mediadores solúveis de curta duração, secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida, tais como por exemplo, macrófagos e linfócitos ativados, que modulam a função das células do sistema imune. São produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos e podem ser do tipo pró-inflamatória ou anti-inflamatória (1, 30). As citocinas geradas por fagócitos mononucleares eram originalmente chamadas de monocinas, enquanto as produzidas por linfócitos ativados, linfocinas. Com o desenvolvimento de anticorpos anticitocina e sondas moleculares esclareceu-se que a mesma proteína pode ser sintetizada por diferentes tipos celulares. Deste modo, deu-se origem ao termo genérico citocinas para essa classe de mediadores (30).

Dentro da classe das citocinas, há ainda as quimiocinas e ILs que constituem duas grandes famílias. As quimiocinas, contração de citocinas quimiotáticas, são produzidas por leucócitos e atuam como próprios ativadores e quimioatratores, regulando sua migração do sangue para os tecidos que contenham foco de inflamação. Já as citocinas, são produzidas por células hematopoiéticas, atuando primariamente sobre os leucócitos (1, 30).

Outro mediador inflamatório muito importante dentro do contexto de resposta imune é o NO. O NO atua em uma variedade de processos biológicos complexos, como por exemplo a homeostase da pressão sanguínea, agregação plaquetária e transmissão de sinais pelo sistema nervoso. Além da atuação sobre esses processos biológicos, também possui função sobre o sistema imune, desempenhando papel na atividade de macrófagos e defesas contra patógenos (44, 45). Desta forma, os mediadores da resposta imune estão intimamente relacionados à resposta que a exposição à hiperglicemia crônica e à microrganismos geram, as quais comumente se apresentam no DM, e desta forma, serão detalhados os mediadores da resposta imune que foram analisados neste projeto.

### 2.3.1 Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP-1)

O marco da inflamação consiste na ação do neutrófilos e a subsequente infiltração de monócitos no local envolvido. Essa infiltração pode ser mediada por várias quimiocinas, como a proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2, a quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e a MCP-1 (46). As quimiocinas podem ser classificadas em quatro subfamílias (CXC, CC, CX<sub>3</sub>C e C) com base no número e local dos resíduos de cisteína no N-terminal da molécula. Desta forma, a proteína quimiotática de monócitos pode ser denominada tanto como MCP-1, quanto CCL2, por pertencer a subfamília CC (47).

A quimiocina MCP-1 tem sido considerada um potente e o principal fator quimiotático para monócitos, capaz de recrutar monócitos para locais com inflamação ativa (47). Após a infiltração, os neutrófilos sofrem apoptose, enquanto os monócitos se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos diferenciados, então, fagocitam os neutrófilos que sofreram apoptose, contribuindo para a resolução da inflamação (46).

Quando relacionado ao DM, a presença de altas concentrações de MCP-1 pode contribuir para a resistência à insulina presente em pacientes diabéticos tipo 2 por estar fortemente correlacionada à obesidade (47, 48). Outro ponto relevante, é a sua atuação na patogênese da insuficiência renal causada pelo DM, onde os níveis séricos de MCP-1 aumentam em pacientes com disfunção renal e são ainda maiores em pacientes que realizam hemodiálise, do que quando comparados à indivíduos saudáveis (49). Além disso, sua presença também pode estar relacionada ao aspecto inflamatório da aterogênese, onde células que sustentam as placas de ateroma expressam MCP-1 e a atividade da ligação MCP-1/CCR2 (receptor de MCP-1) é aumentada nas lesões ateroscleróticas, a fim de acelerar a resolução da inflamação causada devido às lesões por placas de ateroma (50).

### 2.3.2 Interleucina (IL)-1 $\alpha$

Citocinas da família IL-1 são citocinas altamente inflamatórias e a linha entre o benefício clínico e a toxicidade em humanos é extremamente próxima (51). A produção de IL-1 $\alpha$  está fortemente relacionada a respostas inflamatórias do tipo estéreis que são iniciadas por padrões moleculares associados à danos (DAMPs), ou seja, moléculas endógenas liberadas de células mortas ou células modificadas durante um processo de doença (52). Desta forma, essa citocina atua em eventos inflamatórios que envolvem necrose celular e dano tecidual (53). A IL-1 $\alpha$  pertence a um grupo único de citocinas, chamado citocinas de função dupla. Ao contrário da maioria das citocinas que são rapidamente reguladas por meio de estímulos, as citocinas de função dupla estão normalmente presentes nas células na condição de homeostase. Além disso, possuem características intracelulares, geralmente atribuídas à proteínas nucleares, como fatores de transcrição, por exemplo. Geralmente são encontradas no citosol ou podem se translocar para o núcleo (53). A IL-1 $\alpha$  é denominada citocina de função dupla pois possui duas formas biologicamente ativas, a pró-IL-1 $\alpha$  que é o precursor ativo e a IL-1 $\alpha$  que é forma madura, originada somente após a remoção de aminoácidos do N-terminal da pró-IL-1 $\alpha$  (54).

No que se referente ao DM, as propriedades pró-inflamatórias da IL-1 $\alpha$  podem ser relevantes para o desenvolvimento da doença vascular aterosclerótica devido ao grande dano tecidual, muito presente em pacientes diabéticos (54). Além disso, a presença de IL-1 prejudica a secreção de insulina e induz a apoptose das células  $\beta$  pancreáticas, onde evidências sugerem que não somente a função diminuída das células  $\beta$  pancreáticas, mas também a diminuição progressiva da massa desse tipo celular devido ao aumento da taxa de apoptose, contribuem para a manifestação do DM2 (54, 55). Outro fator de risco associado aos pacientes diabéticos do tipo 2 consiste na presença do tecido adiposo, o qual é considerado um órgão endócrino por secretar várias citocinas pró-inflamatórias, além da IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (48).

### 2.3.3 Interleucina (IL)-6

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que possui amplos efeitos biológicos. Atua tanto na imunidade inata, quanto na adquirida. Foi descrita pela primeira vez como fator estimulante de células B-2 (BSF-2), um fator solúvel secretado que era capaz de induzir a maturação final de linfócitos B para que fossem células capazes de secretar imunoglobulinas. Após processos de purificação e clonagem foi determinado que o BSF-2 era uma citocina contendo 184 resíduos de aminoácidos (26 kDa) e desta forma, o seu nome foi trocado para IL-6 (56, 57).

A IL-6 é uma citocina produzida por inúmeras células, incluindo linfócitos T e B, como também fibroblastos, monócitos, queratinócitos, células endoteliais, além de diversos tipos de tumores. Dentre os seus efeitos biológicos, a IL-6 está envolvida na resposta de fase aguda, na inflamação, em mecanismos de defesa do hospedeiro, ativação de células endoteliais e promoção da diferenciação e proliferação de linfócitos (57-59). A sua produção pode ser induzida por uma variedade de estímulos, como por exemplo, as citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$ , o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), bem como por estímulos de infecções virais e bacterianas (58). Esta citocina exerce sua ação em células alvo a partir da interação com o receptor de IL-6 (IL-6R) ligado à membrana. O complexo IL-6/IL-6R então se associa com a subunidade  $\beta$  da proteína de membrana de transdução de sinal gp130, proteína essa expressa por quase todas as células do corpo humano, promove a dimerização e subsequente ativação do sinal intracelular (56, 60).

Relativamente ao DM, segundo Morohoshi et al. (61), os níveis plasmáticos de IL-6 são significativamente elevados em pacientes diabéticos descontrolados e em pacientes diabéticos que possuem nefropatia ou aterosclerose e que após a normalização dos níveis plasmáticos de glicose, os níveis de IL-6 também diminuem. Desta forma, há uma sugestão de que a hiperglicemia presente no DM possui um efeito estimulante sobre a produção de IL-6 (61).

A IL-6 consiste em uma das principais responsáveis pelo desenvolvimento da lesão aterosclerótica, uma vez que é a citocina responsável pelo influxo das células responsáveis pela inflamação no sítio da lesão (59). A inflamação crônica devido à obesidade presente no DM2, cujo tecido adiposo é considerado um tecido endócrino, é refletida no aumento dos níveis sistêmicos de IL-6, agravando os



quadros de inflamação e contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina, além de ser considerado um fator de risco para outras complicações cardiovasculares, como infarto (62, 63).

Desta forma, por possuir um papel tão atuante nos processos relacionados à inflamação e intimamente ligada ao DM, a IL-6 foi uma das citocinas escolhidas para selecionar o peptídeo sintético com maior potencial imunomodulador utilizado neste trabalho.

### 2.3.4 Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  tem sido considerado o principal mediador pró-inflamatório da resposta de fase aguda da imunidade inata e é produzido principalmente por macrófagos ativados, embora células T estimuladas por antígenos, células NK e mastócitos também possam secretar essa citocina (30, 64, 65). O estímulo mais potente para a produção de TNF por macrófagos é a ligação de LPS e outros estímulos microbianos presentes de bactérias Gram-negativas em receptores do tipo *Toll-like* (TLR) e assim, grandes quantidades da citocina são produzidas a partir da transcrição do NF- $\kappa$ B. A presença de interferon (IFN)- $\gamma$  aumenta ainda mais essa produção quando os macrófagos são ativados por LPS (30, 66).

Logo após ser sintetizado, o TNF pode ser expresso inicialmente como uma proteína de membrana tipo II que requer clivagem proteolítica pela enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE) para assim, liberar o polipeptídeo de TNF na sua forma solúvel (67). A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento e facilitar a diapedese de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, devido ao seu efeito nas moléculas de adesão celular dos vasos, e ativar essas células para a eliminação de microrganismos. Desta forma, possui papel principal na inflamação sistêmica, induzindo a produção hepática da PCR e proteínas de fase aguda. Contudo, o TNF também contribui para reações inflamatórias locais que são prejudiciais ao hospedeiro, desenvolvendo assim doenças autoimunes (30, 64).

Um dos marcos dentro da área do imunometabolismo foi a descoberta de que os níveis de TNF- $\alpha$  são elevados no tecido adiposo de roedores obesos e diabéticos e que a neutralização dessa citocina, por meio de anticorpos monoclonais, melhora

a absorção de glicose estimulada por insulina, diminuindo assim a sensibilidade à insulina (68, 69).

A grande produção de TNF- $\alpha$  observado na nefropatia diabética pode ainda acarretar em estresse oxidativo devido à infiltração de macrófagos nos rins. Esse estresse oxidativo ocorre devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais em resposta à elevação da quantidade de TNF- $\alpha$  renal, levando assim, a um agravamento do quadro de nefropatia (65).

Em cicatrização de feridas, em um estudo com modelos diabéticos, foi observado que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 estavam aumentados, enquanto que os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, estavam diminuídos em tecidos contendo feridas diabéticas, quando comparado com cicatrização de feridas não diabéticas. Como consequência, há expressão duradoura de MCP-1, prolongando a infiltração de leucócitos e assim, prejudicando a cicatrização dos camundongos diabéticos (70).

Desta forma, devido ao fato do TNF- $\alpha$  ser a citocina mais importante e a mais estudada e por conta dos seus efeitos quando relacionado ao diabetes, ela foi a segunda citocina escolhida como parâmetro para a seleção do peptídeo sintético com maior potencial imunomodulador dentre os testados nesse estudo.

### **2.3.5 Interleucina (IL)-12**

A IL-12 foi a primeira citocina heterodimérica identificada sendo o principal mediador pró-inflamatório da resposta imune inata inicial contra microrganismos intracelulares e indutor da resposta imune adquirida. Como requer a expressão de 2 diferentes genes (p40 e p35) para a sua produção biológica ativa, o controle genético da sua produção é particularmente complexo. Desta forma, muitas células sintetizam a subunidade p35, contudo apenas APCs, como monócitos/macrófagos e DCs são capazes de sintetizar a subunidade p40, ou seja, a citocina biologicamente ativa (30, 71, 72).

A habilidade das células fagocíticas de produzirem IL-12 pode ser regulada por várias citocinas, como por exemplo o IFN- $\gamma$  e o fator estimulador de colônias de

macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que elevam a produção de IL-12. A presença do IFN- $\gamma$  não induz diretamente o acúmulo do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) p40, mas a produção é aumentada em resposta ao estímulo associado do LPS. Já as citocinas IL-10, IL-4 e fator de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$  possuem efeito inibitório sobre a IL-12, onde essas citocinas inibem tanto a secreção de IL-12, quanto o acúmulo de mRNA de p40 e p35 nas células fagocitárias estimuladas (72).

Quando relacionado ao diabetes, um estudo de Wen et al. (73), demonstrou que altas concentrações de glicose (25 mM) *in vivo* induziam o aumento da secreção de IL-12 de macrófagos, além de ativar a expressão de mRNA de várias outras citocinas pró-inflamatórias em culturas primárias de macrófagos peritoneais de roedores. Todavia, também foi demonstrado que o bloqueio da translocação do NF- $\kappa$ B suprime completamente a expressão de mRNA de IL-12 induzida pela alta concentração de glicose, sugerindo fortemente que há o envolvimento do NF- $\kappa$ B na ação da glicose (73).

### 2.3.6 Interleucina (IL)-10

A IL-10 é a maior citocina anti-inflamatória e imunossupressora. O papel principal da IL-10 é limitar a extensão da ativação de ambos os sistemas, inato e adaptativo, para a manutenção do estado de homeostase, ou seja, seu papel é inibir as funções de macrófagos ativados para finalizar respostas inflamatórias e retornar o sistema ao seu estado de repouso à medida que a infecção microbiana é erradicada (30, 71).

A IL-10 é produzida por células T reguladoras (Th2) e macrófagos ativados do tipo M2, responsáveis pela secreção de citocinas do tipo anti-inflamatórias, cujo papel principal é atuar na reversão de respostas inflamatórias, sendo essas citocinas a IL-4, a TGF- $\beta$ , além da IL-10 (74, 75). Por ser uma citocina imunossupressora, a IL-10 modula a expressão de citocinas, mediadores solúveis e moléculas de superfície, como por exemplo o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. No que diz respeito as citocinas, a IL-10 inibe potentemente a produção

de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF e até mesmo a sua própria produção depois do efeito imunossupressor ser atingido (76).

Contudo a sua principal atuação pode ser sobre a produção de IL-12, cuja a principal ação é a produção de IFN- $\gamma$ , citocina extremamente pró-inflamatória. A IL-10 age para regular negativamente essa reação, ou seja, inibe a secreção de IL-12 e consequentemente de IFN- $\gamma$ . Contudo, caso já tenha a presença de IFN- $\gamma$ , a produção e liberação de IL-10 são bloqueadas (30, 71, 77).

Como referido anteriormente, a obesidade está intimamente relacionada ao desenvolvimento da resistência à insulina e consequente desenvolvimento do DM2. Apostolopoulos et al. (74) relatam em seu artigo que em uma perda de peso radical, evidenciada após 3 meses de realizada cirurgia bariátrica, existe uma diminuição significativa do número de macrófagos, devido a perda do tecido adiposo. E que desta forma, os macrófagos remanescentes secretam citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e não mais citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6 e TNF, como relatado anteriormente, sugerindo assim, a reversão do estado inflamatório causado pela obesidade (74).

Contudo, em um estudo realizado por Torres-Castro et al. (78), foi relatado que macrófagos humanos expostos a um excesso de glicose (15 mM) *in vitro* possuem uma secreção de IL-10 reduzida sem um aumento concomitante da produção de TNF- $\alpha$ . Entretanto, a diminuição de IL-10 pode afetar negativamente a capacidade de regular eventos inflamatórios (78).

### **2.3.7 Óxido Nítrico (NO)**

O NO foi inicialmente identificado como sendo apenas um componente vasodilatador, contudo é uma molécula mensageira fundamental em um amplo espectro de ações biológicas (44). O NO pode ser produzido a partir da catalisação da reação que converte o substrato O<sub>2</sub> e a L-arginina nos produtos NO e L-citrulina. Essa catalisação é realizada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), incluindo a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (79, 80).

A nNOS pode ser expressa principalmente no tecido neuronal, a iNOS sofre um aumento de expressão nos macrófagos ativados e a eNOS é abundante no endotélio, regulando o tônus vascular (80). A produção de NO a partir do iNOS é a mais abundante e necessária para a eliminação de certos patógenos por macrófagos, mas também tem sido relacionada à doenças inflamatórias (79).

Sua produção pode também ser regulada pela presença de insulina, que além da sua ação biológica de facilitar a entrada de glicose nas células, também possui a função de modular a biodisponibilidade de NO. Ou seja, a insulina também é capaz de aumentar a produção de NO, promovendo assim, a vasodilatação do endotélio (81). Entretanto, os efeitos do NO nas funções celulares possui um aspecto relevante, complexo e ambíguo. O NO pode ser tanto benéfico, protegendo as células de injúrias tóxicas, agindo como antioxidante, quanto potencialmente citotóxico dependendo da concentração. Contudo, não há um consenso na literatura sobre tais limites de concentração (45, 81).

No que diz respeito à indivíduos com resistência à insulina e DM2, a hiperglicemia está associada a um aumento do estresse oxidativo que leva a um aumento na formação de ROS, como o superóxido. Por sua vez, os superóxidos formados reagem com o eNOS que levam à sua degradação. E como consequência dessa degradação, ocorre a disfunção endotelial dos vasos e conseqüentemente a formação de lesões ateroscleróticas, uma das principais causas de morbidade em pacientes diabéticos (82).

Já levando em conta a patofisiologia da nefropatia diabética, sabe-se que pode ser observada a deficiência funcional de eNOS nesses pacientes. Sendo assim, em um estudo com camundongos eNOS *knockout* (eNOS<sup>-/-</sup>), os animais apresentaram dois mecanismos patogênicos chaves implicados na nefropatia diabética em humanos, hipertensão e disfunção endotelial, levando à eventos cardiovasculares e também à aterosclerose (83).

Desta forma, como a hiperglicemia pode causar diversas alterações no sistema imune, principalmente uma exacerbação de citocinas pró-inflamatórias, peptídeos imunomoduladores vêm sendo estudados como moléculas potenciais para o restabelecimento da homeostase do hospedeiro. Os peptídeos imunomoduladores com tais potenciais, avaliados neste estudo, serão detalhados a seguir

## 2.4 PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES

Atualmente, existem muitos estudos em desenvolvimento a fim de desvendar o potencial de novos peptídeos, tanto naturais quanto sintéticos, para o auxílio em terapias já existentes, como por exemplo os anti-inflamatórios, e outras contudo já não tão efetivas, devido a resistência adquirida, como por exemplo antibióticos contra os diversos tipos de infecções (84, 85). Esses possíveis novos peptídeos poderiam ser utilizados como coadjuvantes de forma mais eficaz, rápida ou até mesmo, com menor custo. Atualmente, há diversos peptídeos com ação antimicrobiana, com estrutura e modo de ação amplamente descritos, contudo, ultimamente o foco de muitos pesquisadores tem sido o desenvolvimento de peptídeos, que além de antimicrobianos, apresentem outras funções como por exemplo, imunomodulação. Estes peptídeos são denominados de peptídeos promíscuos, onde vários alvos estão associados a uma única estrutura de peptídeo (86). Sendo assim, algumas das classes desses peptídeos serão revisadas a seguir.

Os peptídeos capazes de penetrar no meio intracelular (CPPs) são pequenos fragmentos de aminoácidos (4 – 30 sequências de aminoácidos) que são amplamente utilizados para a entrada de macromoléculas. Tais macromoléculas podem ser: proteínas, outros peptídeos, fragmentos de DNA e RNA, cuja entrada no ambiente celular promove um controle do seu comportamento, podendo ser utilizado como alternativa terapêutica. Os CPPs têm sido utilizados no tratamento de doenças imunológicas através da modulação deste sistema. A entrada pode ser facilitada por meio de lipossomos, eletroporação ou transfecção viral, mas também pode acontecer por endocitose (87).

Os diversos e amplamente estudados, peptídeos antimicrobianos (AMPs) possuem várias características em comum, como por exemplo, seu pequeno tamanho (12 – 50 aminoácidos), carga positiva e estrutura anfipática. São divididos em diversas categorias de acordo com a composição dos aminoácidos, tamanho e estrutura conformacional, como por exemplo, peptídeos com estrutura  $\alpha$ -hélice, peptídeos com estruturas de folha- $\beta$  estabilizadas por pontes dissulfeto e ainda peptídeos com estruturas estendidas ou em *loop* (7, 88).

Já os peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro (CHDPs) ou simplesmente HDPs são conservados, pequenos, de carga positiva e componentes

inatos de defesa do hospedeiro e possuem duas principais classes de peptídeos: as catelecidinas e as defensinas (89). Os HDPs são descritos como capazes de eliminar uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias multirresistentes, fungos, protozoários e até mesmo, vírus. São capazes de agir tanto por meio de ataque à membrana, quanto através de alvos intracelulares.

Além da ação antimicrobiana, esses peptídeos ainda apresentam ação imunomoduladora, podendo direta ou indiretamente induzir a produção de citocinas nas células do sistema imune ou reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta a moléculas microbianas, além de também ser capaz de recrutar células para o sítio da provável infecção, modular a expressão de quimiocinas e ROS e NO, estimular a angiogênese, contribuir para o processo de cicatrização de feridas, e ainda ativar e promover a diferenciação de leucócitos e macrófagos (90, 91). Em adição, à ação imunomoduladora e ação cicatrizante, os HDPs ainda demonstram um efeito anti-inflamatório via inibição da geração de citocinas induzidas por LPS, em macrófagos e monócitos (92).

As catelecidinas, uma das classes de HDPs, são assim chamadas devido à sua região N-terminal altamente conservada, conhecida como domínio catelina e receberam esse nome devido a habilidade de inibir a protease catepsina-L. Os peptídeos gerados por genes de catelecidinas possuem pouca similaridade entre si e pertencem ao mesmo grupo apenas por similaridade da proteína precursora que predomina o domínio catelina (88). Dentre os 30 membros da família das catelecidinas que foram descritos de origem mamífera, existe apenas um humano, a proteína hCAP-18, que é a precursora do peptídeo LL-37 (93).

Semelhante às catelecidinas, as defensinas são peptídeos multifuncionais catiônicos que contêm cisteína, ativadas por processo proteolítico a partir de um precursor inativo. Possuem os tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$ , sendo esta última circular, sem N- ou C-terminal (88, 94). As defensinas possuem efeitos anti bacterianos contra Gram-positivas e Gram-negativas, assim como efeitos contra anti-virais e anti-fúngicos e desenvolvem um papel na resposta imune do hospedeiro em resposta à infecções. As mais importantes defensinas humanas são: os peptídeos de neutrófilos humanos (HNPs) e as beta defensinas humanas (HBDs) (94, 95).

Desta forma, devido ao grande potencial imunomodulador, nos próximos tópicos, será dado destaque aos peptídeos HDPs, pois são os peptídeos de interesse para o desenvolvimento deste estudo.

### 2.4.1 Peptídeo LL-37

O peptídeo LL-37 é uma catelecidina humana da família dos HDPs, gerado a partir da clivagem extracelular, pela proteinase 3, da proteína obtida de grânulos de neutrófilos, a hCAP-18. Essa proteína também está presente em monócitos, linfócitos, queratinócitos e células epiteliais, durante desordens inflamatórias (96). Possui o nome LL-37, pois é um peptídeo que possui 37 resíduos de aminoácidos, constituindo a sequência LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES de 4493,33 Da, iniciado por duas leucinas (88). Apesar de ser a forma madura do peptídeo, há ainda fragmentos menores que podem ser formados pelas serino proteases, como o KS-30, KS-22, LL-29, KR-20, RK-31, LL-23 e KS-27 (89).

Inicialmente, a LL-37 foi descrita e caracterizada como um peptídeo antimicrobiano, com função especialmente microbicida contra um amplo espectro de bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas, além de fungos e formação de biofilmes. Alguns estudos chegaram a cogitar sua eficácia contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tanto *in vitro* como *in vivo*, reforçando assim sua ação de amplo espectro. Contudo, apesar de estudos demonstrarem que bactérias teriam maior dificuldade em desenvolver resistência contra o peptídeo, quando comparado à antibióticos convencionais, várias estratégias de resistência foram descritas. Exemplos dessas estratégias são, a produção de proteases capazes de clivar o peptídeo, modificações de membrana e modificações de estrutura até mesmo do LPS, demonstrando assim que sua atividade antimicrobiana não é tão eficiente (89).

O amplo espectro de atividade da LL-37 ainda inclui a ativação de proliferação celular, migração de células epiteliais, indução da angiogênese e promoção de fechamento de feridas, tendo assim um importante papel na homeostase de tecidos e no processo regenerativo (93).

Além da fraca ação antimicrobiana e da ação na homeostase de tecidos e regeneração, a LL-37 age como uma molécula imunomoduladora fisiológica que tem o potencial de atrair neutrófilos, monócitos e linfócitos T, controlar o processo de inflamação em sítios de infecção e injúrias, tendo efeitos tanto pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórios (93, 97, 98). Assim, pode-se dizer que a LL-37 pode seletivamente modular as respostas imunes do hospedeiro para ser capaz de



resolver a inflamação induzida por patógeno enquanto mantém ou melhora a imunidade (97).

O mecanismo de modulação imune utilizado pela LL-37 ainda é complexo. Contudo, há sido demonstrado que alvos da via inflamatória, como os receptores TLR para NF- $\kappa$ B, na presença de patógenos ou estímulos inflamatórios, resultam em supressão seletiva de respostas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo em que há essa supressão de respostas pró-inflamatórias, há também a manutenção de respostas imunes críticas, como o recrutamento de células de defesa (97).

No que diz respeito à relação entre a LL-37 e o DM, há estudos que demonstram que pacientes diabéticos possuem menores níveis de produção do peptídeo, tanto em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) quanto na pele, quando comparados à pessoas saudáveis. Esse dado sugere que o aumento dos níveis de glicose sanguínea pode estar relacionado com a baixa produção dos HDPs (17).

Em um outro estudo, foi demonstrado que as altas taxas de glicose suprimiu a lesão induzida pelo aumento de expressão de LL-37 endógena e à LL-37 adicionada de forma exógena, que restaurou parcialmente a cicatrização de feridas na presença de altas taxas de glicose e interrompeu a sinalização de receptor de fator de crescimento da epiderme (EGFR) em culturas de córneas suínas (18). Desta forma, o peptídeo LL-37 foi selecionado como peptídeo controle por ser uma catelecidina natural humana com efeito imunomodulatório previamente descrito.

#### **2.4.2 Peptídeos IDRs**

Os peptídeos reguladores da defesa inata (IDRs) são versões imunomoduladoras sintéticas dos HDPs naturais. Os IDRs possuem ampla ação protetora contra infecções bacterianas sistêmicas mesmo na ausência de atividade antimicrobiana, representando assim uma nova terapia anti-infecção e anti-inflamatória (9, 98). Levando em conta seu campo de atuação sendo representado pelo hospedeiro, espera-se que as bactérias não se tornem resistentes, como já existem relatos acerca dos peptídeos antimicrobianos que atuam direta e

exclusivamente contra os microrganismos, indicando-os assim, como potenciais na associação com a terapia anti-infecciosa (99).

Pertencem a uma classe complexa de peptídeos imunomoduladores derivados de HDPs endógenos com a potente habilidade de combater patógenos bacterianos através da complexa regulação da resposta imune inata, diminuindo respostas pró-inflamatórias, limitando assim inflamações potencialmente danosas (9, 100). O mecanismo de recrutamento celular dos neutrófilos, por exemplo, mediado pelos peptídeos da classe IDR envolve a indução local de quimiocinas e a promoção de adesão celular mediado por ativação de integrinas e produção de citocinas pró-inflamatórias. A migração dos neutrófilos da circulação para a área de inflamação ou infecção envolve a regulação da expressão de moléculas de superfície de adesão, como por exemplo a I-selectina e as integrinas  $\beta_2$  (9, 99, 101).

#### 2.4.2.1 Peptídeo IDR-1018

O peptídeo IDR-1018 possui 1788,17 Da, uma sequência de também 12 resíduos de aminoácidos, VRLIVAVRIWRR-NH<sub>2</sub>, e é relatado como o mais potente indutor de quimiocinas, como a MCP-1 e MCP-3, o qual possui habilidade de reduzir a produção de citocinas induzidas por LPS, principalmente a TNF- $\alpha$ , ao mesmo tempo que possui mínima atividade citotóxica e hemolítica (7, 9, 102, 103). A cicatrização de feridas e a fagocitose de células que sofreram apoptose são funções características de macrófagos do tipo M2, consistente com essas informações, macrófagos M2 diferenciados na presença do IDR-1018 exibiram um aumento na expressão basal de diferentes genes relacionados à cicatrização de feridas (EGF, VCAN), que são essenciais para o processo de reparo tecidual. Essa informação é complementada com estudos, que demonstraram que o IDR-1018 apresentou-se como um bom promotor de cicatrização em tecidos de camundongos e porcos (102, 104). Seguindo a linha de diferenciação de macrófagos, estudos sugerem que macrófagos diferenciados na presença do IDR-1018 atuam principalmente durante a resolução de uma infecção ou após a lesão tecidual, limpando os debris celulares e células que sofreram apoptose do local afetado, processo este necessário para o retorno da homeostase tecidual (102).

Sendo assim, levando em conta o histórico do peptídeo no que diz respeito à indução de quimiocinas, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e seu efeito na cicatrização de feridas, esse peptídeo foi considerado também como um possível bom candidato para a avaliação do seu efeito quando exposto à um modelo *in vitro* de diferentes concentrações de glicose.

#### 2.4.2.2 Peptídeo IDR-1002

O peptídeo IDR-1002 de 1904,29 Da é de curta sequência, assim como o IDR-1018, contem somente 12 resíduos de aminoácidos, VQRWLIVWRIRK-NH<sub>2</sub>, é derivado de uma bactericina encontrada em neutrófilos bovinos, confere proteção contra microrganismos, aumentando as defesas imunes inatas do hospedeiro enquanto suprime potencialmente as respostas inflamatórias exacerbadas, que acabam causando danos (98, 100). Em estudos anteriores, o IDR-1002 demonstrou não apresentar efeitos quimiotáticos ou quimiocinéticos diretos, onde o aumento da migração de monócitos se devia a uma rede de fibronectina via promoção da adesão mediada pela  $\beta$ 1-integrina (100, 105). Contudo, outros trabalhos afirmam que o peptídeo é capaz de aumentar a proteção do hospedeiro, por exemplo, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em modelos de infecção em murinos, a partir de um maior recrutamento de leucócitos/neutrófilos e monócitos/macrófagos e maior produção de quimiocinas, como a CCL3 e a CCL5, no sítio de infecção (9, 98, 100, 106).

Ainda não há na literatura estudos que descreveram o potencial do peptídeo IDR-1002 quando relacionado ao DM. No entanto, diante da sua capacidade de proteção ao hospedeiro com o aumento de recrutamento de células imunes e maior produção de quimiocinas, este foi um dos peptídeos escolhidos para desvendar o comportamento, no que diz respeito a produção de citocinas, diante de várias concentrações de glicose, na presença de LPS e IFN- $\gamma$ .

### 2.4.2.3 Peptídeo DJK-6

Pouco se sabe sobre o peptídeo DJK-6, uma vez que este consiste um peptídeo novo, descrito pela primeira vez na literatura em fevereiro de 2015 (107). O DJK-6 consiste em uma versão sintética D-enantiômera que foi desenhada baseada nas propriedades associadas ao peptídeo IDR-1018 e aos peptídeos anti-biofilmes mais ativos descritos por de la Fuente-Núñez et al. (107). O DJK-6 possui 1667,04 Da e uma sequência de 12 resíduos de aminoácidos, sendo eles VQWRRIRVWVIR.

Estratégias de resistência bacterianas aos peptídeos antimicrobianos já foram relatadas anteriormente, o que inclui a degradação enzimática de peptídeos L-enantiômeros, como por exemplo o IDR-1018, uma vez que as proteases do hospedeiro são capazes de degradar os peptídeos durante a terapia (108). Sendo assim, para superar essas limitações, foram desenhados peptídeos D-enantiômeros, chamados também de peptídeos resistentes à proteases, os quais não podem ser reconhecidos por proteases bacterianas ou do hospedeiro que aumentam durante infecções e são capazes de clivar peptídeos compostos inteiramente por L-aminoácidos. Esses peptídeos demonstraram ser até 10 vezes mais potentes quando comparadas aos peptídeos anteriormente descritos (107, 109).

Um trabalho recente indicou que o peptídeo D-aminoácido, peptídeo não natural análogo à LL-37 pode ser igualmente ativo contra biofilmes *in vitro* quando comparado ao peptídeo L-aminoácido variante (108, 110). Sendo assim, percebe-se que mesmo pequenas mudanças na sequência de peptídeos são capazes de tornar o peptídeo mais efetivo e ativo, como por exemplo, o DJK-2 e o DJK-6, que apresentaram concentrações inibitórias de biofilme mínimas (MBIC) de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, contra *Pseudomonas aeruginosa* (107).

Contudo, ainda não há nenhum dado descrito na literatura relacionado à capacidade imunomoduladora do DJK-6, ou como um potencial peptídeo para o tratamento relacionado ao DM. Desta forma, devido a sua atividade promissora contra bactérias produtoras de proteases e ação contra biofilmes, este peptídeo também foi considerado como candidato potencial imunomodulador diante de respostas do sistema imune, em diferentes condições de glicose.

O DM possui alta prevalência mundial e possui características relacionadas aos efeitos sistêmicos culminando em diversos processos de lenta recuperação e de grande impacto na vida do paciente diabético. A resposta imune apresenta uma íntima relação no controle desses processos, assim como nas consequências desta patologia. Entretanto, atualmente, ainda não há muitas pesquisas que analisem essa relação imunológica entre a condição clínica e as complicações causadas e muito menos pesquisas que busquem novas formas de tratamento, para uma possível associação aos tratamentos já existentes. Neste aspecto, peptídeos imunomoduladores são biomoléculas promissoras para o desenvolvimento de um possível fármaco capaz de ser utilizado em associação aos medicamentos já existentes a fim de tratar não somente o dano causado pela patologia, mas também conseguir um equilíbrio do sistema imune que geralmente é exacerbado nesse tipo de paciente. Portanto, este trabalho visa verificar o potencial biotecnológico de peptídeos sintéticos imunomoduladores frente à um modelo de hiperglicemia *in vitro*, assim como, em aspectos imunológicos como a produção de quimiocina, citocinas e mediadores inflamatórios, em cultura de células RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS e/ou IFN- $\gamma$ .

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificação do potencial imunomodulador de peptídeos sintéticos candidatos, em diferentes condições de glicose e resposta inflamatória/infecciosa *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de D-glicose (5,5 mM, 8 mM, 12 mM e 24 mM) na viabilidade e na produção dos mediadores inflamatórios IL-6, TNF- $\alpha$  e NO em células RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS e/ou rIFN- $\gamma$ .
- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de D-glicose e diferentes concentrações (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) dos peptídeos imunomoduladores candidatos (LL-37, DJK-6, IDR-1018 e IDR-1002), na viabilidade e na produção dos mediadores inflamatórios IL-6, TNF- $\alpha$  e NO em células RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS e/ou rIFN- $\gamma$ . Somente os peptídeos com boa viabilidade celular e produção de NO serão avaliados quanto a produção de IL-6 e TNF-  $\alpha$ .
- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de D-glicose e de uma única concentração (64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) dos peptídeos preteridos (LL-37 e IDR-1018), na viabilidade, na produção de quimiocinas, como a MCP-1, na produção de citocinas de perfil M1 (IL-12) e M2 (IL-10) e na produção dos mediadores inflamatórios IL-6, TNF- $\alpha$  e NO em células RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS e/ou rIFN- $\gamma$ .

## 4 MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi uma avaliação quantitativa e qualitativa do efeito de diferentes concentrações de peptídeos imunomoduladores (LL-37, DJK-6, IDR-1018 e IDR-1002), na resposta imune mediada por LPS e/ou rIFN- $\gamma$ , em diferentes concentrações de glicose (5,5 mM, 8 mM, 12 mM e 24 mM) *in vitro*, mimetizando as condições de glicemia de 99 mg.dL<sup>-1</sup>, 144 mg.dL<sup>-1</sup>, 216 mg.dL<sup>-1</sup> e 432 mg.dL<sup>-1</sup>, respectivamente (111). Para tanto, este estudo foi dividido em 3 fases (Figura 1).

Após as 3 fases do estudo, a meta foi determinar o potencial destes peptídeos como nova forma terapêutica adjuvante para a prevenção e/ou tratamento de lesões teciduais provocadas pela exacerbação da resposta imune do paciente diabético, em condições inflamatórias e/ou infecciosas.

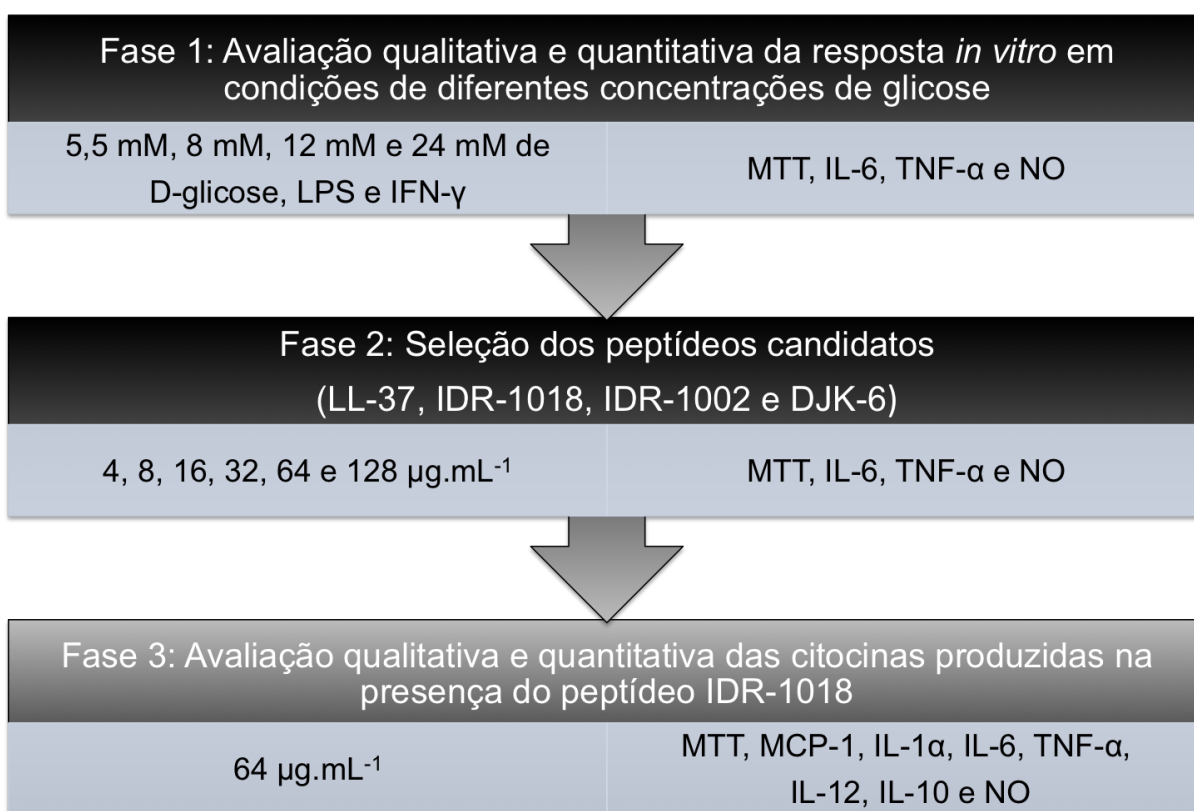


Figura 1 – Fluxograma de desenvolvimento do trabalho.

## 4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 E DJK-6)

Os peptídeos utilizados foram sintetizados, purificados (>95%), liofilizados e armazenados pela *Peptide 2.0 Inc.* (EUA) e AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil). A síntese foi realizada em fase sólida a partir da metodologia F-moc (112). Antes dos experimentos, foi realizada confirmação da massa molecular e pureza destes via espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-ToF). Os peptídeos foram diluídos em água ultrapura e analisados em matriz (ácido saturado  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, preparado com 50  $\mu$ L de ácido trifluoroacético à 3%, acetonitrila 100% e 200  $\mu$ L de água ultrapura) no volume de 1:3. Depositada na placa (*AnchorchipVar-384*) em triplicata, a amostra cristalizou à temperatura ambiente. A massa molecular foi determinada via MALDI-ToF Ultra Flex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA). A massa mono isotópica foi obtida a partir de espectrometria de massa (Bruker Daltonics, Billerica, MA), utilizando o método de operação refletido e positivo de 700 a 3500 Da, com calibração externa.

### 4.2.1 Purificação e quantificação dos peptídeos (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 e DJK-6)

Uma vez que o espectro da massa de alguns peptídeos tenham apresentado impurezas, com a presença de íons não compatíveis com o peptídeo ou íons compatíveis com degradação, o peptídeo foi submetido à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RT-HPLC). Para tal, o peptídeo foi solubilizado em água ultrapura (500  $\mu$ g) e submetido à coluna semi preparativa C18 (NST, 5  $\mu$ m, 250 mm x 10 mm), sendo eluído com um gradiente linear de acetonitrila (5-95%) por 60 min, a um fluxo de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. As frações, monitoradas à 216 nm, foram coletadas e liofilizadas.

Após a purificação, a amostra foi novamente analisada por MALDI-ToF (anexo A). Para os experimentos, os peptídeos foram diluídos em água ultrapura e



quantificados pela absorção de UV a 205, 215 e 225 nm utilizando a fórmula de concentração(113):

$$A = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

$$B = (A_{205}) \times 31$$

$$\frac{A + B}{2} = \mu\text{g. mL}^{-1}$$

Os peptídeos foram armazenados a -20°C até o uso.

### 4.3 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA DOS PEPTÍDEOS

#### 4.3.1 Cultura de Células RAW 264.7 e Grupos Experimentais

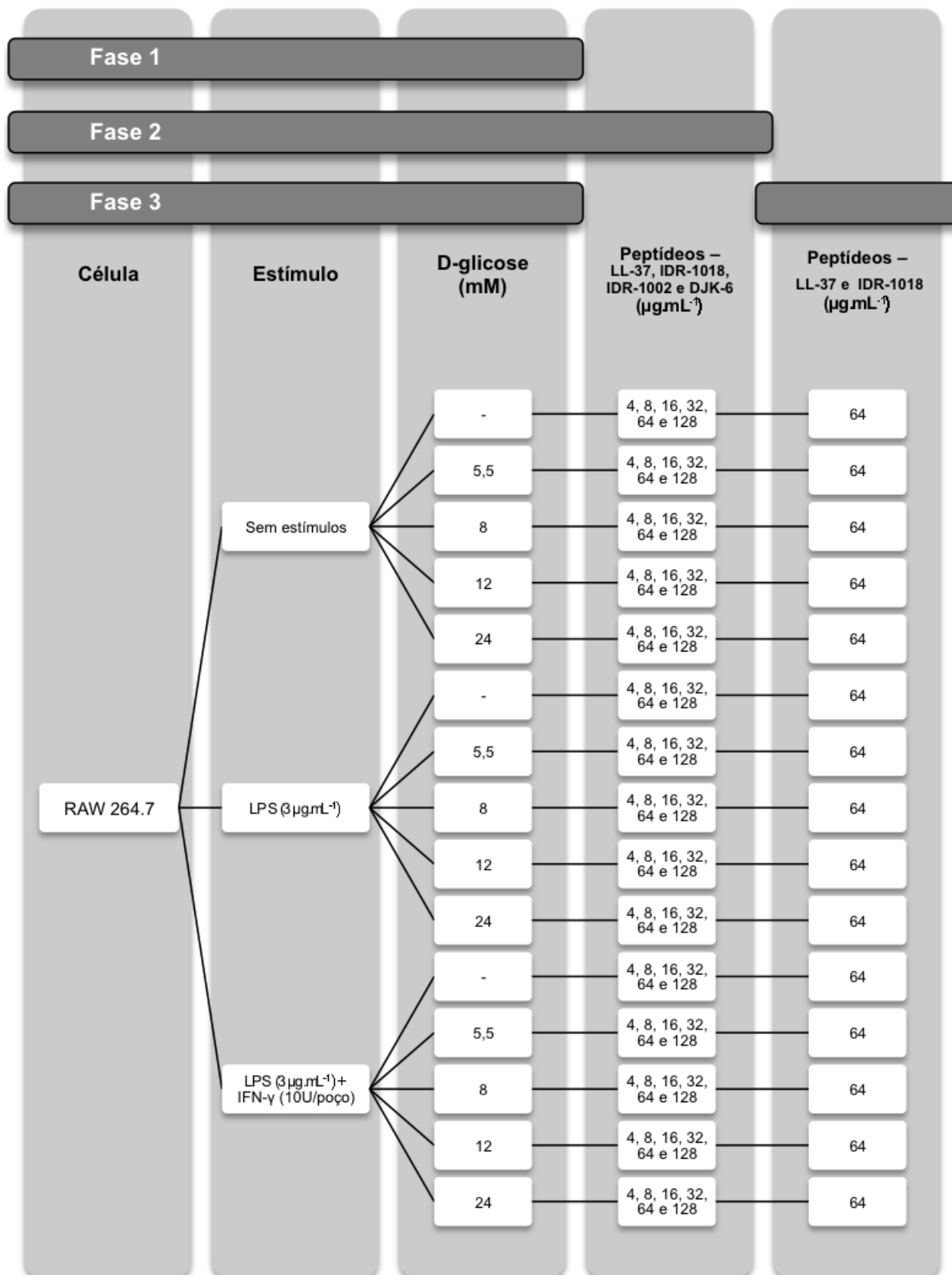
A linhagem de células RAW 264.7 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (CR108). Estas células são macrófagos precursores de osteoclastos, derivados de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson (114). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, EUA), 0,5% de solução de aminoácidos MEM (Gibco, EUA), 0,05% de gentamicina (Gibco, EUA), 0,5% de l-glutamina (Gibco, EUA) e o 0,5% de penicilina/estreptomicina (1000 U.mL<sup>-1</sup>) (Gibco, EUA) em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C e 95% de umidade. O cultivo de células RAW 264.7 foi realizado na concentração de 1x10<sup>5</sup> células por poço, em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, Brasil), em meio alpha MEM (*Minimum Essential Medium Alpha Medium*) (Gibco, EUA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Gibco, EUA), 2,6% de NaHCO<sub>3</sub> Hibrimax (Sigma-Aldrich, EUA), 1% de solução de aminoácidos MEM (Gibco, EUA), 0,05% de gentamicina (Gibco, EUA), 1% de l-glutamina (Gibco, EUA) e o 1% de penicilina/estreptomicina (1000 U.mL<sup>-1</sup>) (Gibco, EUA). As culturas foram submetidas a diversos estímulos, de acordo com as respectivas fases de desenvolvimento do trabalho: D-glicose (5,5 mM, 8 mM, 12 mM e 24 mM, Sigma-

Aldrich, EUA); LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, EUA); rIFN- $\gamma$  (10U por poço<sup>1</sup>, Peptotech, EUA); peptídeos LL-37, DJK-6, IDR-1002 e IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), de acordo com a tabela 3. Cada grupo experimental foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas, em placas de culturas de 96 poços (Kasvi, Brasil). Os grupos experimentais *in vitro* foram determinados para se assemelharem a um modelo de infecção e inflamação experimental (pela adição de LPS e do recombinante (r) da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ ). De forma semelhante, as diferentes condições de hiperglicemia (pela adição de diferentes concentrações de D-glicose, 5,5 mM, 8 mM, 12 mM e 24 mM) foram utilizadas para mimetizar condições de variações de glicose no sangue: onde 5,5 mM corresponde à  $99 \text{ mg.dL}^{-1}$ , equivalente à glicemia normal em jejum; 8 mM corresponde à  $144 \text{ mg.dL}^{-1}$ , equivalente à uma glicemia pós-prandial; 12 mM corresponde à  $216 \text{ mg.dL}^{-1}$ , equivalente à uma glicemia de um indivíduo diabético controlado; e 24 mM corresponde à  $432 \text{ mg.dL}^{-1}$ , equivalente à um indivíduo diabético descompensado, onde ambas representam altas concentrações de glicose sanguínea (111).

---

<sup>1</sup>Cada  $1 \mu\text{g}$  de IFN- $\gamma$  equivale a 8430 U.

Tabela 3 – Fases de realização dos experimentos e grupos experimentais testados



### 4.3.2 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi realizada após o período de 6, 24 e 72h de incubação das placas, que continham os grupos experimentais, a 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 95% de umidade. O grupo controle positivo foi representado por poços em triplicata contendo células e meio de cultura, representando 100% da viabilidade celular e o grupo controle negativo foi representado por poços em triplicata contendo células em meio de cultura com solução de lise (10 mM Tris, 1 mM EDTA e 0,1% triton X-100, pH 7,4) (115), representando 0% de viabilidade celular. O grupo contendo somente meio de cultura foi considerado como branco. Ao final dos períodos de incubação, foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT (Sigma-Aldrich, EUA). O MTT consiste em um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan(116). Após o período de incubação, parte do sobrenadante foi removido, remanescendo apenas 45 µL de sobrenadante por poço. Foi adicionado 10 µL do reagente de MTT (50 µg por poço) e as placas de cultura (Kasvi, Brasil) foram novamente incubadas por 4h a 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 95% de umidade. Após as 4h de incubação, a reação foi bloqueada com 60 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA) por poço com posterior homogeneização de cada poço para a completa solubilização do produto celular. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), à um comprimento de onda de 595 nm.

### 4.3.3 Avaliação da Atividade Imunomoduladora dos Peptídeos

Os ensaios para a avaliação da resposta imune seguiram os mesmos grupos experimentais utilizados na fase 1, 2 e 3, conforme já descritos (Tabela 1). Após os períodos experimentais de 6, 24 e 72h, o sobrenadante das culturas foi coletado. A partir desse sobrenadante foram realizadas as dosagens de quimiocina, citocinas e de NO.

#### 4.3.3.1 Dosagem de quimiocina e citocinas por *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA)

A produção das quimiocina MCP-1 e citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  foram verificadas a partir do sobrenadante das culturas incubadas nos períodos de 6, 24 e 72h. A avaliação da produção de MCP-1 foi realizada após 6h de incubação (117, 118). As citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  foram avaliadas após 24h, enquanto a IL-10 foi verificada após 72h de incubação (117, 119-121). A produção dessas citocinas foram determinadas pelo método de *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA), utilizando os respectivos *murine ELISA development kit* (Peprotech, EUA) de cada citocina, seguindo-se as especificações do fabricante. Os níveis das citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg.mL<sup>-1</sup>), após comparação realizada com a curva padrão proposta pelo kit de ELISA utilizado de acordo com as especificações do fabricante (122).

#### 4.3.3.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Outro parâmetro analisado para a avaliação da atividade imunomodulatória foi a produção de NO. A partir das culturas utilizadas para a análise de viabilidade celular, os sobrenadante de 24, 48 e 72h (fase 1), 24h (fase 2) e 72h (fase 3) foram coletados para a avaliação dos níveis de nitrito. O método utilizado para avaliação da produção de nitritos foi o de Green *et al.* (1982), com modificações. Foram transferidos 100  $\mu$ L dos sobrenadantes das culturas para placas de 96 poços (Kasvi, Brasil). Nos poços da curva padrão de nitrito de sódio foram adicionados 100  $\mu$ L de meio alpha MEM suplementado (Gibco, EUA). Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e naftiletilenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), a 490 nm. O cálculo para estimar a quantidade de nitrito foi realizado a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio (1,5625  $\mu$ M a 200  $\mu$ M) (123).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão para cada réplica biológica e em seguida foi realizado o cálculo da média e erro padrão das médias, como um indicativo de reprodutibilidade das réplicas. Em seguida foi realizada a verificação de normalidade das amostras (teste de *Kolmogorov Smirnov*) e posterior estatística paramétrica, mediante a análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*), seguido do pós teste de Bonferroni. As análises foram consideradas a um intervalo de segurança de 95%, tendo um valor de  $p < 0,05$ . Estas análises foram estabelecidas nas 3 fases do trabalho. Na fase 1, a análise apresentou o comportamento das diferentes concentrações de D-glicose e seu efeito na resposta imune/inflamatória *in vitro*. Na fase 2, esta análise estatística foi definidora na seleção do peptídeo e sua concentração para ser melhor estudada na terceira fase do estudo. E na terceira fase do estudo, esta análise estatística possibilitou uma análise mais ampla do comportamento do peptídeo IDR-1018 e da LL-37 em diferentes condições de glicose e resposta imune/inflamatória *in vitro*. O peptídeo LL-37 foi utilizado como controle para a comparação do peptídeo IDR-1018, por ser conhecidamente descrito na literatura como peptídeo com ação imunomoduladora (96). A análise estatística foi realizada no *software GraphPadPrism5*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 FASE 1 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS OU NÃO POR LPS E/OU rIFN- $\gamma$ , EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE D-GLICOSE

#### 5.1.1 Viabilidade celular

A fim de verificar a condição de viabilidade das culturas celulares após os tratamentos aplicados, foi realizado o ensaio de MTT. A viabilidade das células RAW foi mantida após 6, 24, 48 e 72h de incubação, mesmo quando as culturas foram estimuladas com diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ . Entretanto, após 7 dias de cultura, houve uma diminuição significativa na viabilidade celular do grupo de células estimuladas somente com 12 mM de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (Figura 2A) e no grupo estimulado com 12 mM de D-glicose e LPS, chegando a apenas 3% de células RAW viáveis ( $p < 0,05$ ) (Figura 2B). Em adição, quando acrescentado o rIFN- $\gamma$  às culturas de 7 dias, a viabilidade celular ficou em torno de 5% no grupo sem estímulo de D-glicose e nos grupos estimulados com 8 e 12 mM de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (Figura 2C). Já nos grupos estimulados com 5,5 e 24 mM de D-glicose, na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ , a viabilidade chegou próximo a nulo ( $p < 0,05$ ) (Figura 2C)<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (B e C) em 7 dias e \* comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose (A) em 7 dias.

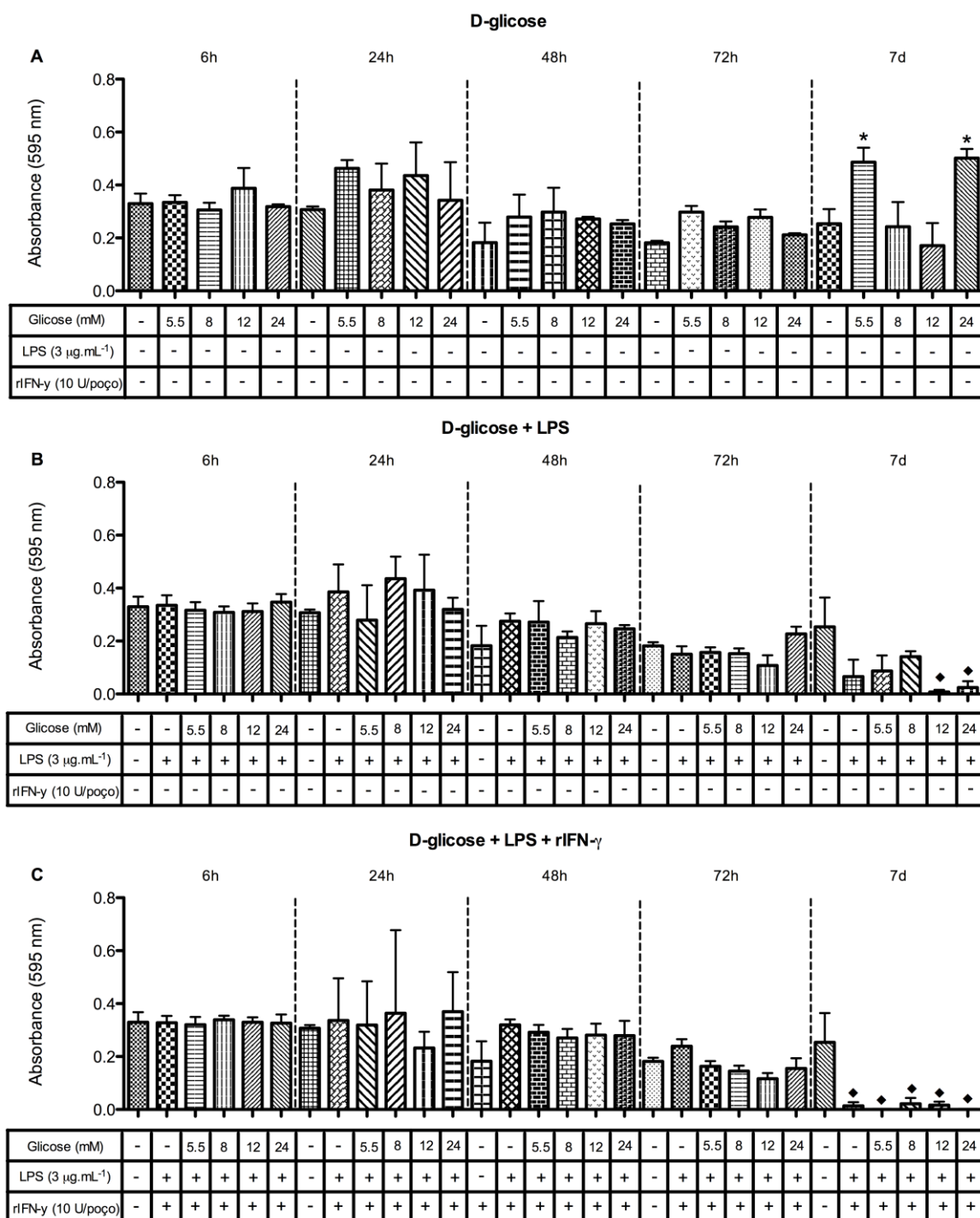


Figura 2 – Viabilidade celular na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 6, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.



### 5.1.2 Produção da quimiocina MCP-1

O efeito das diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  nos níveis de produção de quimiocina foi verificado em culturas de células RAW. Como representado na Figura 3, houve um discreto aumento, não significativo na produção da quimiocina MCP-1 quando as células foram estimuladas com 5,5 e 12 mM de D-glicose, LPS com ou sem rIFN- $\gamma$  (Figuras 3A, B e C).

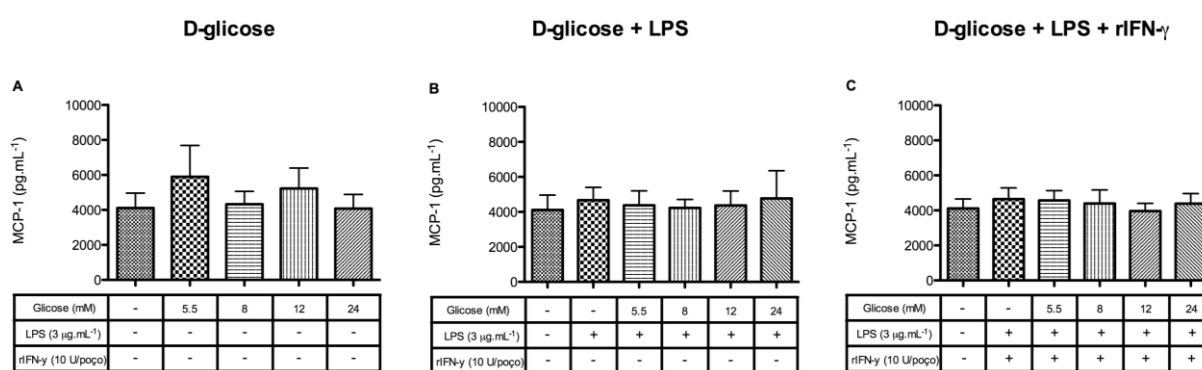


Figura 3 – Produção de MCP-1 na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C). A produção da quimiocina MCP-1 foi avaliada a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.1.3 Produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$

A fim de verificar os efeitos das diferentes concentrações de D-glicose em condições imunes e inflamatórias, as citocinas envolvidas nos processos pró-inflamatórios (IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foram analisadas. De acordo com o grupo controle, as diferentes concentrações de D-glicose não alteraram os níveis basais de produção destas citocinas (Figuras 4A, D e G). Ao adicionar LPS às culturas celulares, não foi observado alterações nos níveis basais das citocinas IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  (Figura 4B e H). Contudo, quando a produção de IL-6 foi avaliada, na presença do LPS, foi observado nas culturas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose, um aumento na produção desta citocina quando comparado aos grupos controles de células RAW e de células RAW estimuladas com LPS, além dos grupos estimulados com 5,5 e 8 mM de D-glicose ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 4E). Em adição, foi estabelecida uma condição imuno/inflamatória na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ . Desta forma, foi observada uma alta produção de IL-6 em todos os grupos submetidos a estes estímulos ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 4F). Já no que se refere à produção de TNF- $\alpha$ , observou-se um aumento na produção desta citocina no grupo adicionado de 24 mM de D-glicose e LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 4I)<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por ## comparado com o grupo estimulado por 24 mM D-glicose e LPS (E) e por 24 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (I); ( $p < 0,01$ ) foi representado por \*\* comparado com o grupo controle de células RAW (F), \* comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose e LPS (E) e # comparado com o grupo estimulado por 24 mM D-glicose e LPS (E); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por ■■ comparado com o grupo controle de células RAW (F).

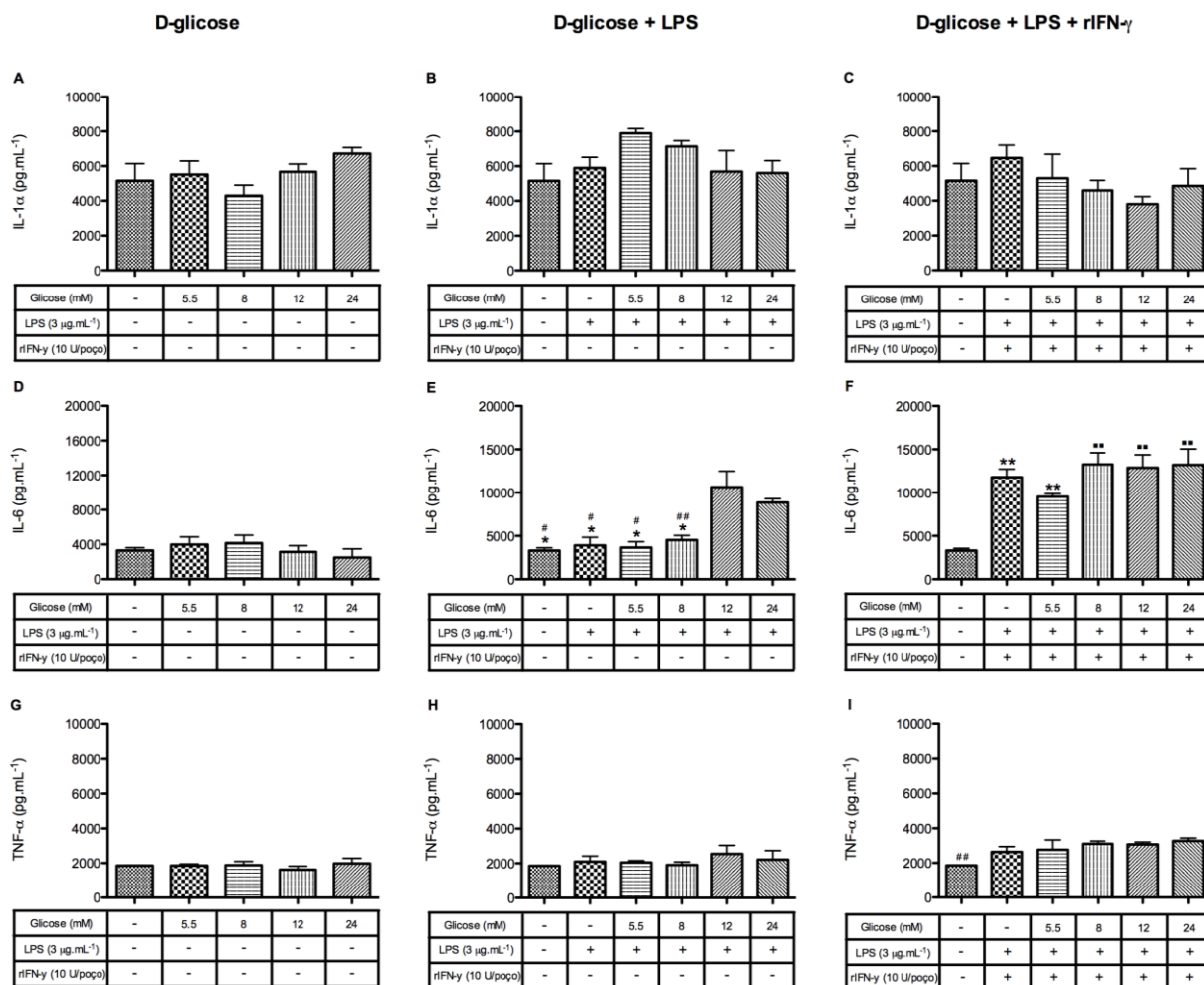


Figura 4 – Produção de IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A, D e G), LPS (B, E e H) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C, F e I). Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### 5.1.4 Produção das citocinas pró-inflamatória com perfil M1 (IL-12) e anti-inflamatória com perfil M2 (IL-10)

Para atingir uma compreensão mais completa dos efeitos das diferentes concentrações de D-glicose em condições imuno/inflamatórias, foram analisadas as citocinas envolvidas na polarização de macrófagos tipo M1 e M2 (IL-12 e IL-10, respectivamente). Não houve diferença na produção de IL-12 nos grupos de macrófagos estimulados com as diferentes concentrações de D-glicose, comparado ao grupo controle (Figura 5A). Em contraste, a produção de IL-10 aumentou nos grupos estimulados com 5,5 e 12 mM de D-glicose, enquanto as concentrações de 8 e 24 mM de D-glicose levaram a diminuição na sua produção ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 5D). A adição de LPS nas culturas celulares levou a uma leve diminuição na produção de IL-12 nos grupos estimulados com 5,5 e 8 mM de D-glicose e um aumento de produção no grupo estimulado com 12 mM de D-glicose ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 5B). Em contraste com a produção de IL-12, o grupo controle contendo LPS, diminuiu a produção de IL-10 quando comparado ao grupo de células RAW não estimuladas ( $p < 0,001$ ). Contudo, houve um padrão de aumento de produção de acordo com o aumento das concentrações de D-glicose ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 5E). No entanto, na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ , houve um aumento na produção de IL-12 no grupo contendo 5,5 mM de D-glicose ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 5C), mas uma diminuição na produção de IL-10 nos grupos estimulados com 8, 12 e 24 mM de D-glicose, comparado aos níveis basais ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 5F)<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por ■ comparado com o grupo controle de células RAW (E e F) e ## comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (F), por 24 mM D-glicose (D) e por 24 mM D-glicose e LPS (B e E); ( $p < 0,01$ ) foi representado por \*\* comparado com o grupo controle de células RAW (B, C, E e F), ◆ comparado com o grupo estimulado por 5 mM D-glicose (D) e \* comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose e LPS (B e E) e por 12 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C); ( $p < 0,001$ ) foi representado por ° comparado com o grupo estimulado por 5 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e por 8 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (F).

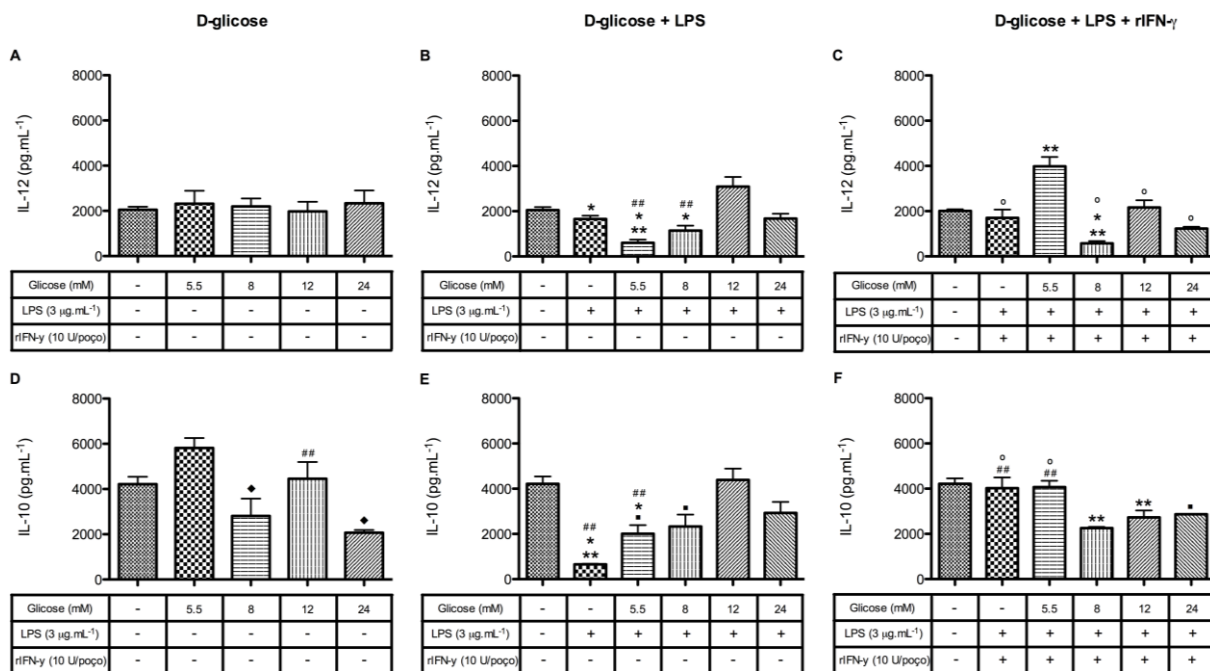


Figura 5 – Produção de citocinas com perfil M1 (IL-12) e M2 (IL-10) na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A e D), LPS (B e E) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C e F). A produção das citocinas, IL-12 (A, B e C) e IL-10 (D, E e F) foram avaliadas a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.1.5 Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi verificada e manteve um padrão de aumento de produção de acordo com os tempos experimentais. Houve um aumento na produção de NO quando comparou-se o grupo controle e o grupo estimulado com 24 mM de D-glicose em 24h ( $p < 0,05$ ) e entre o grupo controle e todos os grupos estimulados com diferentes concentrações de D-glicose, em 7 dias ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 6A). O pico da produção de NO foi obtido após 72h de incubação (Figuras 6A, B e C) e com as menores produções nas culturas de células RAW estimuladas somente com as diferentes concentrações de D-glicose (Figura 6A). Entretanto, a adição de LPS e LPS com rIFN- $\gamma$  levou a uma diminuição da produção de NO, após 7 dias de cultura, quando comparado com os outros tempos experimentais, mas ainda assim uma produção aumentada quando comparado com os controles ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figuras 6B e C). Após a adição de LPS e rIFN- $\gamma$ , houve um aumento de produção de NO, em todos os grupos, de todos os tempos experimentais comparados aos grupos controles ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) (Figura 6C)<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por  $\blacklozenge$  comparado com o grupo controle de células RAW (A - 72h; B - 48h e 7d; C - 7d),  $\star$  comparado com o grupo estimulado por 5,5 mM D-glicose (A - 72h e 7d) e por 5,5 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C - 24h),  $\#$  comparado com o grupo estimulado por 8 mM D-glicose (A - 24h) e por 8 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C - 72h),  $^{\circ}$  comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose e LPS (B - 24h e 7d) e  $\ast$  comparado com o grupo estimulado por 24 mM D-glicose (A - 24h) e por 24 mM D-glicose e LPS (B - 7d); ( $p < 0,01$ ) foi representado por  $\ast\ast$  comparado com o grupo controle de células RAW (A - 48h e 7d; B - 24h, 48h e 7d; C - 48h, 72h e 7d),  $\bullet$  comparado com o grupo estimulado por 12 mM D-glicose (A - 48h) e  $\bullet\bullet$  comparado com o grupo estimulado por 24 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C - 24h); ( $p < 0,001$ ) foi representado por  $\blacksquare$  comparado com o grupo estimulado por 24 mM D-glicose (A - 48h), por 24 mM D-glicose e LPS (B - 24h) e por 24 mM D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C - 24h); e ( $p < 0,0001$ ) foi representado por  $\blacksquare\blacksquare$  comparado com o grupo controle de células RAW (C - 24h e 48h).

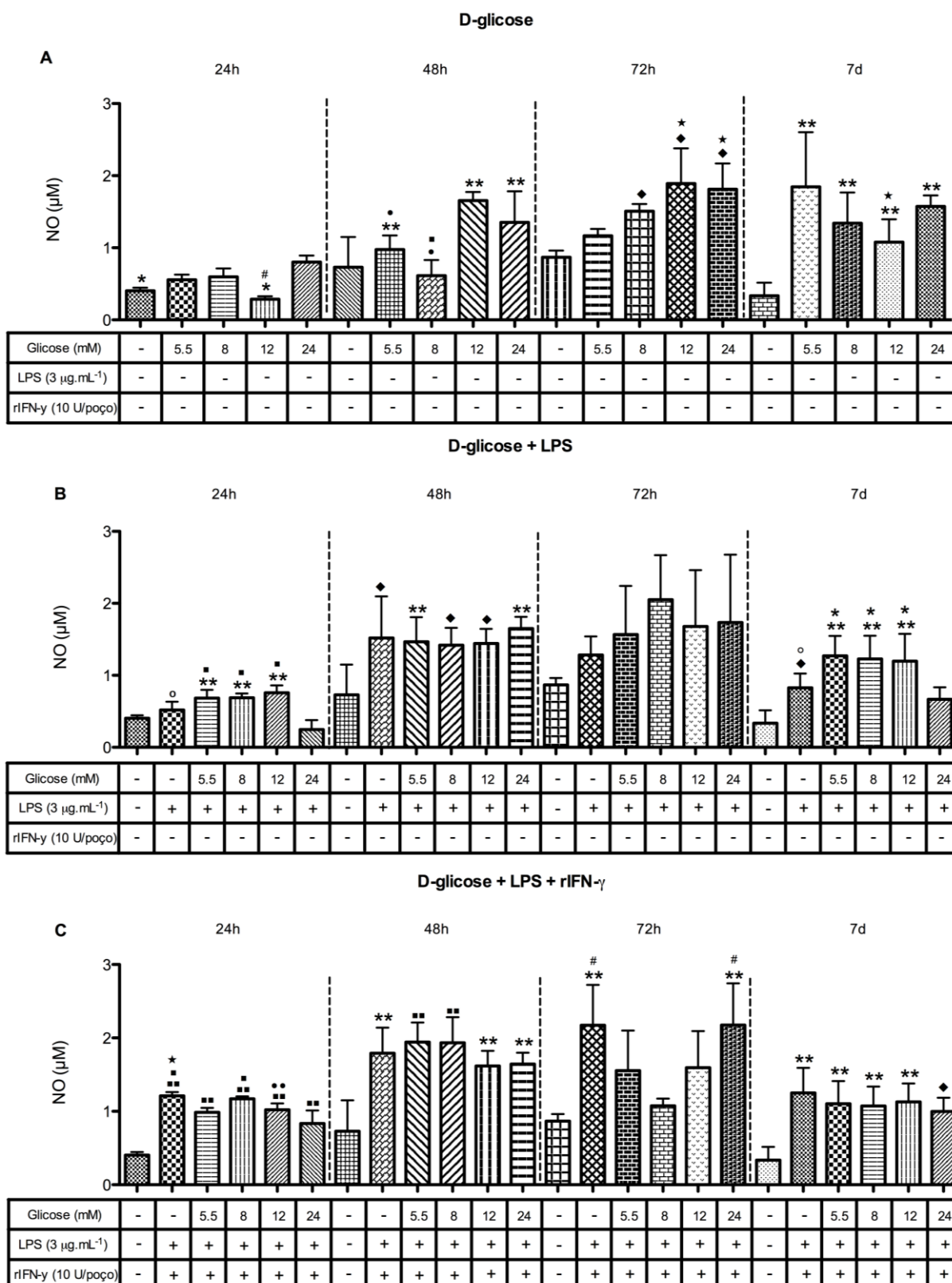


Figura 6 – Produção de NO na presença ou ausência de diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN-γ (C) após 24, 48, 72 horas e 7 dias. A produção de NO foi avaliada a partir do sobrenadante de culturas celulares. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### Resumo dos resultados da fase 1:

A tabela 4 representa os resultados de uma forma geral e resumida da fase 1 do trabalho. A presença das diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  não provoca alteração da viabilidade celular até 72h, a partir desse momento ocorre uma diminuição. A produção de IL-1 $\alpha$  não se alterou diante dos estímulos. Houve aumento na produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12, enquanto que a produção de IL-10 foi diminuída. Apesar dos resultados apresentados, o estímulo somente das concentrações de glicose, não foi capaz de alterar os parâmetros imunes *in vitro*, deve-se levar em conta que *in vivo* a presença das altas concentrações de glicose é constante e duradoura e está sempre associada aos processo de inflamações ou infecções e por isso a necessidade de uma molécula capaz de ajudar no controle das respostas imune.



Tabela 4 - Resumo dos resultados da fase 1 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle

		<b>Glicose</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS/rIFN-γ</b>
<b>Viabilidade celular</b>	6h	=	=	=
	24h	↑	↑	=
	48h	↑	↑	↑
	72h	↑	=	=
	7 dias	↑	↓	↓
<b>Produção de MCP-1</b>		=	=	=
<b>Produção de IL-1α</b>		=	=	=
<b>Produção de IL-6</b>		=	↑	↑
<b>Produção de TNF-α</b>		=	=	↑
<b>Produção de IL-12</b>		=	↑	↓
<b>Produção de IL-10</b>		= ↓	↓	↓
<b>Produção de NO</b>	24h	=	↑	↑
	48h	↑	↑	↑
	72h	↑	↑	↑
	7 dias	↑	↑	↑

## 5.2 FASE 2 – SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS CANDIDATOS (LL-37, IDR-1018, IDR-1002 E DJK-6)

### 5.2.1 Peptídeo LL-37

#### 5.2.1.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas na presença dos diferentes estímulos se manteve estável e acima de 100% na maioria dos grupos. Quando estimuladas com as diferentes concentrações de D-glicose, não foram observadas diferenças nos grupos estimulados somente com o peptídeo LL-37 e nos grupos adicionados de 5,5 mM de D-glicose (Figura 7A e B). Contudo, a viabilidade se manteve e apresentou um aumento de pelo menos 100% no grupo estimulado com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose, comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 7C); nos grupos estimulados apenas com 12 mM de D-glicose e com 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ) (Figura 7D); e nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose e com 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,01$ ). No entanto, foi observada uma diminuição na viabilidade celular no grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose, quando comparado aos demais grupos estimulados com o peptídeo, exceto os grupos com 16 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Contudo, estes grupos permaneceram com uma viabilidade acima de 100% em comparação com o respectivo grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 7E).

Ao se adicionar o LPS nas culturas, nos grupos estimulados com 5,5 mM de D-glicose houve uma alta da viabilidade na presença dos estímulos de D-glicose, LPS e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) e 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,01$ ), mantendo uma viabilidade acima de 100%, quando comparados ao grupo controle. Já os grupos contendo 8, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 sofreram uma redução na viabilidade quando comparados ao grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, sendo que os dois primeiros mantiveram a viabilidade em torno de 100% ( $p < 0,01$ ). Já os grupos 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, apresentaram viabilidade diminuída, 87% e 78%, respectivamente, ambos comparados com o grupo estimulado por 5,5 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,001$ ) e com o grupo estimulado com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5,5 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,01$ ) (Figura 7F). Nos grupos

estimulados com 8 mM de D-glicose e LPS, houve uma alta na viabilidade do grupo estimulado com 8 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,001$ ) e no grupo com  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ), ambos atingindo mais que o dobro da viabilidade do grupo controle, representado pelas células RAW. Também houve uma diminuição na viabilidade do grupo contendo  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, comparado com o grupo contendo  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, chegando a uma viabilidade de apenas 17% ( $p < 0,01$ ) (Figura 7G). Observou-se uma alta da viabilidade no grupo estimulado apenas com LPS, no grupo contendo  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,05$ ) e no grupo estimulado apenas com 12 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,01$ ) (Figura 7H). Nos grupos estimulados por 24 mM de D-glicose e LPS, houve um aumento de mais de 100% na viabilidade dos grupos contendo  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) e  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo controle. E uma diminuição de viabilidade do grupo contendo  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, chegando a 61%, quando comparado ao grupo com  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 7I).

Ao se adicionar os estímulos de LPS e rIFN- $\gamma$  às diferentes concentrações de D-glicose, nos grupos estimulados com 5 mM de D-glicose, houve um aumento em torno de 100% da viabilidade nos grupos estimulados somente com LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ) e no grupo com  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ), comparados com o grupo controle (Figura 7J). Na presença de 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  todos os grupos mantiveram a viabilidade celular em 100%, exceto o grupo estimulado por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 7K). Já os grupos estimulados por 12 e 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  permaneceram com a sua viabilidade acima de 100%, exceto pelos grupos estimulados apenas com LPS e rIFN- $\gamma$  que permitiram aumento na viabilidade quando comparado ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ) (Figuras 7L e M)<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (D, E, G e H), comparado com o grupo estimulado por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C), por 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por LPS/rIFN- $\gamma$  (J, L e M) e por 8 mM de D-glicose, LPS/rIFN- $\gamma$  (K), # comparado com o grupo estimulado por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (I) e por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose, LPS/rIFN- $\gamma$  (J), • comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E); ( $p < 0,01$ ) foi representado por \*\* comparado com o grupo controle de células RAW (E, H e I), com o grupo estimulado por  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 mM de D-glicose (F) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (L); ° comparado com o grupo controle de células RAW (F), com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E), por 8 mM de D-glicose e LPS (G) e por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (I), ■ comparado com o grupo estimulado por  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 mM de D-glicose (F), por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (G) e por 16

---

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (I); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por  $\blacklozenge$  comparado com o grupo controle de células RAW (F), com o grupo estimulado por  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (I),  $\square$  com o grupo estimulado por 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (G) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (J).

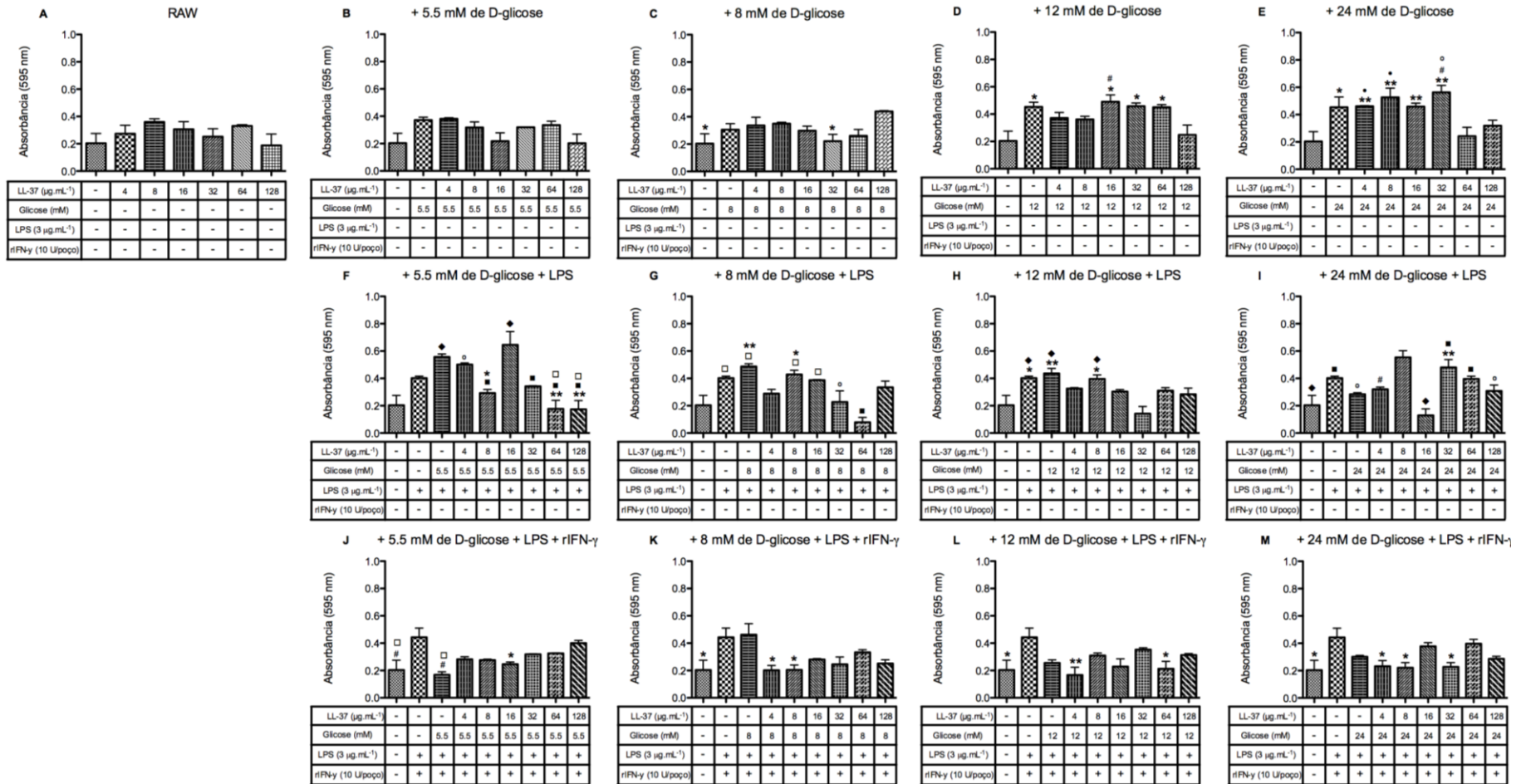


Figura 7 – Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg.mL<sup>-1</sup>) associadas a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3 µg.mL<sup>-1</sup>) (F-I) com e sem rIFN-γ (10 U.mL<sup>-1</sup>) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.1.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6

A avaliação da produção de IL-6 foi um dos parâmetros utilizados para determinar o potencial imunomodulador dos peptídeos. Desta forma, quando as culturas foram estimuladas somente com as diferentes concentrações do peptídeo LL-37 houve uma diminuição da produção de IL-6 nos grupos contendo 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, quando comparado com o grupo estimulado com 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 8A). Ao se adicionar 5,5 mM de D-glicose às culturas, houve uma diminuição na produção de IL-6 nos grupos estimulados com 32, 64 ( $p < 0,01$ ) e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle de células RAW (Figura 8B). De forma semelhante, ao se adicionar 8 mM de D-glicose, houve uma diminuição na produção de IL-6 nos grupos contendo 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 8C). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose, apenas o grupo contendo 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo foi capaz de diminuir a produção de IL-6, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos mantiveram a produção de IL-6 em níveis basais (Figura 8D). Já nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose não houve mudança no perfil de produção de IL-6, todos os grupos mantiveram níveis semelhantes de IL-6 (Figura 8E).

Ao se adicionar LPS juntamente com as diferentes concentrações de D-glicose, houveram discretos aumentos na produção de IL-6. Nos grupos estimulados por 5,5 mM de D-glicose e LPS, os aumentos foram percebidos somente na presença do LPS ou quando estimulados por 4, 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, em comparação ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ) (Figura 8F). Nos grupos estimulados por 8 mM de D-glicose e LPS, houve uma diminuição de IL-6 nos grupos com 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, quando comparado ao grupo estimulado com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) (Figura 8G). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS, a produção de IL-6 se elevou nos grupos com somente 12 mM de D-glicose, 4 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 8H). Já nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose e LPS, o único grupo que apresentou aumento significativo comparado ao grupo controle foi o grupo que contém 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ) (Figura 8I).

Entretanto, na presença dos estímulos imuno/inflamatórios representados pelo LPS e rIFN- $\gamma$ , os aumentos na produção de IL-6 foram mais expressivos, atingindo um pico de aproximadamente 14000 pg.mL<sup>-1</sup>. Nos grupos estimulados por 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  todos os grupos sofreram aumento na produção de IL-6, mantendo o mesmo nível de produção por volta de 10000 pg.mL<sup>-1</sup>, quando comparados ao grupo controle representado por células RAW (p<0,001) (Figura 8J). Assim como nos grupos com 5,5 mM de D-glicose, quando estimulados com 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , todos os grupos sofreram aumento na produção de IL-6, em comparação ao grupo controle (p<0,01 e p<0,001) (Figura 8K). Nos grupos estimulados por 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , todos os grupos aumentaram a produção de IL-6 em comparação ao grupo controle, exceto o grupo contendo 16  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37 (p<0,05, p<0,01 e p<0,001) (Figura 8L). Já nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , somente os grupos com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e adicionados de 4, 8 e 16  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37 obtiveram aumento na produção de IL-6 quando comparado ao grupo controle (p<0,05 e p<0,01) (Figura 8M)<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> (p<0,05) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (B, D, F, H, I e L) e com o grupo estimulado por 8  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37 (A), # comparado com o grupo controle de células RAW (M), com o grupo estimulado por LPS (F) e por 4  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (G) e ° com o grupo estimulado por 4  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose e LPS (F); (p<0,01) foi representado por ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (B, C, K e L), com o grupo estimulado por 8  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37 (A) e por 4  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (G), □ comparado com o grupo controle de células RAW (M), com o grupo estimulado por 5 mM de D-glicose (B), por 8 mM de D-glicose (C) e por 8  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (G); e (p<0,001) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (G, J, K e L), com o grupo estimulado por 5 mM de D-glicose (B), por 8 mM de D-glicose (C) e por 128  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D).

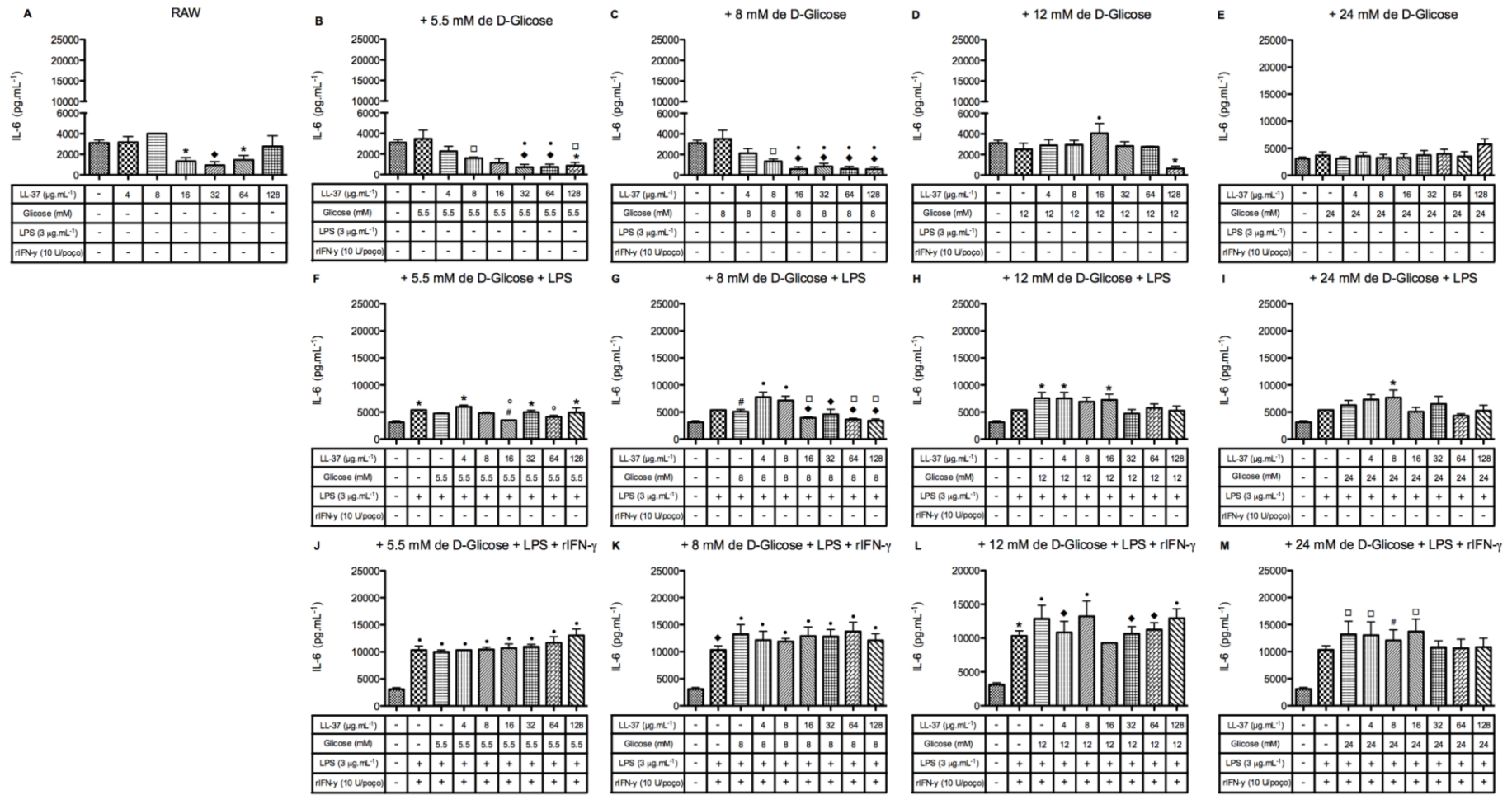


Figura 8 – Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.



### 5.2.1.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  foi outra citocina analisada como parâmetro para determinar o potencial imunomodulador dos peptídeos. Nos grupos estimulados apenas com as diferentes concentrações do peptídeo LL-37, houve aumento da produção de TNF- $\alpha$  apenas no grupo contendo 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, quando comparado com os grupos contendo 4, 8, 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 9A). Nos grupos onde foram acrescentados 5,5 mM de D-glicose e o peptídeo (nas concentrações 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ocorreu uma leve diminuição na produção do TNF- $\alpha$ , quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 9B). Quando adicionado 8 mM de D-glicose, houve uma diminuição na produção da citocina somente nos grupos com 4 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,001$ ), em comparação ao grupo na ausência de estímulo (Figura 9C). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose, os grupos contendo 8, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 foram os que sofreram diminuição na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 9D). Já nos grupos que sofreram acréscimos de 24 mM de D-glicose e as concentrações de 4, 8 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 apresentaram redução de TNF- $\alpha$  quando comparados aos grupos estimulados com somente 24 mM de D-glicose e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,05$ ) (Figura 9E). Quando adicionado LPS às culturas, somente o grupo contendo 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, 5,5 mM de D-glicose e LPS sofreu uma leve diminuição quando comparado aos grupos estimulados com LPS, 5,5 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 9F). Todos os demais grupos apresentaram uma produção de TNF- $\alpha$  semelhante à produção dos grupos controles (Figuras 9G, H e I). Na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ , todos os grupos estimulados com 5,5 mM de D-glicose, além do grupo estimulado apenas com LPS e rIFN- $\gamma$ , apresentaram aumento na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 9J). O padrão se manteve nos grupos estimulados também com 12 e 24 mM de D-glicose ( $p < 0,001$ ) (Figuras 9K e L). Em especial no grupo contendo estímulo de 24 mM de D-glicose, todos os grupos aumentaram a produção de TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo controle

de células RAW ( $p < 0,01$ ), com exceção do grupo contendo  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 que manteve uma produção basal desta citocina (Figura 9M)<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (B), com o grupo estimulado por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 (A), por  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C), por 12 mM de D-glicose (D), por 24 mM de D-glicose (E) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (L), # comparado com o grupo controle de células RAW (J), com o grupo estimulado por 5 mM de D-glicose (B) e por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E) e ° comparado com o grupo estimulado por  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5 mM de D-glicose (B) e por  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose e LPS (F); ( $p < 0,01$ ) foi representado por ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (D, J e M); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (A, C, K e L) e ■ comparado com o grupo estimulado por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 (A) e por 8 mM de D-glicose (C).

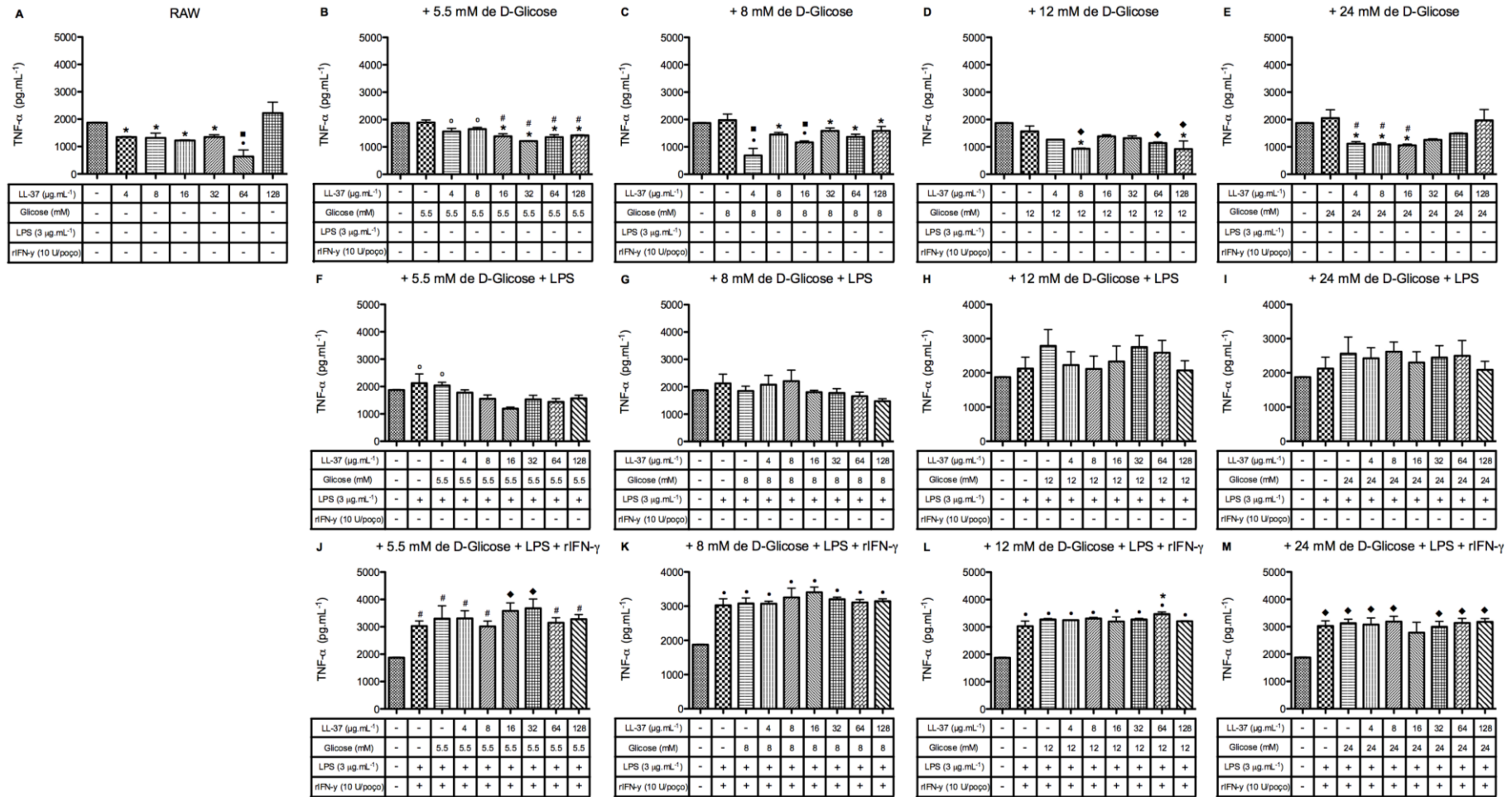


Figura 9 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

#### 5.2.1.4 Produção de óxido nítrico (NO)

Ao se verificar a produção de NO nos grupos estimulados somente com diferentes concentrações de LL-37 e nos grupos estimulados com 5,5 mM de D-glicose e diferentes concentrações de LL-37, não houve alteração na produção deste mediador (Figuras 10A e B). Nos grupos adicionados de 8 mM de D-glicose, o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose aumentou a produção desta citocina em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose, os grupos contendo 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, apresentaram maior produção de NO quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 10D). Nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, apenas os grupos contendo apenas 24 mM de D-glicose e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo com 24 mM de D-glicose apresentaram produção maior do que o grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 10E).

Quando adicionou-se o LPS às culturas, apenas o grupo estimulado com 5,5 mM de D-glicose e LPS apresentou um aumento na produção de NO, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10F). Os grupos estimulados com 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, na presença de 8 mM de D-glicose e LPS demonstraram aumento de NO, comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 10G). Na presença de 12 mM de D-glicose e LPS, os grupos que apresentaram aumento de NO foram os grupos estimulados com 8 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 10H). Já na presença de 24 mM de D-glicose e LPS, houve um aumento na produção de NO nos grupos estimulados apenas com 24 mM de D-glicose e LPS, contendo 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,05$ ) e contendo 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 10I).

Ao se adicionar LPS e rIFN- $\gamma$  às diferentes concentrações de D-glicose, nos grupos contendo 5,5 e 8 mM, todos os grupos sofreram grandes aumentos na produção de NO, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) (Figuras 10J e K). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose, os grupos com maiores produções quando comparados ao grupo controle foram os estimulados somente com LPS e rIFN- $\gamma$ , estimulado com 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , 8 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo e estimulado com 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 10L). Já nos grupos contendo 24 mM, apenas os grupos com 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo

apresentaram níveis basais de produção de NO. Os demais grupos apresentaram aumento na produção de NO quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 10M)<sup>9</sup>.

---

<sup>9</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (G, I, J e M), com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose (C), por 24 mM de D-glicose (E), por 5 mM de D-glicose e LPS (F) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose, LPS/rIFN- $\gamma$  (L), # comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), ° comparado com o grupo controle de células RAW (K e L), com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C) e por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M); ( $p < 0,01$ ) foi representado por ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (H e L), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (I); □ comparado com o grupo controle de células RAW (M) e com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (E, K e M) e com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), e ■ comparado com o grupo controle de células RAW (I e J) e com o grupo estimulado por 24 mM de D-glicose (E).

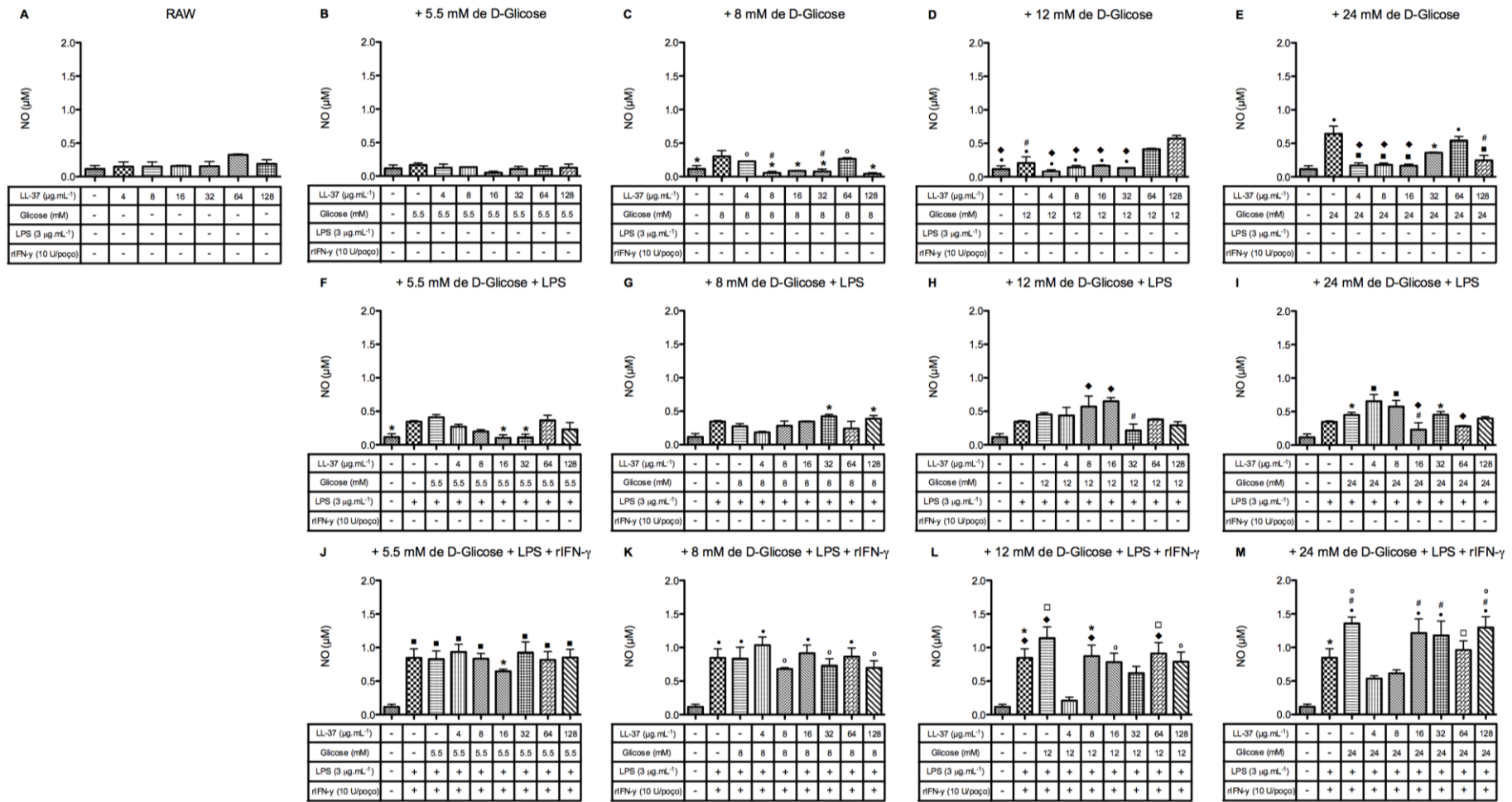


Figura 10 – Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo LL-37 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL<sup>-1</sup>) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

## 5.2.2 Peptídeo IDR-1018

### 5.2.2.1 Viabilidade celular

Para o peptídeo IDR-1018 o padrão da viabilidade celular se manteve em torno dos 100%, diminuindo somente em alguns poucos grupos. Nos grupos estimulados com as diferentes concentrações do peptídeo, o grupo contendo 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentou um aumento de 31%, enquanto que o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo reduziu a viabilidade em 54%, ambos comparados ao grupo controle com 100% ( $p < 0,01$ ) (Figura 11A). Ao se adicionar 5,5 mM de D-glicose às culturas, o padrão se manteve o mesmo de quando estimuladas somente com o peptídeo, onde o grupo contendo 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 mais a glicose aumentou a viabilidade em 38% e o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo reduziu para 46% de viabilidade, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 11B). Já nas culturas com a adição de 8 mM de D-glicose, os grupos contendo 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentaram um aumento de 21% na viabilidade celular e os grupos com 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram uma diminuição em torno de 50% na viabilidade, todos comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 11C). Ao se adicionar 12 mM de D-glicose, a viabilidade celular se manteve em todos os grupos exceto no grupo estimulado com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 que apresentou uma queda de 51% na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 11D). Já nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose houve uma queda na viabilidade apenas no grupo estimulado com D-glicose (com viabilidade de 54%), entretanto, o grupo contendo 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentou um aumento de 48% na viabilidade, ambos comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos apresentaram viabilidade celular semelhante a do grupo controle (Figura 11E).

Ao se adicionar LPS nas culturas estimuladas com as diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018, 5,5 e 8 mM de D-glicose, apenas os grupos contendo 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram redução de viabilidade, com 67% em 5,5 mM e 53% em 8 mM e 36% em 5,5 mM e 58% em 8 mM, respectivamente, comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figuras 11F e G). Já nos

grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS, os grupos que apresentaram redução na viabilidade celular foram os grupos contendo 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, apresentando 59% e 55%, respectivamente, comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 11H). E nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose e LPS, apenas os grupos com 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo sofreram redução na viabilidade celular, apresentando 60% e 52%, respectivamente, comparados ao grupo controle com 100% ( $p < 0,05$ ) (Figura 11I).

Ao se adicionar LPS e rIFN- $\gamma$ , o grupo estimulado com 5,5 mM de D-glicose manteve o mesmo padrão de redução, onde somente os grupos com 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentaram diminuição, com 56% e 51%, respectivamente, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 11J). Entretanto, nos grupos estimulados por 8 mM de D-glicose todos os grupos mantiveram a viabilidade e somente o grupo com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentou aumento de 37% na viabilidade, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 11K). Já nos grupos acrescentados tanto com 12 quanto 24 mM de D-glicose, apenas o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentou redução na viabilidade, com 48% e 52%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figuras 11L e M)<sup>10</sup>.

<sup>10</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (C), com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 24 mM de D-glicose (E), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por LPS (I), por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K), # comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (E), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e ° comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e □ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C); ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (J), com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), ♦ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A); ( $p < 0,001$ ) representado por ■ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G); e ( $p < 0,001$ ) representado por \*\* comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G).



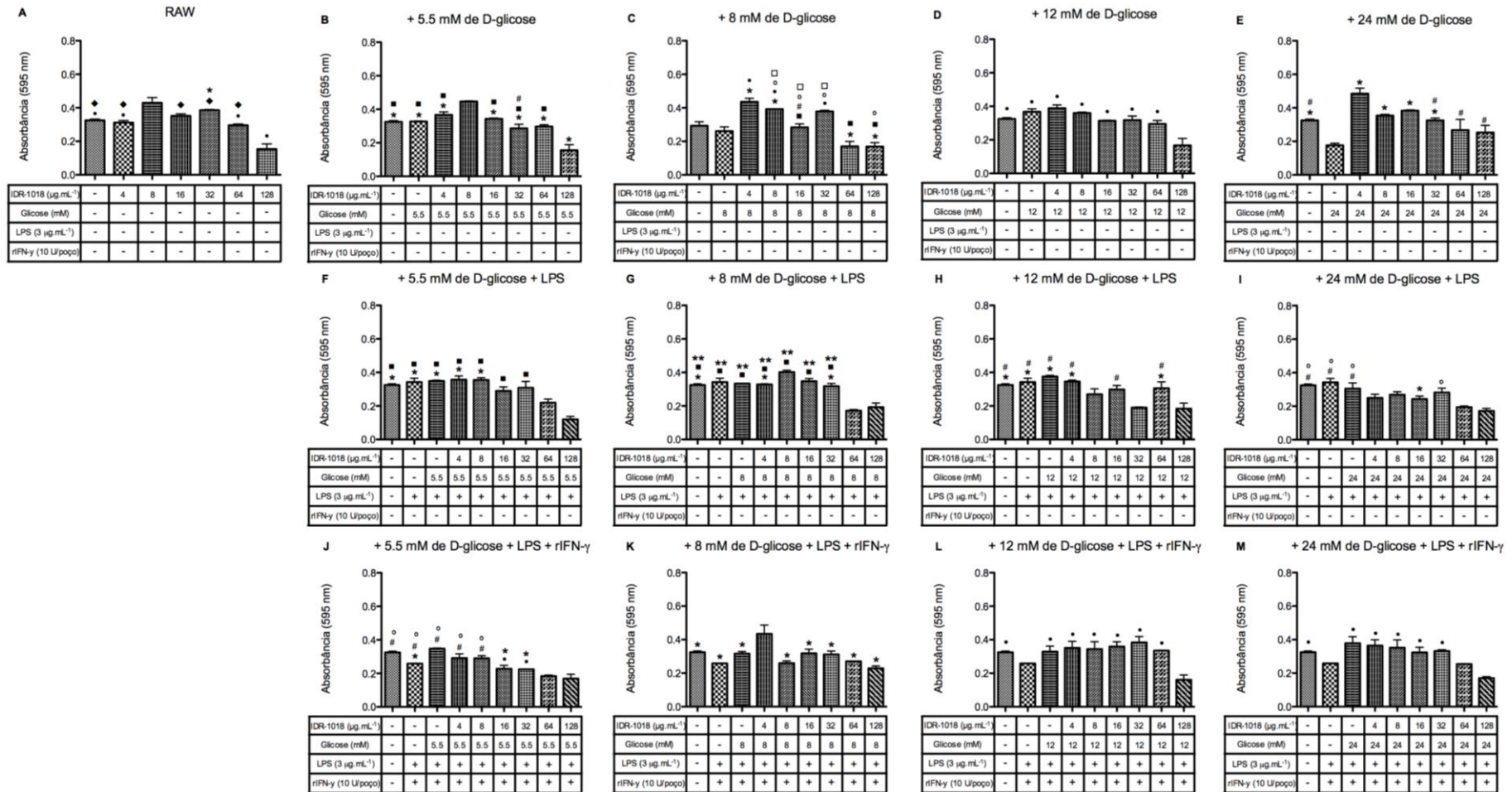


Figura 11 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.2.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6

A produção de IL-6 na presença do peptídeo IDR-1018 manteve o mesmo padrão de produção mediante todos os estímulos. Nas condições de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 com ou sem D-glicose (5,5, 8, 12 e 24 mM), todos os grupos contendo 64 ou 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentaram aumento na produção de IL-6, quando comparados aos grupos controles ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figuras 12A, B, C, D e E). Ao se adicionar o LPS aos estímulos do peptídeo e D-glicoses (5,5, 8, 12 e 24 mM), o padrão de produção de IL-6 se manteve semelhante, onde somente os grupos contendo 64 ou 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 aumentaram a produção de IL-6, sendo que no grupo com 24 mM de D-glicose o aumento ocorreu somente no grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  deste peptídeo. Estes aumentos foram observados em comparação com os grupos controles ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figuras 12F, G, H e I). O mesmo foi observado nos grupos com adição de LPS e rIFN- $\gamma$ , onde somente os grupos contendo 64 ou 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 aumentaram a produção de IL-6, quando comparados ao grupo controle, exceto nos grupos com 24 mM de D-glicose, onde a produção de IL-6 permaneceu em níveis basais ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) (Figuras 12J, K, L e M). Contudo, na presença de 8 mM de D-glicose, LPS, rIFN- $\gamma$  e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, a produção de IL-6 foi nula ( $p < 0,05$ ) (Figura 12K)<sup>11</sup>.

<sup>11</sup>( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), # comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), ° comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D) e por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e \*\* comparado com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D), ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), ♦ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H); ( $p < 0,001$ ) foi representado por ■ comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (E), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e □ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

---

do peptídeo IDR-1018 e 2de D-glicose (E), por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L).

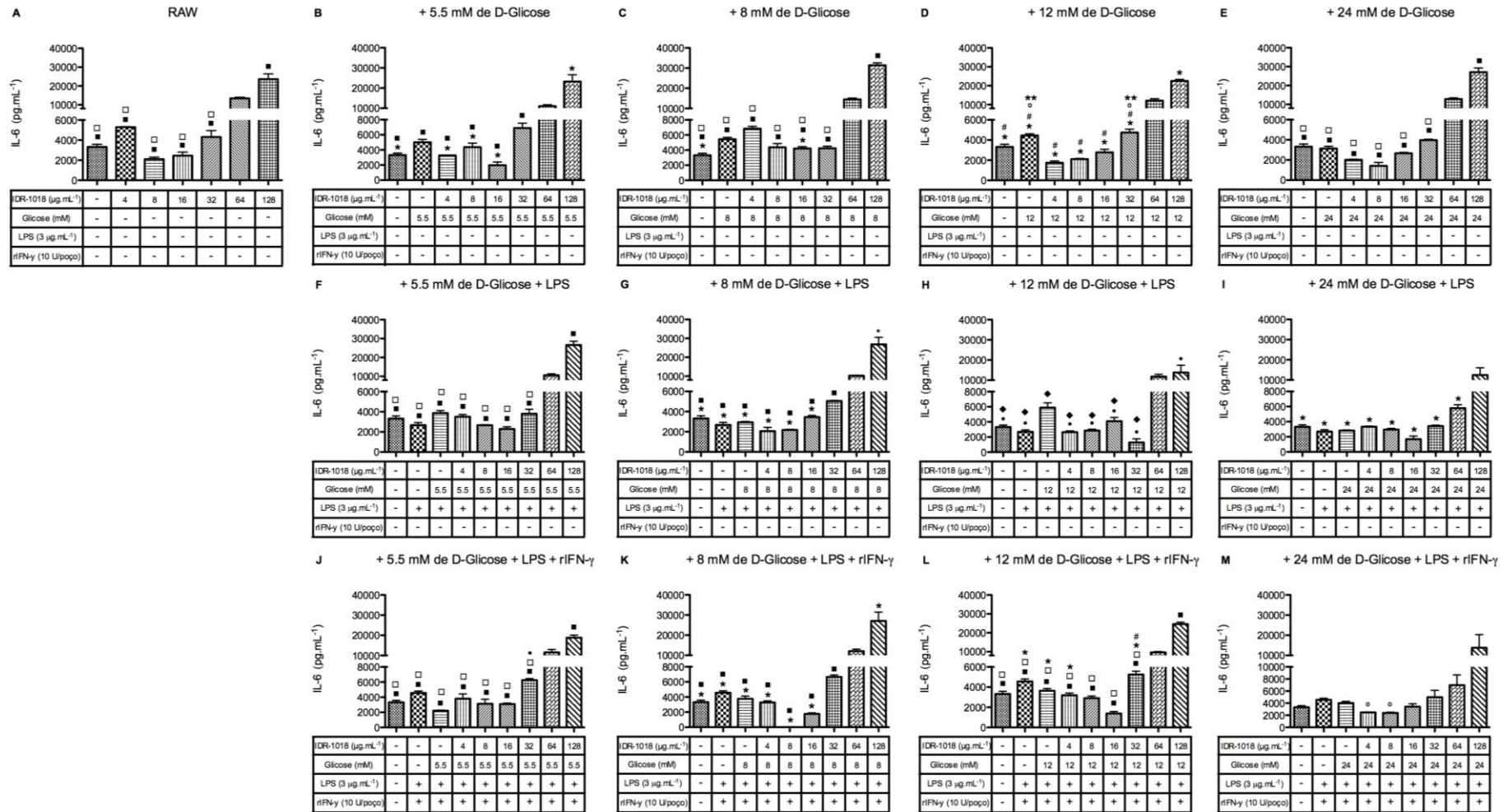


Figura 12 - Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio padrão de uma réplica biológica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.2.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$

Na ausência de glicose, todas as concentrações do peptídeo IDR-1018 foram capazes de diminuir a produção de TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 13A). Quando adicionado 5,5 mM de D-glicose às diferentes concentrações do peptídeo, todos os grupos contendo peptídeo apresentaram redução de TNF- $\alpha$ , comparados ao grupo controle, exceto no grupo com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de peptídeo ( $p < 0,001$ ) (Figura 13B). O grupo estimulado com 8 mM de D-glicose, assim como os grupos com 8 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose apresentaram leve redução na produção de TNF- $\alpha$ , enquanto que os grupos com 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo a redução foi maior, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 13C). Na presença de 12 mM de D-glicose, apenas os grupos contendo as diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 13D). Assim como nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, além dos grupos estimulados com o peptídeo, o grupo estimulado com glicose apresentou redução na produção de TNF- $\alpha$ , todos comparados com o grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 13E). Ao se adicionar LPS nas culturas estimuladas com 5,5 mM de D-glicose, todos os grupos contendo peptídeo IDR-1018 apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 13F). Ao se adicionar 8 mM de D-glicose, todos os grupos apresentaram redução de TNF- $\alpha$ , inclusive os grupos estimulados apenas com LPS e glicose, quando comparados ao grupo controle, exceto o grupo com 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) (Figura 13G). Com 12 mM de D-glicose, os grupos contendo somente LPS ou as diferentes concentrações do peptídeo com glicose e LPS sofreram redução na produção de TNF- $\alpha$ , em comparação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 13H). Nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, apenas o grupo contendo 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 não apresentou redução na produção de TNF- $\alpha$ , em comparação ao grupo controle, sendo a menor produção da citocina, no grupo com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) (Figura 13I). Ao se adicionar LPS e rIFN- $\gamma$  às culturas contendo 5,5 mM de D-glicose, o único grupo que apresentou uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$  foi o grupo estimulado apenas com glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 13J). Enquanto nos grupos com 8 mM de D-glicose, todos os grupos apresentaram ligeira redução

de TNF- $\alpha$ , exceto o grupo estimulado somente com a glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 13K). Os grupos estimulados somente com LPS e rIFN- $\gamma$ , 12 mM de D-glicose e este grupo com 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentaram leves diminuições na produção de TNF- $\alpha$ . Enquanto que os grupos com 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram maior diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 13L). Já nos grupos com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , somente o grupo com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentou redução significativa da produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 13M)<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (C, F, K e L), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A) por 5,5 mM de D-glicose (B), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por LPS (H), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (M), # comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), \*\* comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K); ( $p < 0,01$ ) foi representado por ° comparado com o grupo controle de células RAW (A, G e I), com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (D), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (E), por 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e # # comparado com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (G) e por com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (B, D, E e H), com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e com o grupo estimulado por LPS/rIFN- $\gamma$  (L), ♦ comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 12 mM de D-glicose (D), por 24 mM de D-glicose (E), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), ■ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (C), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (E) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e □ comparado com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (E) e por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L).



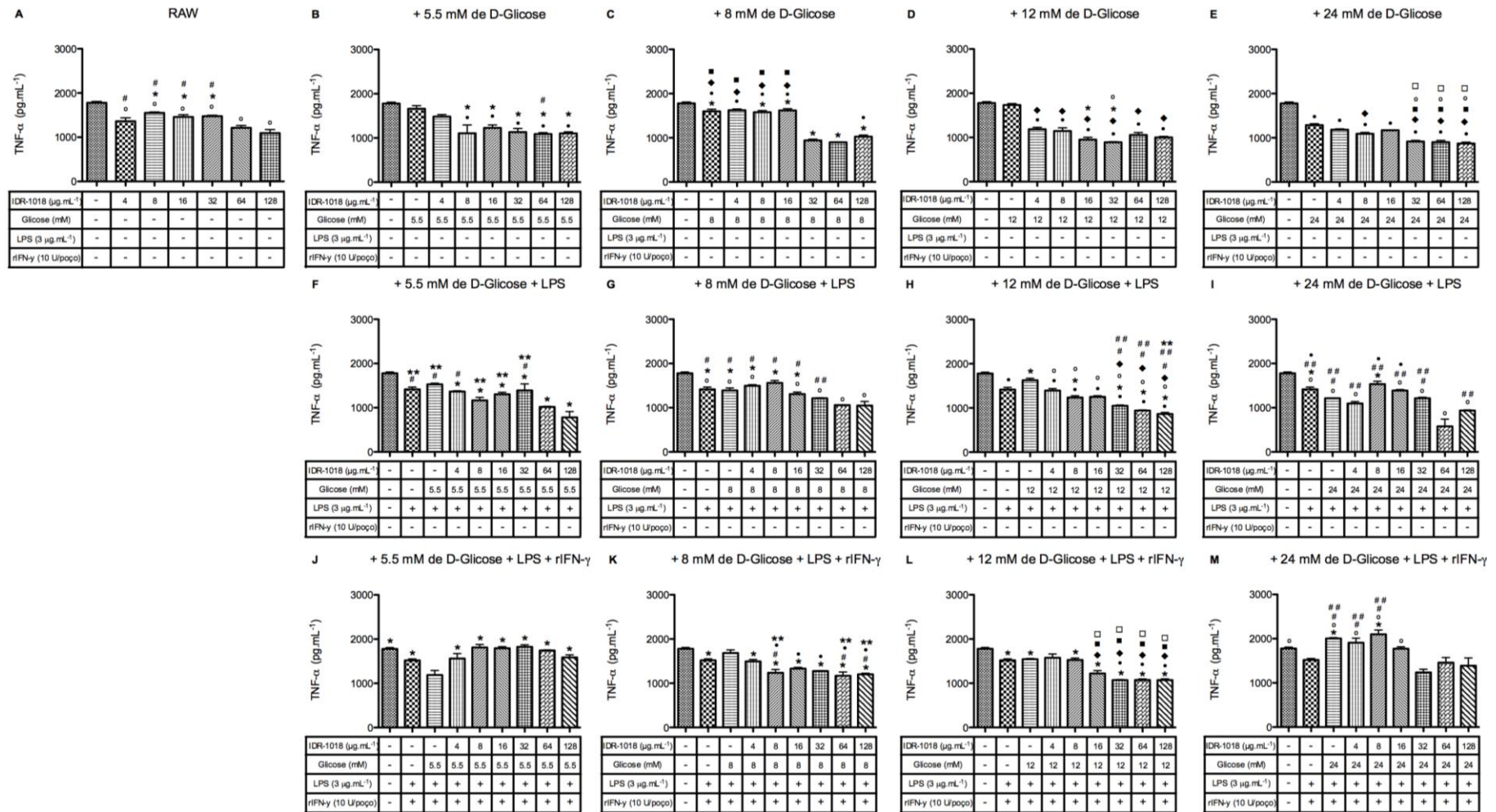


Figura 13 - Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio padrão de uma réplica biológica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

#### 5.2.2.4 Produção de óxido nítrico (NO)

Apesar das discretas alterações na produção de NO, na presença das diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018, das diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , nenhum grupo apresentou diferença significativamente estatística, quando comparados ao grupo controle ou mesmo quando comparados entre si (Figura 14).



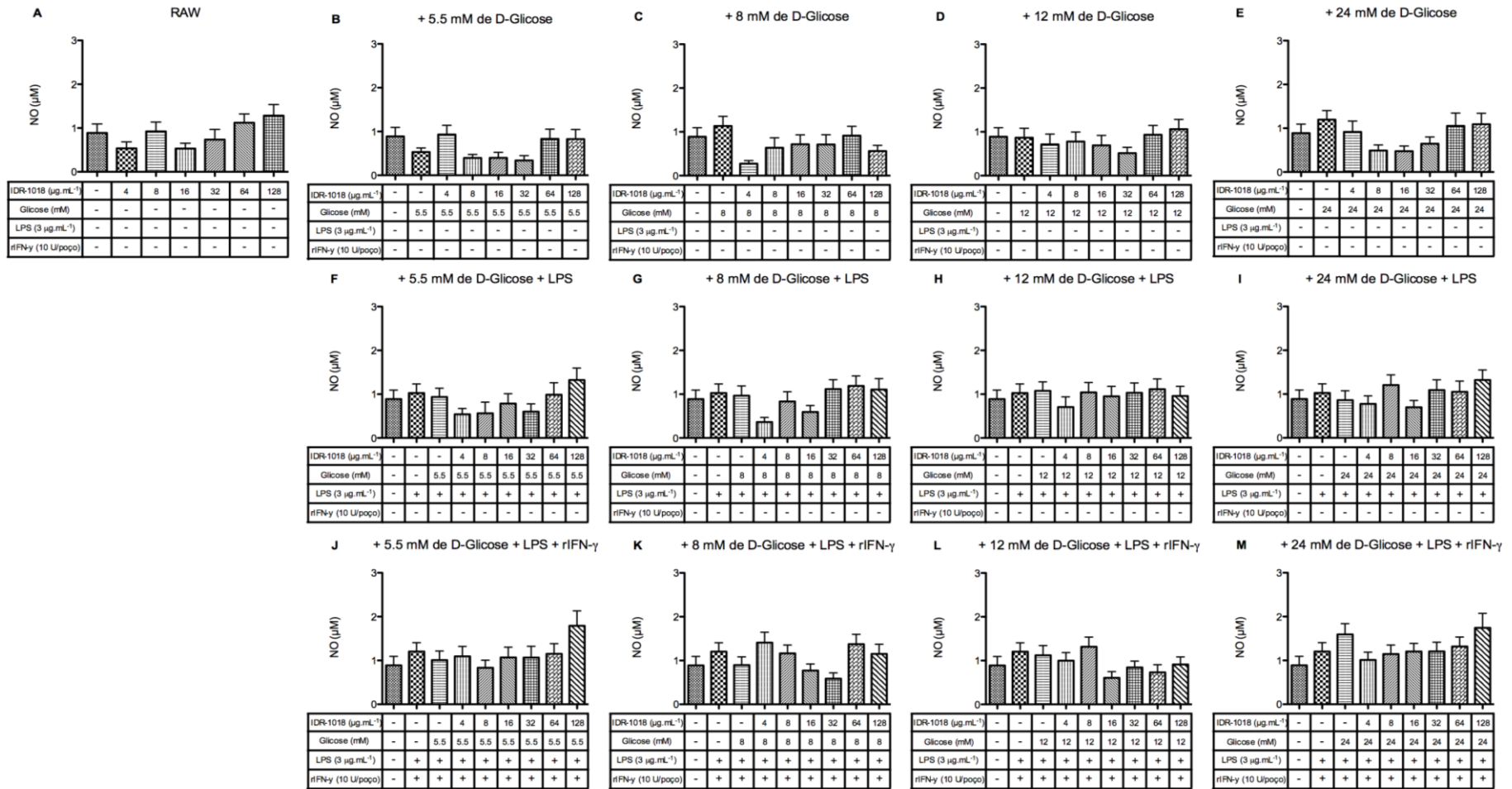


Figura 14 - Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10  $\text{U.mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Não houveram diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.3 Peptídeo IDR-1002

#### 5.2.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos grupos estimulados com o peptídeo IDR-1002 manteve um padrão positivo, onde poucos grupos apresentaram alterações. Quando as culturas foram estimuladas apenas com as diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002, somente o grupo com  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou uma queda na viabilidade, com 21%, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 15A). Quando adicionado 5,5 mM de D-glicose às culturas na presença do peptídeo, apenas o grupo com  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou redução de 25% da viabilidade, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15B). Os grupos estimulados com 4, 64 e  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 8 mM de D-glicose apresentaram leve redução na viabilidade, com uma queda de 23%, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15C). Nos grupos com 12 mM de D-glicose, os grupos que apresentaram redução de viabilidade foram os grupos com 4, 16 e  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 15D). E quando estimulados com 24 mM de D-glicose, somente o grupo com  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentou uma diminuição de 31% da viabilidade em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15E).

Ao se adicionar o estímulo de LPS as culturas, apenas o grupo com  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, na presença de 5,5 mM de D-glicose e LPS, apresentou leve diminuição na viabilidade quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15F). Na presença de 8 mM de D-glicose e LPS, os grupos estimulados com glicose, LPS e 4, 8, 64 e  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e os grupo estimulado apenas com glicose e LPS apresentaram leve queda de 29% na viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15G). Quando adicionados 12 mM de D-glicose e LPS, os grupos estimulados somente com glicose, LPS e 4, 8 e  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e o grupo estimulado apenas com glicose e LPS apresentaram leves reduções na viabilidade celular, contudo, somente em relação ao grupo estimulado com LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 15H). Já na presença de 24 mM de D-glicose e LPS, somente o grupo estimulado com LPS e o grupo contendo 128

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram redução de 27% de viabilidade, em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15I).

Quanto a adição de LPS e rIFN- $\gamma$  nas culturas, nenhum grupo sofreu alteração na viabilidade celular estatisticamente significativa, apenas o grupo com  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , em relação ao grupo com  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 ( $p < 0,05$ ) (Figuras 15J, K, L e M)<sup>13</sup>.

---

<sup>13</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (C, G e I), com o grupo estimulado por  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 5,5 mM de D-glicose (B), por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 24 mM de D-glicose (E), por LPS (F e H) e por  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 5,5 mM de D-glicose e LPS (J), # comparado com o grupo controle de células RAW (B), com o grupo estimulado por  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 8 mM de D-glicose (C) e por LPS (G e I), • comparado com o grupo estimulado por  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 8 mM de D-glicose (G) e por 24 mM de D-glicose e LPS (I), e ■ comparado com o grupo estimulado por  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I); e ( $p < 0,01$ ) foi representado por ° comparado com o grupo controle de células RAW (D) e com o grupo estimulado por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 (A), por 8 mM de D-glicose (C) e por  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I).

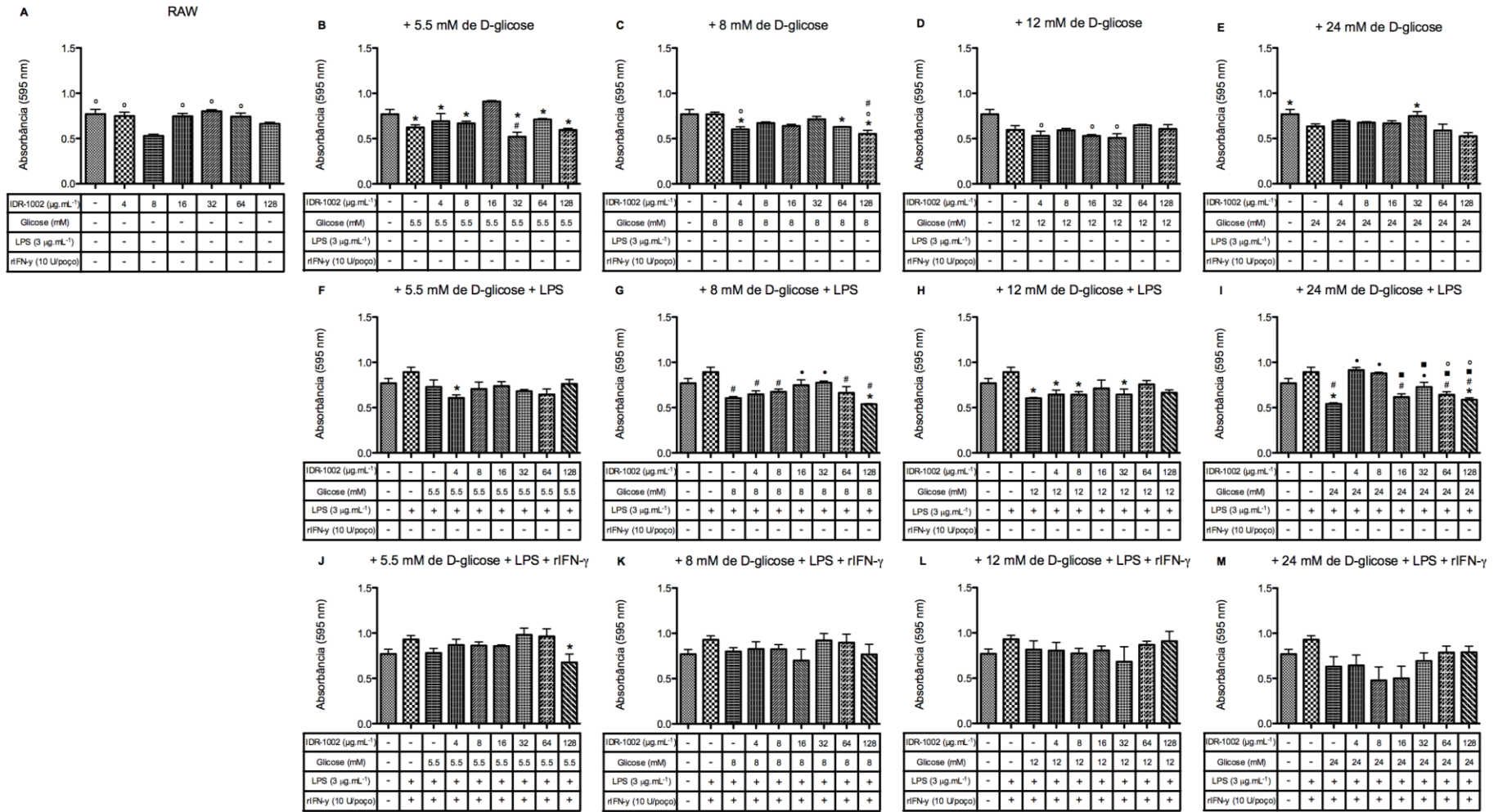


Figura 15 - Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL<sup>-1</sup>) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste one-way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.3.2 Produção de óxido nítrico (NO)

Relacionado à produção de NO, os grupos estimulados com 4, 8 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram redução quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 16A). Já nos grupos onde foram adicionados 5,5 mM de D-glicose, além das diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002, o grupo estimulado apenas com glicose e os grupos com 16 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e glicose apresentaram redução na produção de NO, chegando a uma produção quase nula, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O grupo com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo e 5,5 mM de D-glicose apresentou um aumento quando comparado aos outros grupos estimulados com o peptídeo, contudo não houve diferença estatística quando comparado ao grupo controle (Figura 16B). Na presença de 8 mM de D-glicose, apenas os grupos com 8 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle, com uma produção nula de NO ( $p < 0,01$ ) (Figura 16C). Com 12 mM de D-glicose, apenas o grupo com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 reduziu a produção de NO em comparação com o grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ) (Figura 16D). E com o estímulo de 24 mM de D-glicose nenhum grupo apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, contudo, os grupos com 8 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram redução na produção de NO quando comparados ao grupo estimulado somente com 24 mM de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (Figura 16E).

Quando o LPS foi adicionado às culturas contendo 5,5 mM de D-glicose e as diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002, os grupos estimulados apenas com a glicose e o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo aumentaram a produção de NO, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, os grupos com 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram redução de NO quando comparados ao grupo estimulado somente com LPS ( $p < 0,01$ ) (Figura 16F). Em relação ao grupo controle, o grupo estimulado apenas com LPS e o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 8 mM de D-glicose e LPS apresentaram aumento na produção de NO, enquanto nos grupos com 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 8 mM de D-glicose e LPS houve uma diminuição na produção de NO ( $p < 0,01$ ) (Figura 16G). Nos grupos adicionados de 12 mM de D-glicose e LPS nenhum grupo apresentou diferença estatística comparado com o grupo controle. Desta forma, os grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS

e 4, 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 12 mM de D-glicose e LPS apresentaram redução na produção de NO em comparação ao grupo estimulado somente com LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 16H). Já nos grupos estimulados com 24 mM de D-glicose e LPS, os que continham 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram aumento na produção de NO, em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 16I). Em relação ao grupo controle, nenhum grupo apresentou diferença estatística, apenas o grupo estimulado com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  aumentou a produção de NO em relação ao grupo estimulado com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 16J). Apenas os grupos estimulados com 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e o grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram aumento na produção de NO, comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os grupos com 8 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram redução de NO, contudo, em comparação com o grupo estimulado com LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 16K). Na presença dos estímulos de 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  nenhum grupo apresentou diferença estatística quando comparados ao grupo controle de células RAW. Entretanto, os grupos com 4, 16 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 apresentaram redução na produção de NO quando comparados ao grupo estimulado somente com 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 16L). Por último, o grupo estimulado apenas com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e o grupo com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 foram os únicos grupos que apresentaram aumento na produção de NO, em comparação com o grupo controle de células sem estímulos ( $p < 0,05$ ) (Figura 16M)<sup>14</sup>. Em função dos resultados acima,

<sup>14</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (B, D, F, I, K e M), com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 (A), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 8 mM de D-glicose (C), por 24 mM de D-glicose (E), por 8 mM de D-glicose e LPS (G), por LPS (H), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), # comparado com o grupo estimulado por 12 mM de D-glicose (D), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 24 mM de D-glicose (E), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e ° comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L); ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (C e G), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 (A), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002 e 12 mM de D-glicose (D), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e ◆ comparado com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K); ( $p < 0,001$ ) foi representado por ■ comparado com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose (C), por LPS (F e G), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e □ comparado com o grupo estimulado por 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1002, 8 mM de D-glicose

as análises da produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  não foram prosseguidas e o peptídeo foi descartado da seleção.

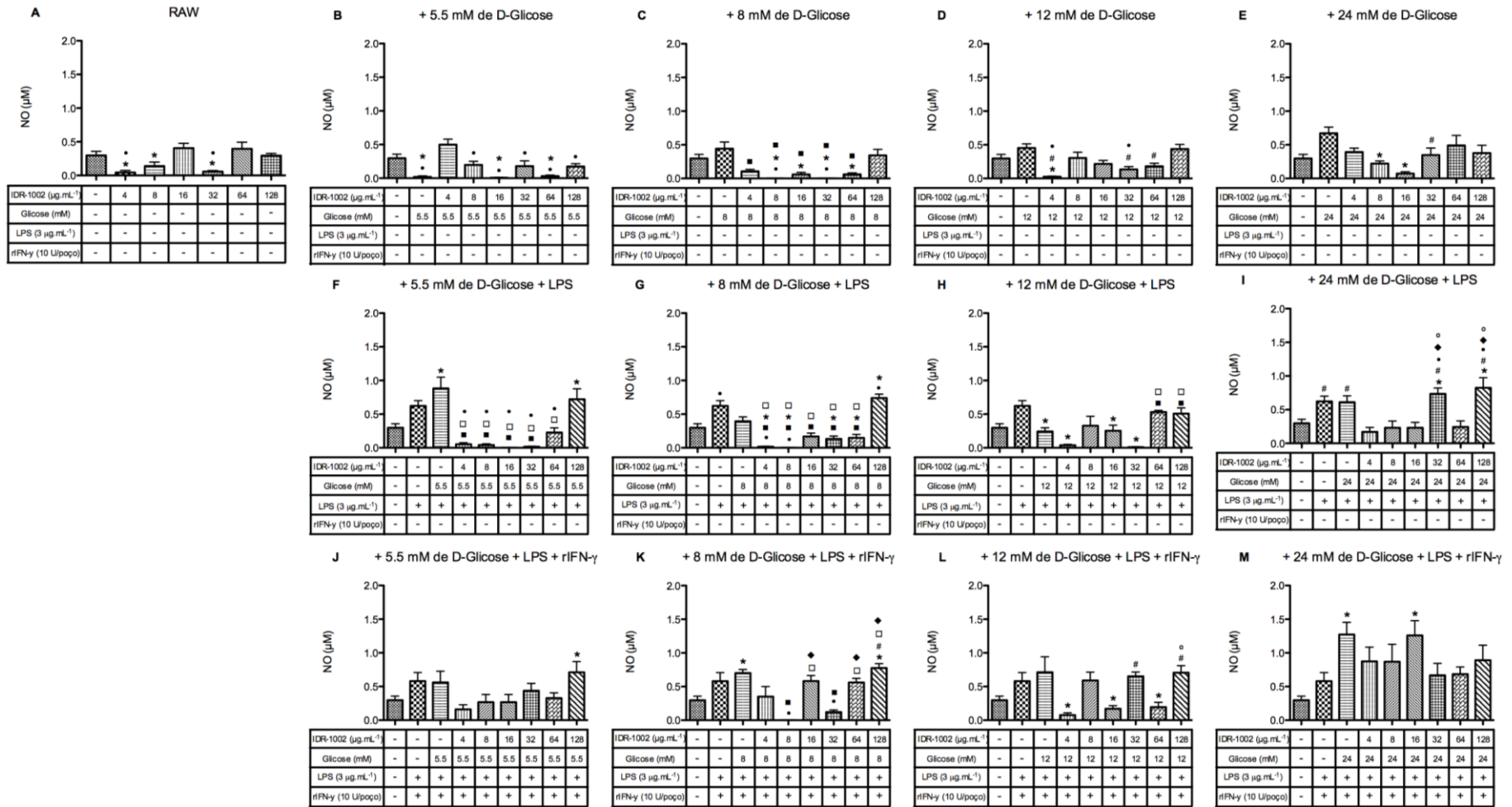


Figura 16 - Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo IDR-1002 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U $\mu\text{L}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e erro-padrão de duas réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.



## 5.2.4 Peptídeo DJK-6

### 5.2.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas na presença do peptídeo DJK-6 não sofreu grandes alterações. Nos grupos estimulados apenas com as diferentes concentrações do peptídeo, apenas os grupos contendo 8 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram uma viabilidade maior que a do grupo controle, os demais grupos mantiveram sua viabilidade em torno dos 100% ( $p < 0,001$ ) (Figura 17A). Na presença de 5,5 mM de D-glicose, apenas os grupos com somente o estímulo de 5,5 mM de D-glicose e os que continham 4 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo sofreram uma queda de no máximo 30% na viabilidade, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 17B). Na presença de 8 mM de D-glicose, os grupos contendo 16 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo sofreram uma redução na viabilidade ( $p < 0,05$ ), chegando a próximo de 35% de viabilidade, enquanto que o grupo contendo 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 sofreu um aumento na viabilidade atingindo 200% ( $p < 0,001$ ), todos comparados ao grupo controle de células RAW (Figura 17C). No grupo adicionado de 12 mM de D-glicose, os grupos que aumentaram a viabilidade foram os estimulados com 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 17D). Já no grupo contendo 24 mM de D-glicose, os grupos com 4 e 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) apresentaram viabilidade em torno de 10%. Nos grupos contendo 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,05$ ), a viabilidade diminuiu 55%. Enquanto que o grupo com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo sofreu um aumento de viabilidade ( $p < 0,05$ ), apresentando viabilidade de 125%, todos comparados com o grupo controle (Figura 17E).

Nos grupos estimulados com LPS, além das diferentes concentrações de D-glicose e do peptídeo DJK-6 foram observadas várias diferenças estatísticas, com alguns grupos apresentando elevada viabilidade. Nos grupos estimulados com LPS e 5,5 mM de D-glicose houve um aumento de mais de 160% na viabilidade celular. Enquanto os grupos contendo 4, 8, 16, 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS reduziram mais de 50% da viabilidade, atingindo o mínimo de 24% de viabilidade nos grupos com 8 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, todos comparados com o grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 17F). Os grupos estimulados com LPS e 8

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo e estimulados com 8 mM de D-glicose e LPS sofreram um aumento de 169% e 94%, da viabilidade celular quando comparados com o grupo controle, respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Figura 17G). Também houve um aumento na viabilidade nos grupos estimulados com LPS e 12mM de D-glicose, demonstrando um aumento de 169%. Na presença desta molaridade de D-glicose e LPS também foi observado um aumento de 80% na presença de 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo e de 74% na presença de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, ( $p < 0,001$ ). No entanto, nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS observou-se uma diminuição de 61% na viabilidade ( $p < 0,001$ ) e no grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, 12 mM de D-glicose e LPS, observou-se uma viabilidade de apenas 47% ( $p < 0,01$ ), comparados com o grupo controle (Figura 17H). Já no estímulo de 24 mM de D-glicose e LPS, o grupo contendo apenas LPS e as concentrações de 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 sofreram aumentos na viabilidade celular ( $p < 0,01$ ), enquanto os grupos com 8, 16 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo sofreram redução na viabilidade ( $p < 0,01$ ), quando comparados ao grupo controle (Figura 17I).

Já nas culturas com adição de LPS e rIFN- $\gamma$  de forma geral houve uma leve diminuição da viabilidade celular com exceção de alguns grupos. Quando adicionado 5,5 mM de D-glicose houve uma redução na viabilidade, de até 71%, do grupo estimulado apenas com LPS e rIFN- $\gamma$  e dos grupos contendo 4, 8, 16 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Enquanto na cultura estimulada com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  houve um aumento de 180% da viabilidade em comparação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 17J). Nas culturas estimuladas com D-glicose a 8 mM, LPS e rIFN- $\gamma$ , todos os grupos apresentaram queda na viabilidade celular, comparado ao grupo controle, com a menor viabilidade em 21% ( $p < 0,05$ ), exceto pelo grupo contendo 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo que apresentou um aumento de 70% na viabilidade em comparação com as células sem estímulo ( $p < 0,001$ ) (Figura 17K). As culturas na presença de 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  sofreram redução de viabilidade na presença de 4 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, apresentando 30% de viabilidade quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Enquanto que a cultura contendo 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 houve promoveu um aumento de 42% de viabilidade celular em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 17L). E nas culturas com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , os grupos contendo somente LPS e rIFN- $\gamma$  e os

contendo 8, 16, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 reduziram cerca de 60% da viabilidade em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 17M) <sup>15</sup>.

<sup>15</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (B, C, D, E, J, K, L e M), ♦ comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 8 mM de D-glicose (C), por 12 mM de D-glicose (D), por 24 mM de D-glicose (E) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (J, K e L), □ comparado com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), por 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), e • comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K), por 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e por 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L); ( $p < 0,01$ ) foi representado por ♦♦ comparado com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (M), ♦♦ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e ■ comparado com o grupo controle de células RAW (E, H e I), com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose (C), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 12 mM de D-glicose (D), por LPS (G), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por # comparado com o grupo controle de células RAW (C, F, G e J), com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 (A), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 12 mM de D-glicose (D), por 24 mM de D-glicose (E), por LPS (I) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K), ° comparado com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 (A), por 8 mM de D-glicose (C), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 12 mM de D-glicose (D), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por LPS (F), com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (J), # # comparado com o grupo controle de células RAW (G), com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), ° ° comparado com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS (F), por LPS (G), 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I), ■ ■ comparado com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 8 mM de D-glicose e LPS (G), por LPS (H) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), e \*\* comparado com o grupo controle de células RAW (H) e com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G).

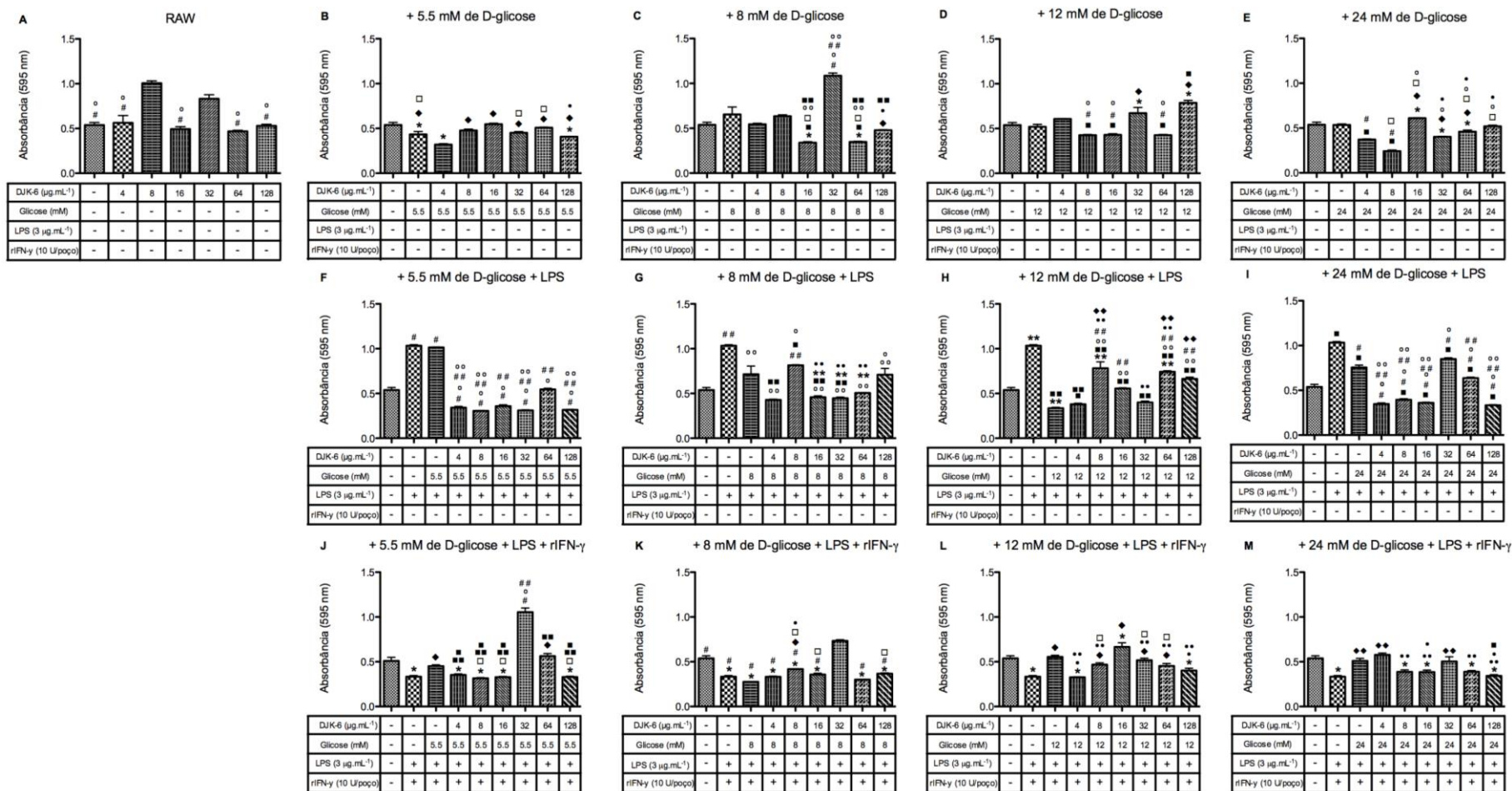


Figura 17 – Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg.mL<sup>-1</sup>) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3 µg.mL<sup>-1</sup>) (F-I) com e sem rIFN-γ (10 U.mL<sup>-1</sup>) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

#### 5.2.4.2 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6

No que diz respeito a produção de IL-6, o estímulo das diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 e das diferentes concentrações do peptídeo, em 12 mM de D-glicose não levou a alterações na produção basal de IL-6 (Figura 18A e D). Nos grupos onde houve a adição de 5,5 ou 8 mM de D-glicose nas culturas, todos os grupos apresentaram redução na produção de IL-6, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 18B e C). Já na presença de 24 mM de D-glicose, os grupos contendo 4, 8, 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram uma redução na produção de IL-6, quando comparados ao grupo com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) (Figura 18E).

Quando adicionado LPS ao grupo contendo 5,5 mM de D-glicose houve uma redução da produção de IL-6, assim como nos grupos estimulados também por 4, 8, 16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, quando comparados ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ) (Figura 18F). Nos grupos tratados com 8 mM de D-glicose, LPS e as diferentes concentrações do peptídeo DJK-6, assim como no grupo contendo apenas LPS, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle, mesmo nos grupos tratados com 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo. Contudo, os grupos estimulados apenas com LPS, 8 mM de D-glicose e LPS e com 8 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram redução na produção de IL-6 quando comparados com o grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, 8 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 18G). Nos grupos estimulados por 12 mM de D-glicose e LPS, apenas o grupo contendo 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentou redução significativa em relação ao grupo controle de células não estimuladas ( $p < 0,05$ ) (Figura 18H). Já no grupo estimulado por 24 mM de D-glicose e LPS, assim como nos grupos contendo 4, 32 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK6, houve uma redução da produção de IL-6 em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 18I).

Na presença de 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apenas os grupos contendo 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo apresentaram redução da produção de IL-6 quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Entretanto, já em comparação ao grupo estimulado com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, os grupos contendo 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram redução ( $p < 0,01$ ) (Figura 18J). Não houve diferença na produção de IL-6, em relação ao grupo controle, nos grupos onde foi adicionado 8 mM

de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ . Contudo, em relação ao grupo com 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, houve uma diminuição na produção de IL-6 nos grupos contendo somente 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e nos grupos contendo também 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo ( $p < 0,01$ ) (Figura 18K). Em relação ao grupo controle de células RAW, apenas o grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 em 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apresentou aumento na produção de IL-6 ( $p < 0,01$ ) (Figura 18L). Na presença de 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  nenhum grupo apresentou alteração na produção basal de IL-6. Entretanto, os grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e o estimulado também com 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram aumento da produção de IL-6 quando comparado ao grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, grupo que apresentou menor produção desta citocina ( $p < 0,05$ ) (Figura 18M)<sup>16</sup>.

---

<sup>16</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por # comparado com o grupo controle de células RAW (F e I), com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), ° comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e • comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I); ( $p < 0,01$ ) foi representado por \* com o grupo controle de células RAW (B, C e J), com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (L), ♦ comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J).

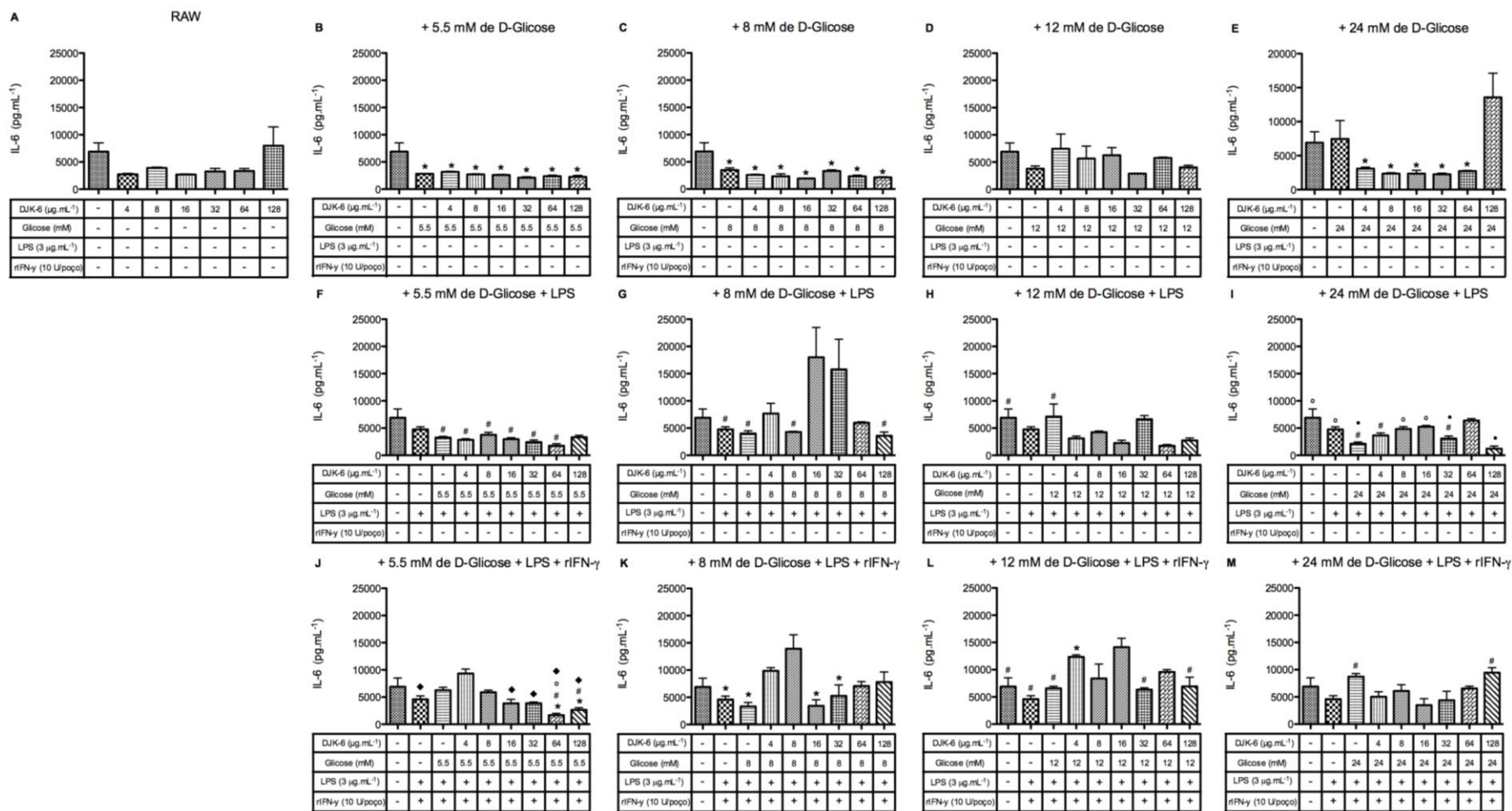


Figura 18 – Produção de IL-6 na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U $\mu\text{mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.2.4.3 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$

No que diz respeito a produção de TNF- $\alpha$ , o estímulo de somente as diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 e das diferentes concentrações do peptídeo na presença de 8 e 12 mM de D-glicose não provocou alteração na produção basal de TNF- $\alpha$  (Figura 19A, C e D). Ao se adicionar 5,5 mM de D-glicose, houve uma redução na produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos estimulados com o peptídeo DJK-6, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e entre si, o grupo contendo 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi o grupo que apresentou a menor produção em comparação com os grupos estimulados apenas por 5,5 mM de D-glicose e estimulados por 5,5 mM de D-glicose, 4, 8 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 ( $p < 0,05$ ) (Figura 19B). Já a adição de 24 mM de D-glicose, promoveu uma redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle, exceto no grupo contendo 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 ( $p < 0,01$ ) (Figura 19E).

Nos grupos contendo 5,5 mM de D-glicose e LPS, todos os grupos testados apresentaram diminuição na produção de TNF- $\alpha$ , em relação ao grupo controle, chegando a não haver produção nos grupos com 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 ( $p < 0,01$ ) (Figura 19F). Nos grupos contendo 8 mM de D-glicose e LPS houve uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos, em comparação ao grupo estimulado com 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 ( $p < 0,01$ ) (Figura 19G). Os grupos contendo 4, 8 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, na presença de 12 mM de D-glicose e LPS sofreram redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ). Em adição, os grupos contendo LPS e as concentrações de 4, 8, 16, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 sofreram redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo estimulado apenas por 12 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 19H). Nos grupos contendo 24 mM de D-glicose e LPS, todos os grupos reduziram a produção de TNF- $\alpha$  quando comparados ao controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 19I).

Ao se adicionar LPS e rIFN- $\gamma$  aos grupos estimulados com 5,5 mM de D-glicose, somente os grupos contendo 4, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 19J). Nos grupos estimulados com 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , houve aumento na produção de TNF- $\alpha$  apenas no grupo contendo 128



$\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 quando comparado ao grupo estimulado apenas com LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 19K). Nos grupos com 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , apenas o grupo com LPS e rIFN- $\gamma$  sofreu redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o grupo contendo 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentou redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado aos grupos com 4, 8 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 ( $p < 0,05$ ) (Figura 19L). Por fim, apenas o grupo estimulado com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apresentou aumento na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 19M)<sup>17</sup>.

---

<sup>17</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (B e H), com o grupo estimulado por 12 mM de D-glicose (E), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5 mM de D-glicose e LPS (F), por LPS (I), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (L e M), # comparado com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (F), por 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (I), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e ° comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5 mM de D-glicose (B), por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I); ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (E, F e J), com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G), por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I), por LPS/rIFN- $\gamma$  (K) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e ■ comparado com o grupo estimulado por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (I e M).

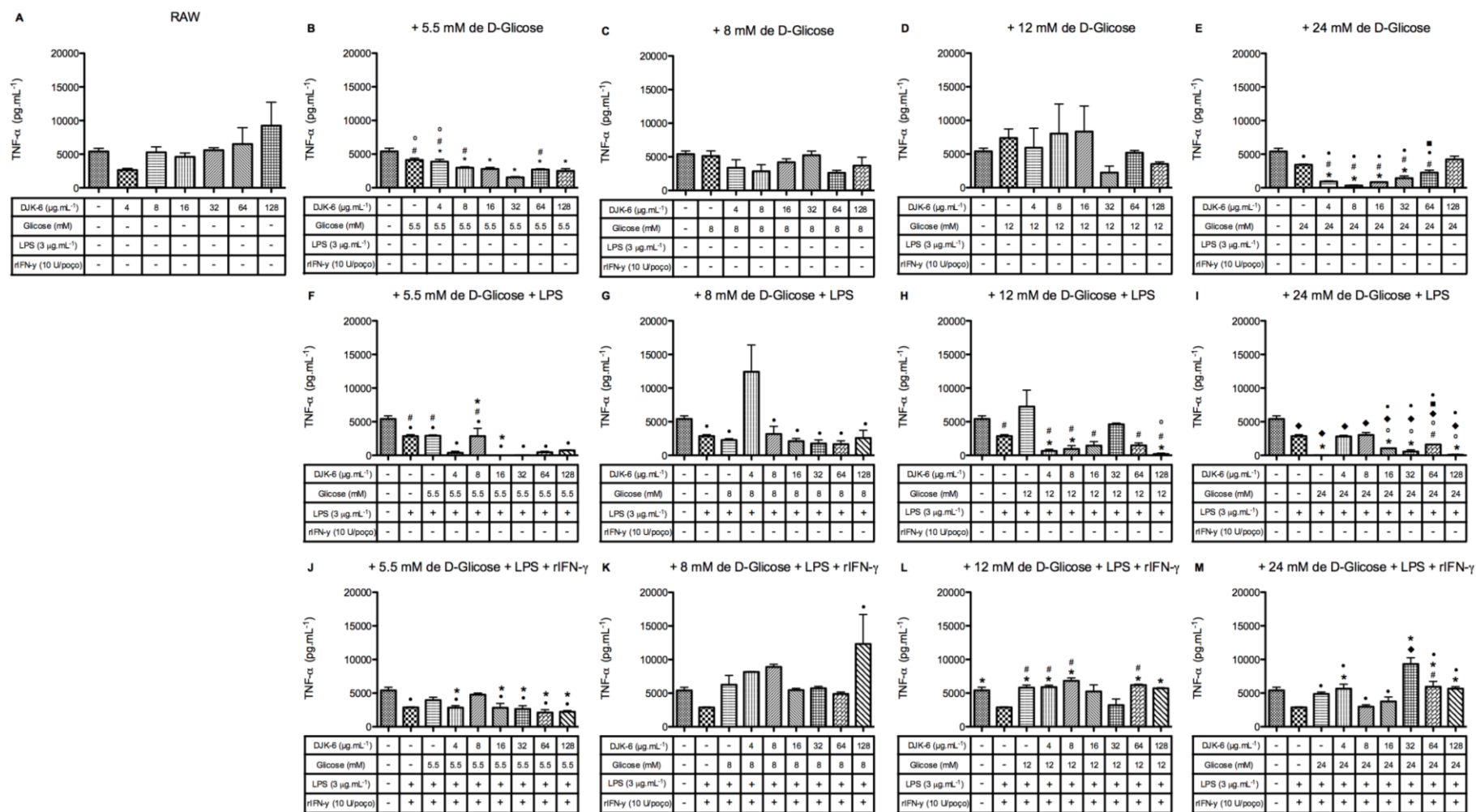


Figura 19 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U $\mu\text{mL}^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

#### 5.2.4.4 Produção de óxido nítrico (NO)

Nos grupos estimulados com as diferentes concentrações do peptídeo DJK-6, apenas o grupo com  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 reduziu a produção de NO, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 20A). O grupo estimulado com  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose apresentou menor produção de NO, quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 20B). Nos grupos onde 8 mM de D-glicose foi adicionado, o grupo estimulado somente com D-glicose aumentou a produção de NO e todos os outros grupos reduziram a produção de NO, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 20C). Com 12 mM de D-glicose, apenas o grupo contendo  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentou diminuição da produção basal de NO ( $p < 0,05$ ) (Figura 20D). O grupo estimulado apenas com 24 mM de D-glicose aumentou a produção de NO, enquanto os grupos com 4, 8 e  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram produção de NO diminuída, quando comparados ao grupo controle sem estímulos ( $p < 0,001$ ) (Figura 20E).

Nos grupos estimulados apenas com 5,5 mM de D-glicose e LPS, apenas os grupos contendo as diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 apresentaram redução na produção de NO, chegando a uma produção perto de nula, quando comparados ao grupo controle, ao grupo contendo somente LPS e ao grupo com glicose e LPS ( $p < 0,001$ ) (Figura 20F). Nos grupos estimulados com somente 8 mM de D-glicose e LPS e nos grupos contendo 4, 8, 16, 64 e  $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, glicose e LPS, houve uma diminuição da produção de NO em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 20G). Houve uma diminuição na produção de NO em todos os grupos estimulados com 12 mM de D-glicose em comparação ao grupo controle, onde os grupos com 4 e  $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 apresentaram produção nula de NO ( $p < 0,001$ ) (Figura 20H). Todos os grupos estimulados com 24 mM de D-glicose, LPS e as diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 sofreram redução na produção de NO, quando comparados ao grupo controle, exceto pelo grupo estimulado apenas com glicose e LPS que sofreu leve aumento na produção deste mediador ( $p < 0,001$ ) (Figura 20I).

Ao se adicionar rIFN- $\gamma$  às culturas, os grupos estimulados com LPS, rIFN- $\gamma$  e 5,5 mM de D-glicose sofreu um aumento na produção de NO quando comparado ao

grupo controle, enquanto os demais grupos apresentaram níveis basais de NO ( $p < 0,01$ ) (Figura 20J). No grupo estimulado com 8mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  observou-se um aumentando na produção de NO, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 20K). O grupo estimulado com 12mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  promoveu um aumento na produção de NO e o grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , uma diminuição, em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 20L). Na última condição experimental, apenas os grupos tratado com LPS, rIFN- $\gamma$  e 24 mM de D-glicose apresentou aumento quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 20M)<sup>18</sup>. Os demais grupos apresentaram produção basal de NO.

---

<sup>18</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por ° comparado com o grupo controle de células RAW (D, E e G), com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 8 mM de D-glicose (C), por 12 mM de D-glicose e LPS (H), por 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (J), por LPS/rIFN- $\gamma$  (K e L) e por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), □ comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 8 mM de D-glicose e LPS (G) e por 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L), ° ° comparado com o grupo controle de células RAW (M) e com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 8 mM de D-glicose e LPS (G); ( $p < 0,01$ ) foi representado por # com o grupo controle de células RAW (C e J) e com o grupo estimulado por LPS (G e H), ## comparado com o grupo estimulado por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e •• comparado com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS (H) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (J); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (E, F, G, H, I e L), com o grupo estimulado por 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 (A), por 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 5,5 mM de D-glicose (B), por 8 mM de D-glicose (C) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (M), • comparado com o grupo estimulado por 24 mM de D-glicose (E), por LPS (F), por 24 mM de D-glicose e LPS (I), por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M), ■ comparado com o grupo estimulado por 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E), por 5,5 mM de D-glicose e LPS (F) e por 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6, 24 mM de D-glicose e LPS (I) e ♦ comparado com o grupo controle de células RAW (M) e com o grupo estimulado por 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo DJK-6 e 24 mM de D-glicose (E).

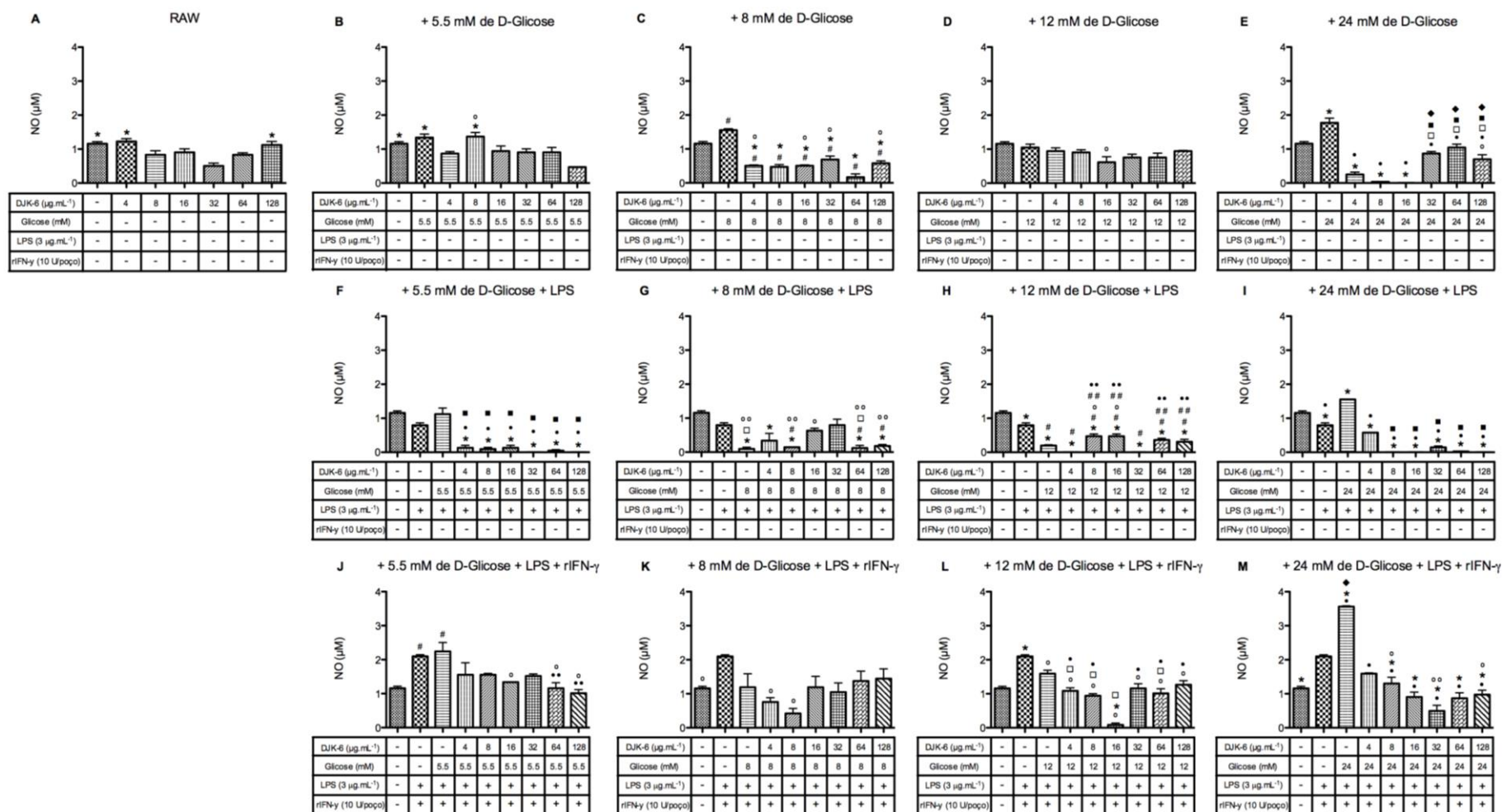


Figura 20 – Produção de NO na presença de diferentes concentrações do peptídeo DJK-6 (4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) associados a diferentes concentrações de D-glicose (A-E, F-I e J-M), estimuladas com LPS (3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F-I) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U.mL $^{-1}$ ) (J-M), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e desvio-padrão de uma réplica em triplicata. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### Resumo dos resultados da fase 2:

A tabela 5 apresenta os resultados da fase 2 do trabalho de forma geral e resumida. Desta forma, por ser um peptídeo natural humano, com conhecida ação imunomoduladora, o peptídeo LL-37 foi o escolhido para ser usado em comparação ao peptídeo IDR-1018. O peptídeo IDR-1018 foi escolhido por não alterar a viabilidade celular, promover a diminuição da produção da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  mediante todos os estímulos e manter o nível basal de NO, aumentando somente diante do estímulo de 24 mM de D-glicose na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ . Também foi escolhido para os testes subsequentes a concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para ambos os peptídeos. Esta foi escolhida uma vez representa a concentração com os melhores resultados para o peptídeo IDR-1018. Contudo, os outros peptídeos também apresentam resultados promissores para o desenvolvimento de novas pesquisas no futuro.

Tabela 5 - Resumo dos resultados da fase 2 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.

Peptídeos	Viabilidade celular			Produção de IL-6			Produção de TNF- $\alpha$			Produção de NO		
	Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$	Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$	Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$	Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$
LL-37	↑	↑	=	↓	↓	↑	↓	↑	↑	=	↑	↑
IDR-1018	=	=	=	↑	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	= (8 e 12 mM) ↑ (24 mM)
IDR-1002	=	=	=	-	-	-	-	-	-	↓	= ↓	= ↑
DJK-6	=	=	=	↓	↑ (8 mM) ↓ (12 e 24 mM)	↑ (8 mM) = (12 e 24 mM)	= (8 e 12 mM) ↓ (24 mM)	↓	=	↓ (8 e 24 mM) = (12 mM)	↓	=

### 5.3 FASE 3 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS CITOCINAS PRODUZIDAS NA PRESENÇA DOS PEPTÍDEOS LL-37 E IDR-1018

#### 5.3.1 Peptídeos LL-37 e IDR-1018

##### 5.3.1.1 Viabilidade celular

###### 5.3.1.1.1 Viabilidade celular em 6 horas

Não houveram diferenças nas viabilidades dos grupos testados no tempo de 6h. Todas as viabilidades foram mantidas em 100% após as culturas celulares serem tratadas com ambos os peptídeos LL-37 e IDR-1018, além dos tratamentos com as diferentes concentrações de D-glicose (Figura 16A), LPS (Figura 16B) e LPS e rIFN- $\gamma$  (Figura 16C).



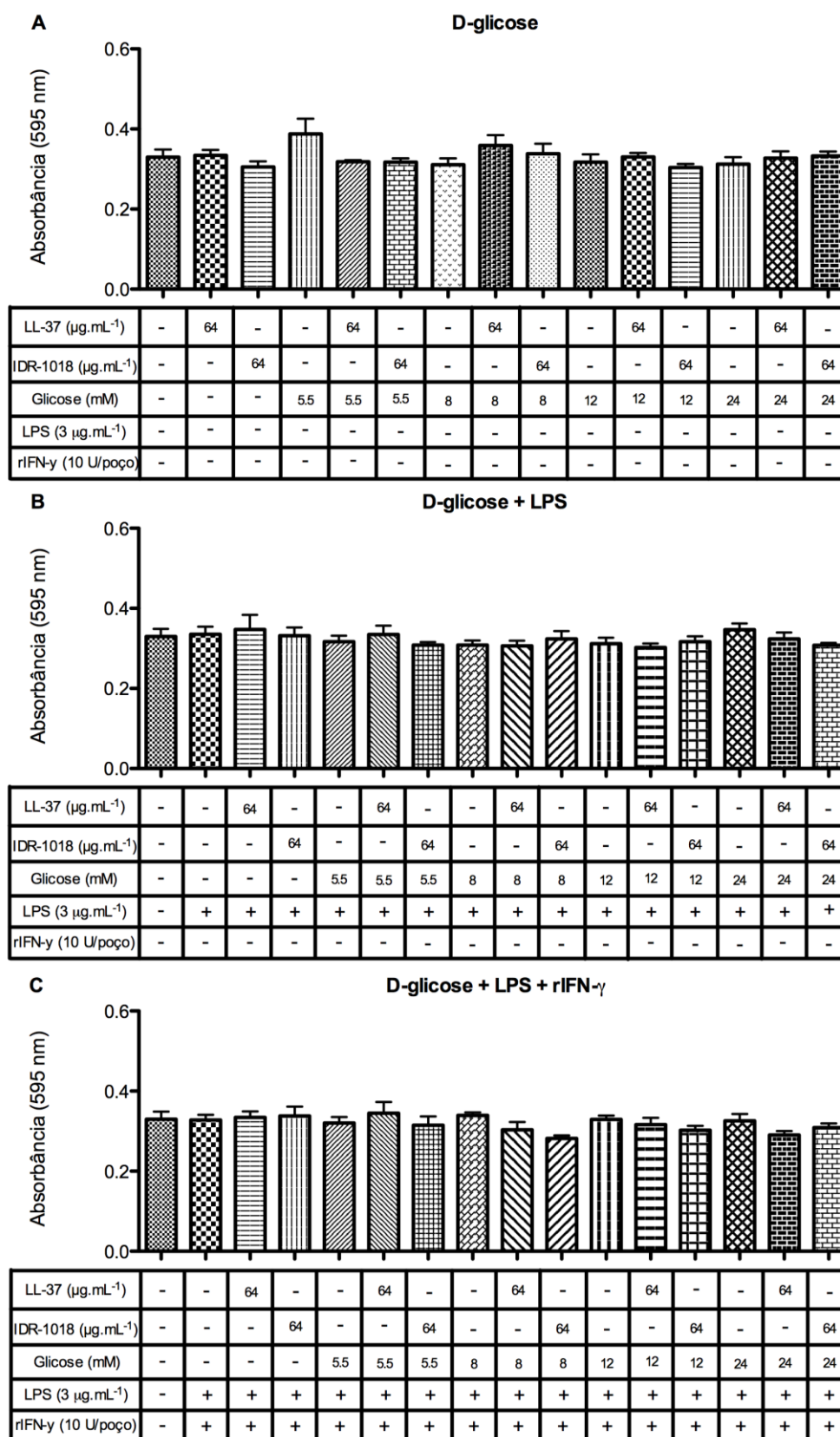


Figura 21 – Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 6h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Não houveram diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.1.2 Viabilidade celular em 24 horas

A viabilidade celular nos grupos estimulados com os peptídeos LL-37 e IDR-1018 e as diferentes concentrações de glicose não foi alterada quando comparada ao grupo controle. Somente nos grupos estimulados com  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 e 24 mM de D-glicose observou-se uma redução na viabilidade celular quando comparado ao grupo estimulado com 12 mM de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (Figura 22A). Também não houveram grandes mudanças na viabilidade celular nas culturas quando adicionado LPS, apenas o grupo estimulado com 12 mM de D-glicose e LPS e o grupo estimulado com o peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS apresentaram um leve aumento na viabilidade quando comparados ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$ ) (Figura 22B). Nos grupos com adição de LPS e rIFN- $\gamma$  apenas o grupo estimulado com 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  e o grupo estimulado com LL-37, 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 22C)<sup>19</sup>.

---

<sup>19</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5 mM de D-glicose (A), por 12 mM de D-glicose e LPS (B) e por 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C), # comparado com o grupo estimulado por 12 mM de D-glicose (A),  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS (B) e  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C), • comparado com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e ■ comparado com o grupo estimulado por 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C); e ( $p < 0,01$ ) foi representado por ° comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C).

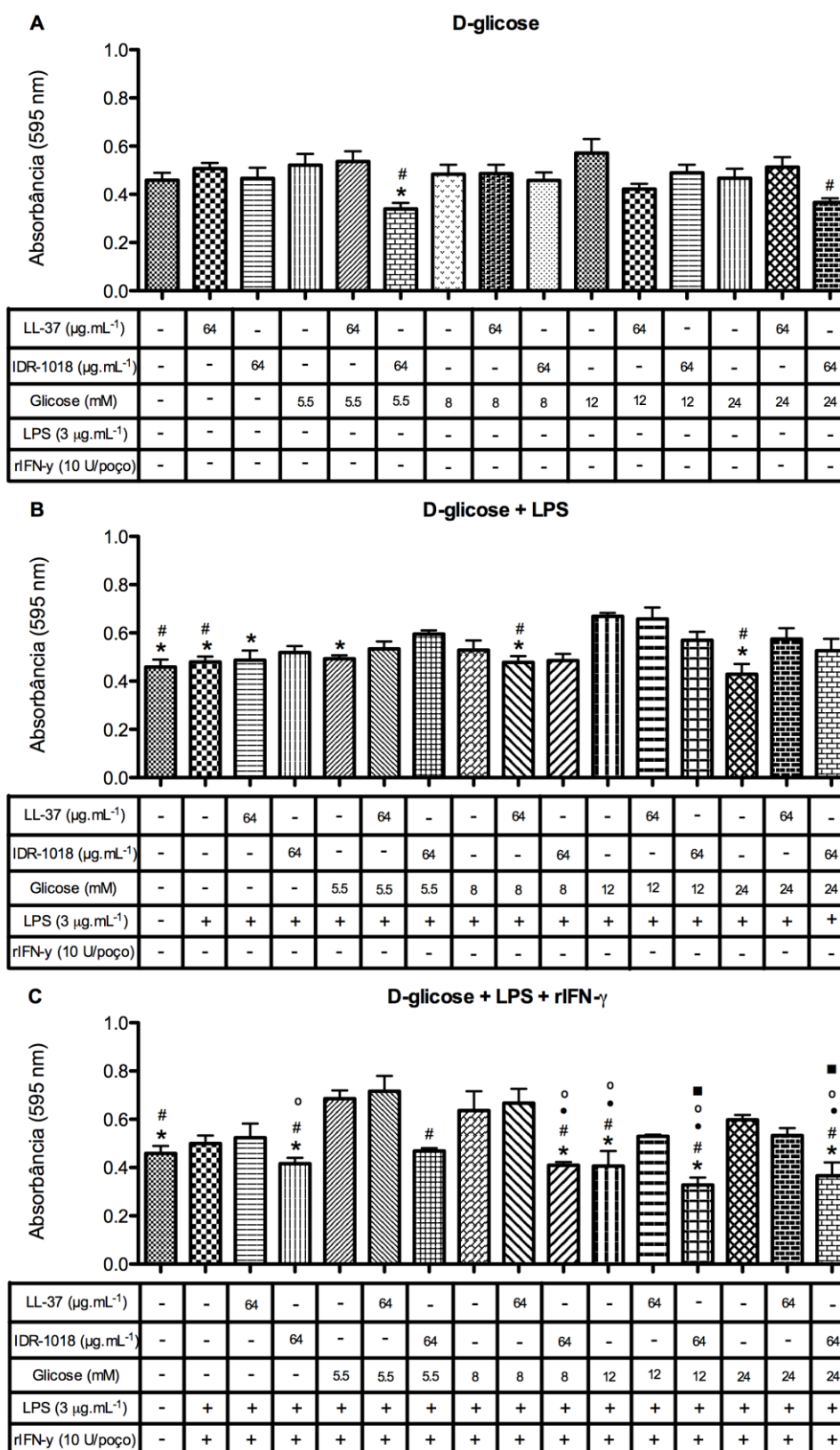


Figura 22 - Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 24h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.3.1.1.3 Viabilidade celular em 72 horas

A viabilidade celular do grupo estimulado com  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 apresentou-se reduzida, enquanto a dos grupos estimulados com  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 e 24 mM de D-glicose apresentaram-se aumentadas, em comparação ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 23A). Nenhum dos grupos estimulados na presença de LPS apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle de células RAW. Contudo, os grupos estimulados com LL-37, 8 e 24 mM de D-glicose e LPS apresentaram uma viabilidade menor, quando comparados ao grupo com IDR-1018, 8 e 24 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 23B). Ao se adicionar LPS e rIFN- $\gamma$ , observou-se em relação ao grupo controle, que estes grupos estimulados com LL-37 e 5,5, 8, 12 e 24 mM de D-glicose sofreram redução na viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) (Figura 23C)<sup>20</sup>.

<sup>20</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (C), com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 (A) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e LPS (B), # comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 mM de D-glicose (A), por 5,5 mM de D-glicose e LPS (B) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e LPS/rIFN- $\gamma$  (C), ° comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose (A), por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 mM de D-glicose (B) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C), • comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 8 mM de D-glicose (A), por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (B) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e ■ comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (A), por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (B) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C); e ( $p < 0,01$ ) foi representado por \*\* comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e LPS (B) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C), ## comparado com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose (A), ° ° comparado com o grupo estimulado por 12 mM de D-glicose (A), •• comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose (A) e ■■ comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (A); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por ♦ comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (A) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e \*\*\* comparado com o grupo estimulado por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C).

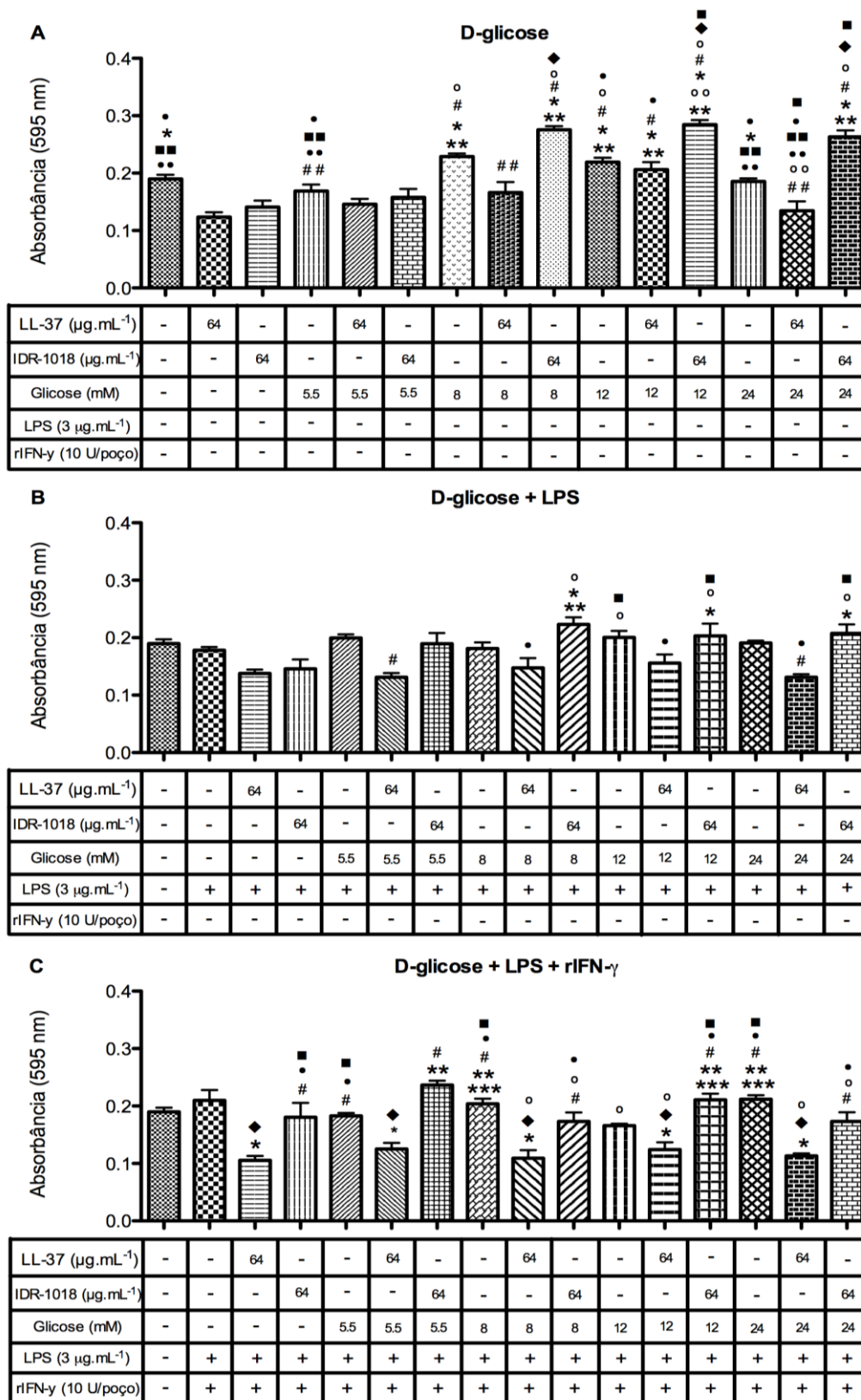


Figura 23 - Viabilidade celular na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glucose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 72h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.3.1.2 Produção da quimiocina MCP-1

Apesar das discretas alterações na produção de MCP-1, na presença de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018, das diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , nenhum dos grupos testados apresentou diferença significativa, quando comparados ao grupo controle ou mesmo quando comparados entre si (Figura 24).

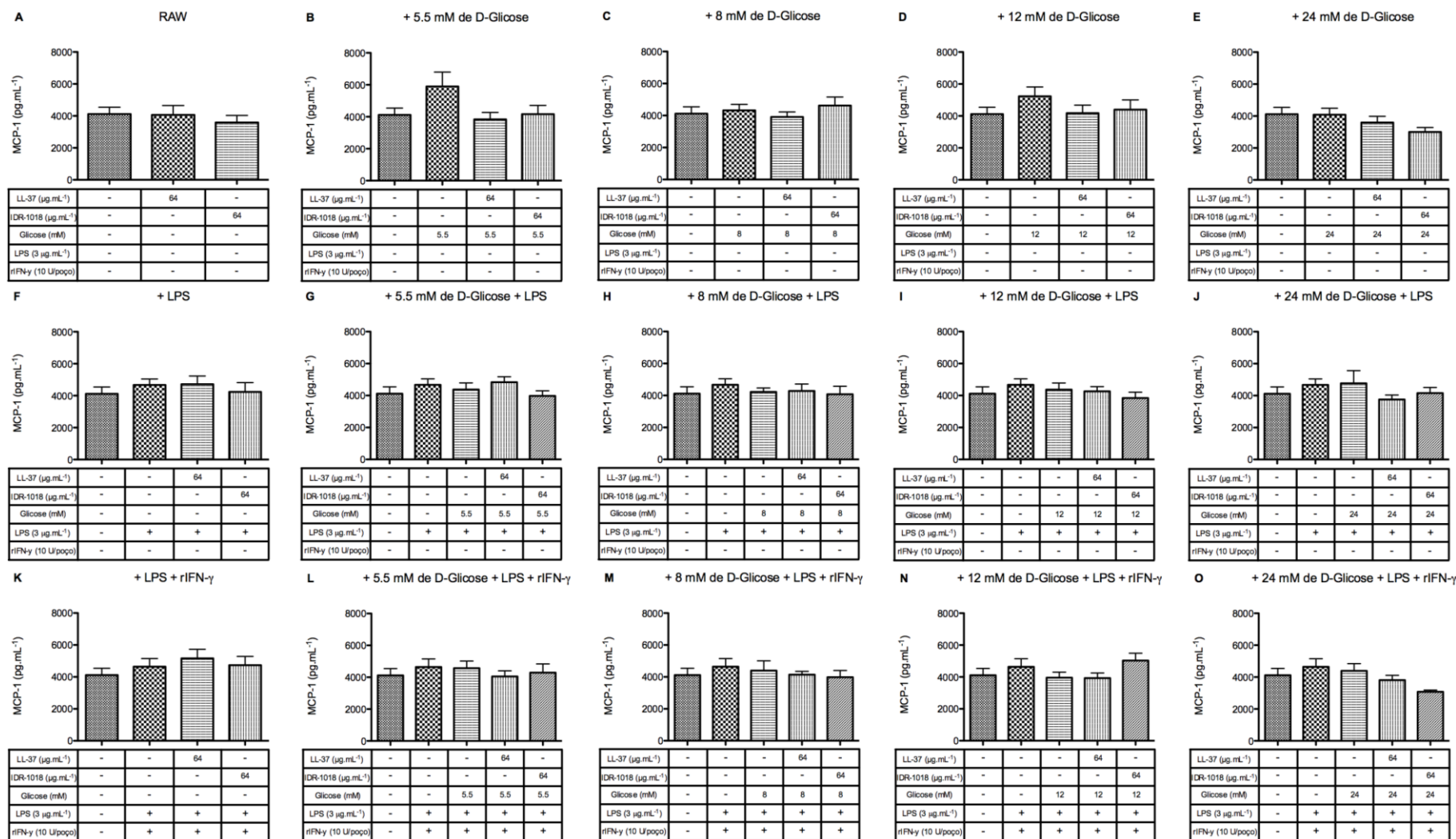


Figura 24 – Produção de MCP-1 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 6h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.3 Produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$

Quanto a produção de IL-1 $\alpha$ , a presença de ambos os peptídeos LL-37 e IDR-1018, na concentração de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , provocaram o aumento da produção desta citocina, quando comparado ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,001$ ) (Figura 25A). No entanto, entre estes peptídeos, o peptídeo IDR-1018 promoveu uma redução na produção de IL-1 $\alpha$ , quando comparado com o grupo estimulado com o peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 25A). Quando adicionado 5,5 mM de D-glicose às culturas, ambos os peptídeos apresentaram aumento na produção de IL-1 $\alpha$ , em comparação ao grupo controle e ao grupo estimulado apenas com glicose ( $p < 0,001$ ). Contudo, o grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 promoveu redução na produção de IL-1 $\alpha$  quando comparado ao grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 25B). Em relação ao grupo controle, somente o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8, 12 ou 24 mM de D-glicose promoveu aumento na produção de IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ). Quando comparados os dois peptídeos, o IDR-1018 apresentou redução em relação à LL-37 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 25C, D e E). Quando adicionado LPS às culturas, os grupos estimulados com ambos os peptídeos apresentaram aumento na produção de IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Já quando comparado ao grupo com LL-37, o grupo com IDR-1018 apresentou redução na produção da citocina ( $p < 0,01$ ) (Figura 25F). Os grupos estimulados por ambos os peptídeos, LL-37 e IDR-1018, 5,5, 8 ou 24 mM de D-glicose e LPS aumentaram a produção de IL-1 $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) e o grupo com IDR-1018 promoveu uma redução na produção quando comparado ao grupo com LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 25G, H e J). Já nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS, ambos os grupos estimulados com os peptídeos LL-37 e IDR-1018 aumentaram a produção de IL-1 $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 25I). Quando os grupos foram estimulados por LPS e rIFN- $\gamma$  somente o grupo com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 aumentou a produção de IL-1 $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 25K). Quando adicionado 5,5 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , ambos os peptídeos aumentaram a produção de IL-1 $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Em adição, o grupo contendo o peptídeo IDR-1018 apresentou uma redução na produção desta citocina quando comparado ao grupo contendo o



peptídeo LL-37 ( $p < 0,01$ ) (Figura 25L). Na presença de 8 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , apenas o grupo com LL-37 apresentou aumento na produção de IL-1 $\alpha$ , quando comparado ao grupo controle e ao grupo com IDR-1018 ( $p < 0,001$ ) (Figura 25M). Nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , ambos os peptídeos provocaram aumento na produção de IL-1 $\alpha$ , comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ). Contudo, em comparação com o grupo estimulado pela LL-37, o grupo contendo IDR-1018 sofreu uma redução de IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 25N). Ambos os grupos estimulados com os peptídeos aumentaram a produção de IL-1 $\alpha$ , quando comparados ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,001$ ). Já o grupo estimulado com IDR-1018 reduziu a produção da citocina em comparação ao grupo com LL-37 ( $p < 0,01$ ) (Figura 25O)<sup>21</sup>.

---

<sup>21</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (F), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (N) e # comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (N); ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (O), com o grupo estimulado por 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e LPS (F) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5,5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por ■ comparado com o grupo controle de células RAW (A e B), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (E), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5,5 mM de D-glicose e LPS (G) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS (H), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS (I) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS (J), \*\* comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 (A), por 5,5 mM de D-glicose (B), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 5,5 mM de D-glicose e LPS (G), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS (H), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (I), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (J) e # # comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 mM de D-glicose (B).

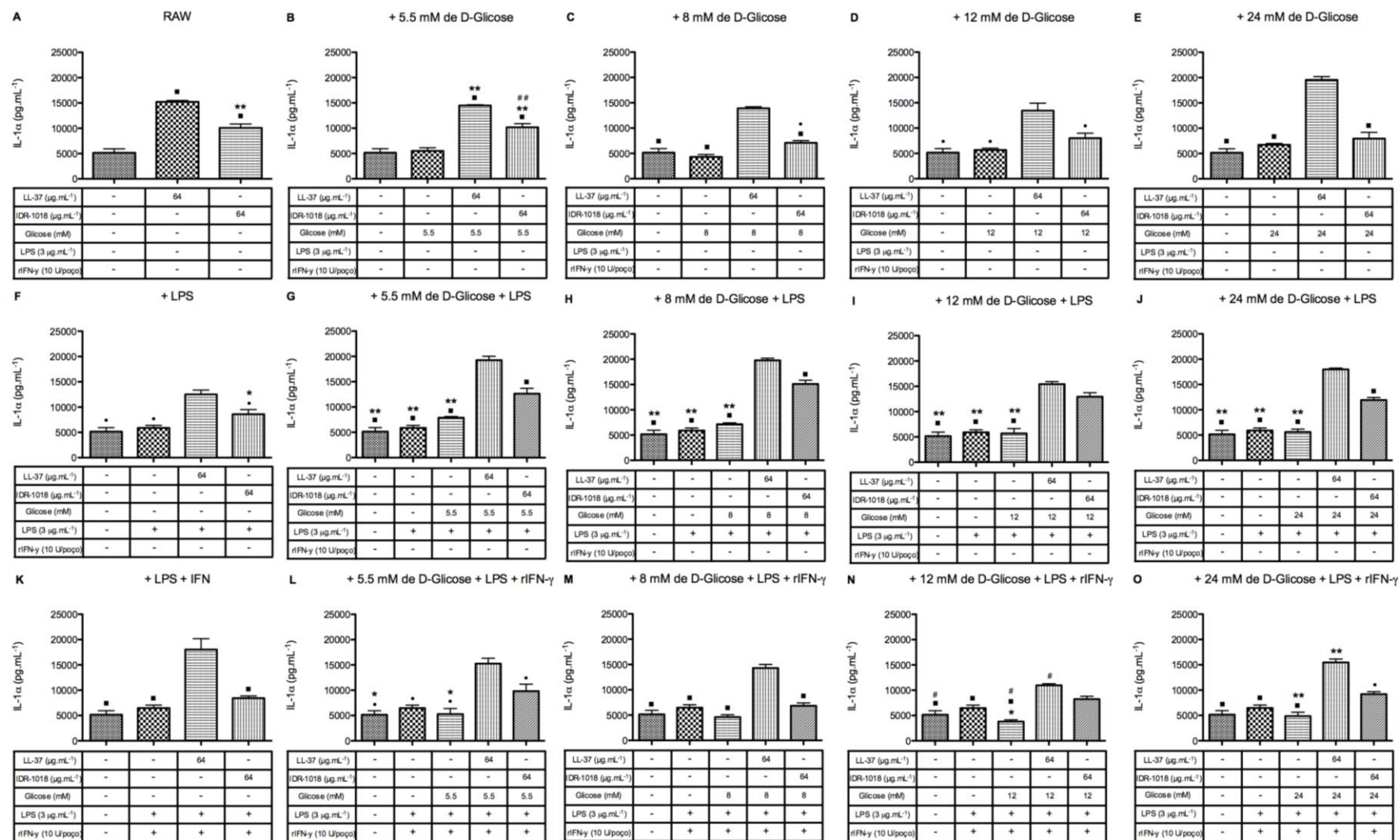


Figura 25 – Produção de IL-1 $\alpha$  na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  (10 U $\mu\text{L}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### 5.3.1.4 Produção da citocina pró-inflamatória IL-6

Não houve alteração significativa na produção de IL-6 diante na presença de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018, nas diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , em nenhum dos grupos testados, quando comparados ao grupo controle ou mesmo quando comparados entre si (Figura 26).

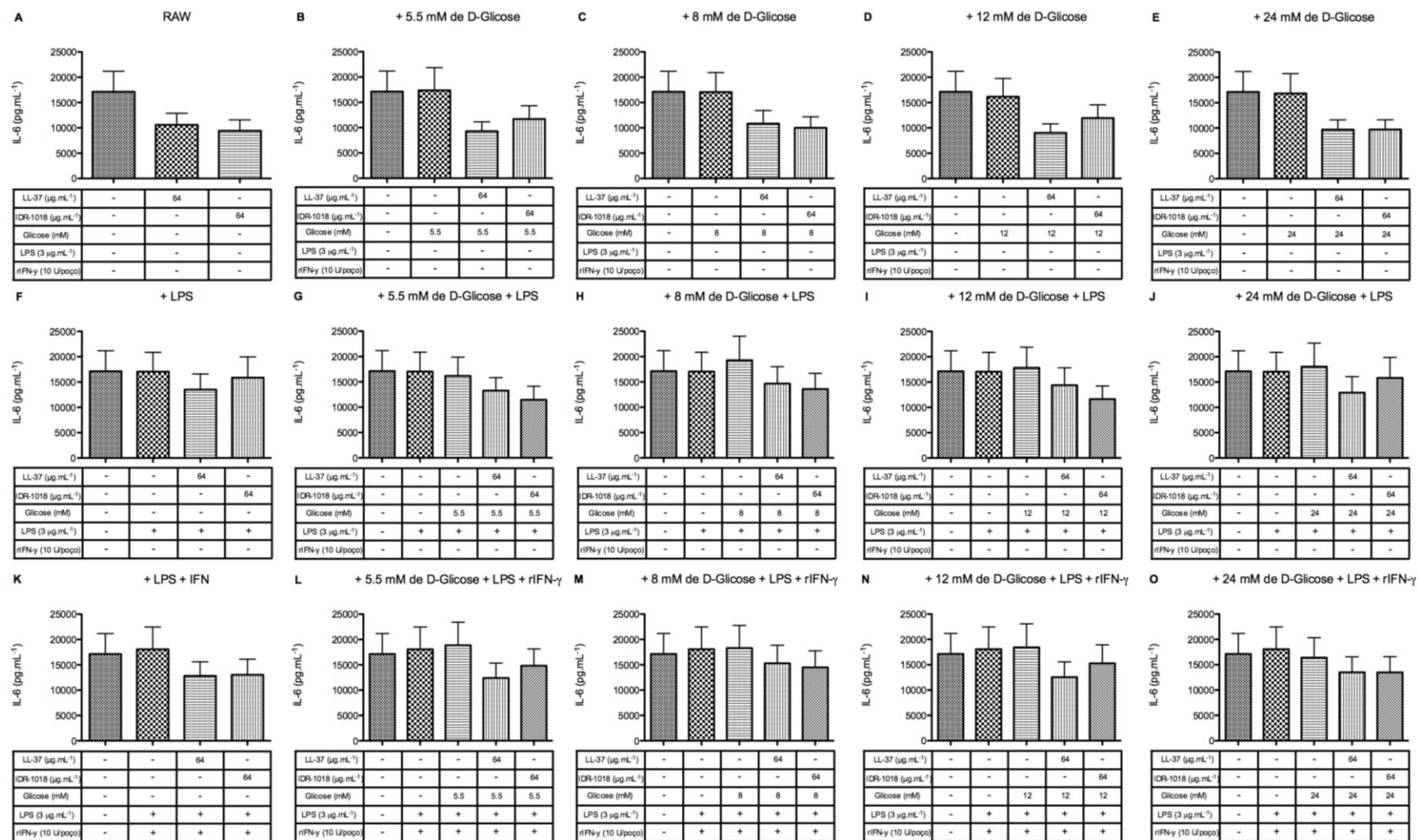


Figura 26 – Produção de IL-6 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.5 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$

Em relação a produção de TNF- $\alpha$ , não houveram diferenças estatísticas entre os grupos estimulados com os peptídeos e o grupo controle. Entretanto, houve um aumento na produção de TNF- $\alpha$  do grupo estimulado com o IDR-1018, em comparação ao grupo com LL-37 ( $p < 0,001$ ) (Figura 27A). Não houve diferença estatística nos grupos estimulados com 5,5 mM de D-glicose e os peptídeos LL-37 e IDR-1018 (Figura 27B). Os grupos estimulados com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 ou 12 mM de D-glicose apresentaram uma redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle e ao grupo estimulado com IDR-1018 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 27C e D). Já quando estimulados com 24 mM de D-glicose, ambos os grupos com LL-37 e IDR-1018 apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 27E). Os grupos estimulados somente com LPS e os grupos estimulados com 5,5 e 8 mM de D-glicose e LPS apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , quando comparados ao grupo controle de células RAW ( $p < 0,01$ ) (Figuras 27F, G e H). Nos grupos estimulados com 12 ou 24 mM de D-glicose e LPS, somente os grupos com LL-37 apresentaram redução significativa quando comparados com os grupos controles ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 27I e J). Nos grupos estimulados com LPS e rIFN- $\gamma$ , os grupos contendo ambos os peptídeos apresentaram redução de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 27K). Os grupos estimulados com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 5,5 ou 12 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados aos grupos controle de células RAW ou aos grupos estimulados apenas com LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) (Figuras 27L e N). Os grupos estimulados com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e IDR-1018, 8 ou 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  apresentaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Contudo, no grupo com 8 mM de D-glicose, a menor produção observada foi no grupo contendo LL-37 (Figura 27M e O)<sup>22</sup>.

---

<sup>22</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (K e M), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 12 mM de D-glicose (D), por 24 mM de D-glicose (E), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (L) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (N); e ( $p < 0,01$ ) foi representado por • comparado com o grupo controle de células RAW (E, F, G, H e J), com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 (A), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 8 mM de D-glicose (C), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 12 mM de D-

---

glicose e LPS (I) e por  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (M) e  $\blacklozenge$  comparado com o grupo estimulado por LPS/rIFN- $\gamma$  (O).



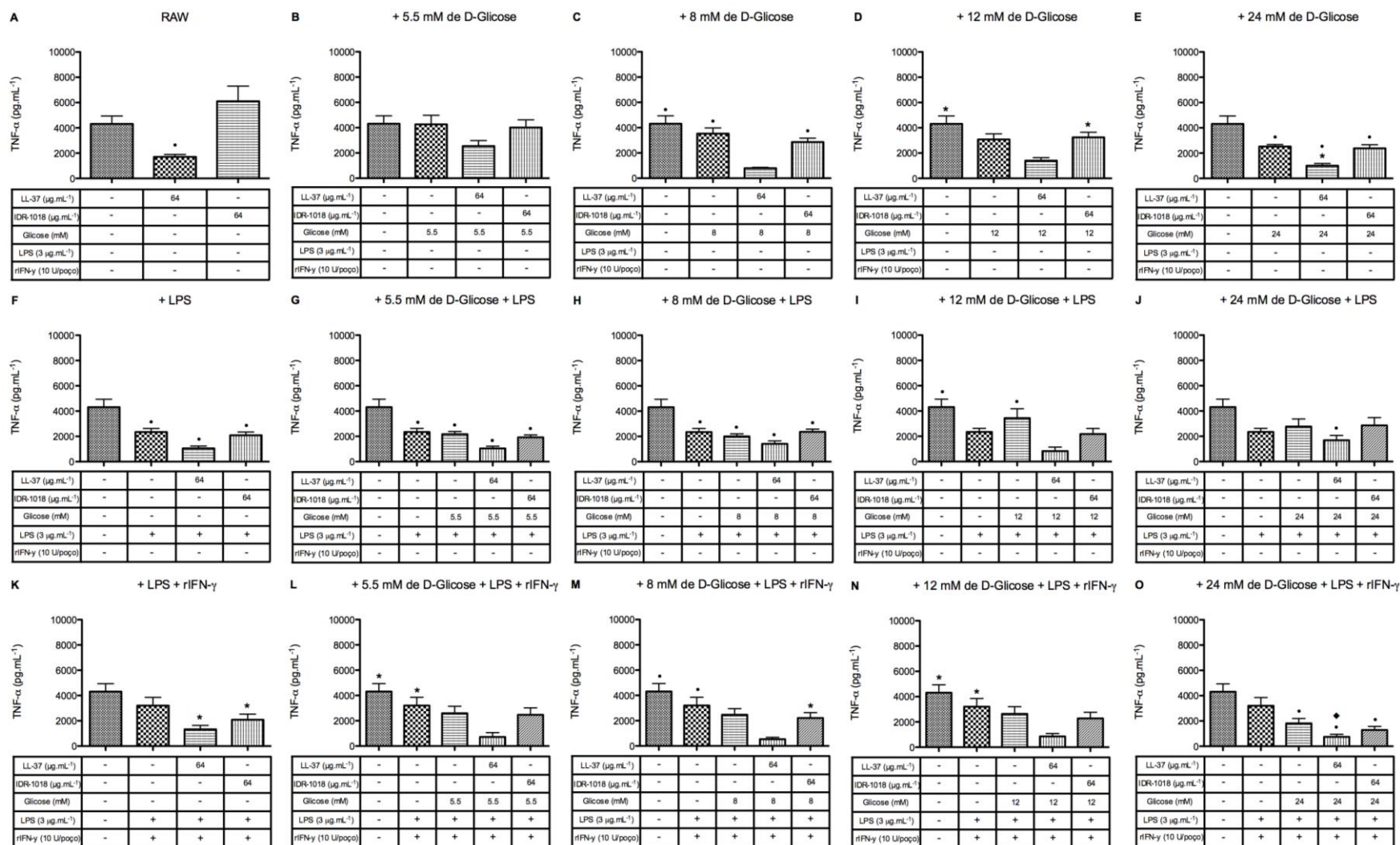


Figura 27 – Produção de TNF- $\alpha$  na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.6 Produção da citocina pró-inflamatória com perfil M1 (IL-12)

Quanto a produção de IL-12, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 e das diferentes concentrações de D-glicose ou nos grupos com dos peptídeos, glicoses e LPS, e os grupos controles (Figuras 28A, B, C, D, E, F, G, H, I e J).

Já nos grupos que receberam os estímulos de LPS, rIFN- $\gamma$  e as diferentes concentrações de D-glicose, houve uma redução na produção de IL-12 dos grupos contendo o peptídeo LL-37, em relação aos grupos estimulados com LPS e rIFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa quando comparados aos grupos controles de células RAW (Figuras 28K, L, M, N e O)<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo estimulado por estimulado por LPS/rIFN- $\gamma$  (K, L, M e O); e ( $p < 0,01$ ) foi representado por # comparado com o grupo estimulado por LPS/rIFN- $\gamma$  (N).



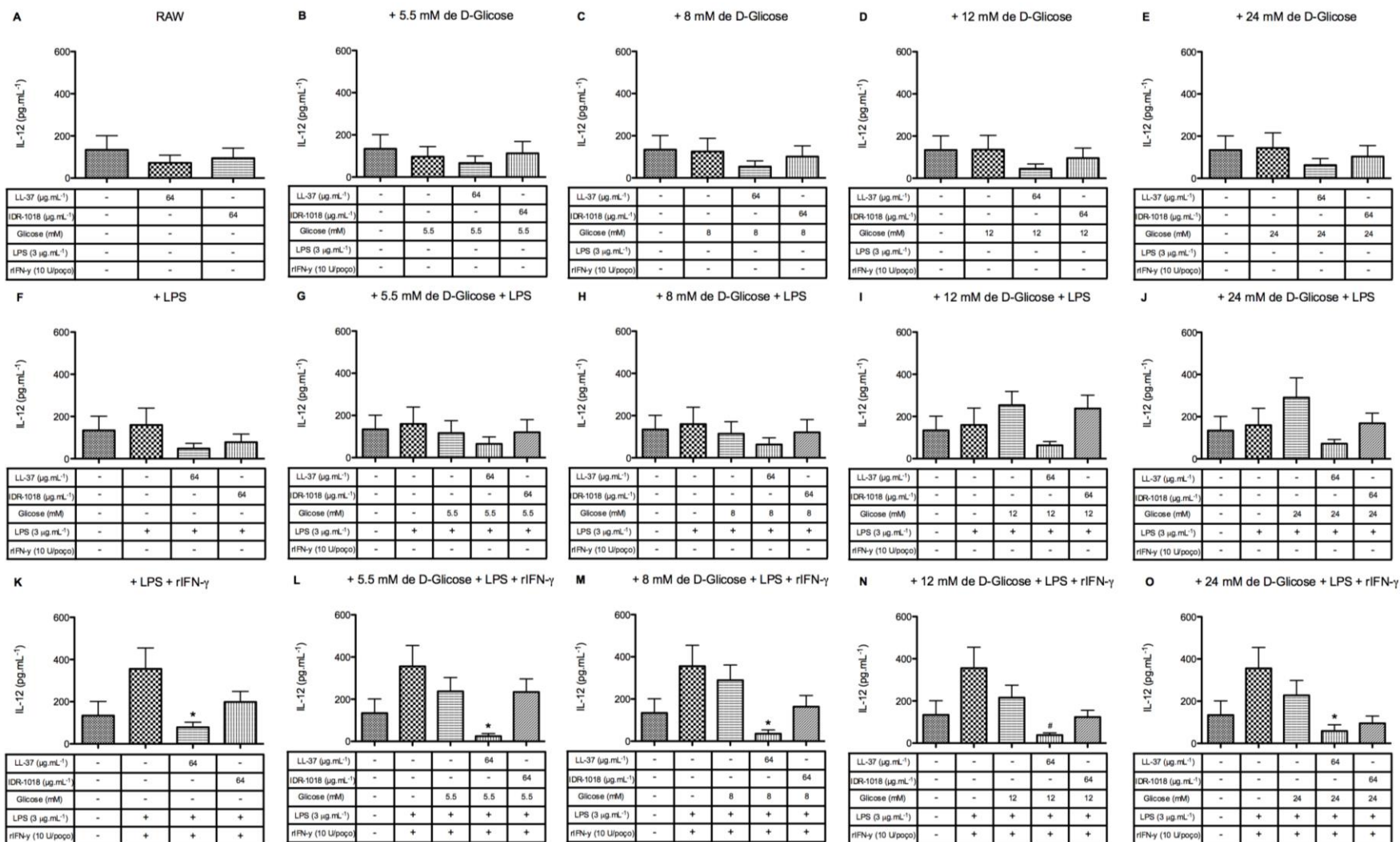


Figura 28 – Produção de IL-12 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 24h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.7 Produção da citocina anti-inflamatória com perfil M2 (IL-10)

Não houve alteração significativa na produção de IL-10 na presença de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018, nas diferentes concentrações de D-glicose e LPS e rIFN- $\gamma$ , em nenhum dos grupos testados, quando comparados ao grupo controle ou mesmo quando comparados entre si (Figura 29).

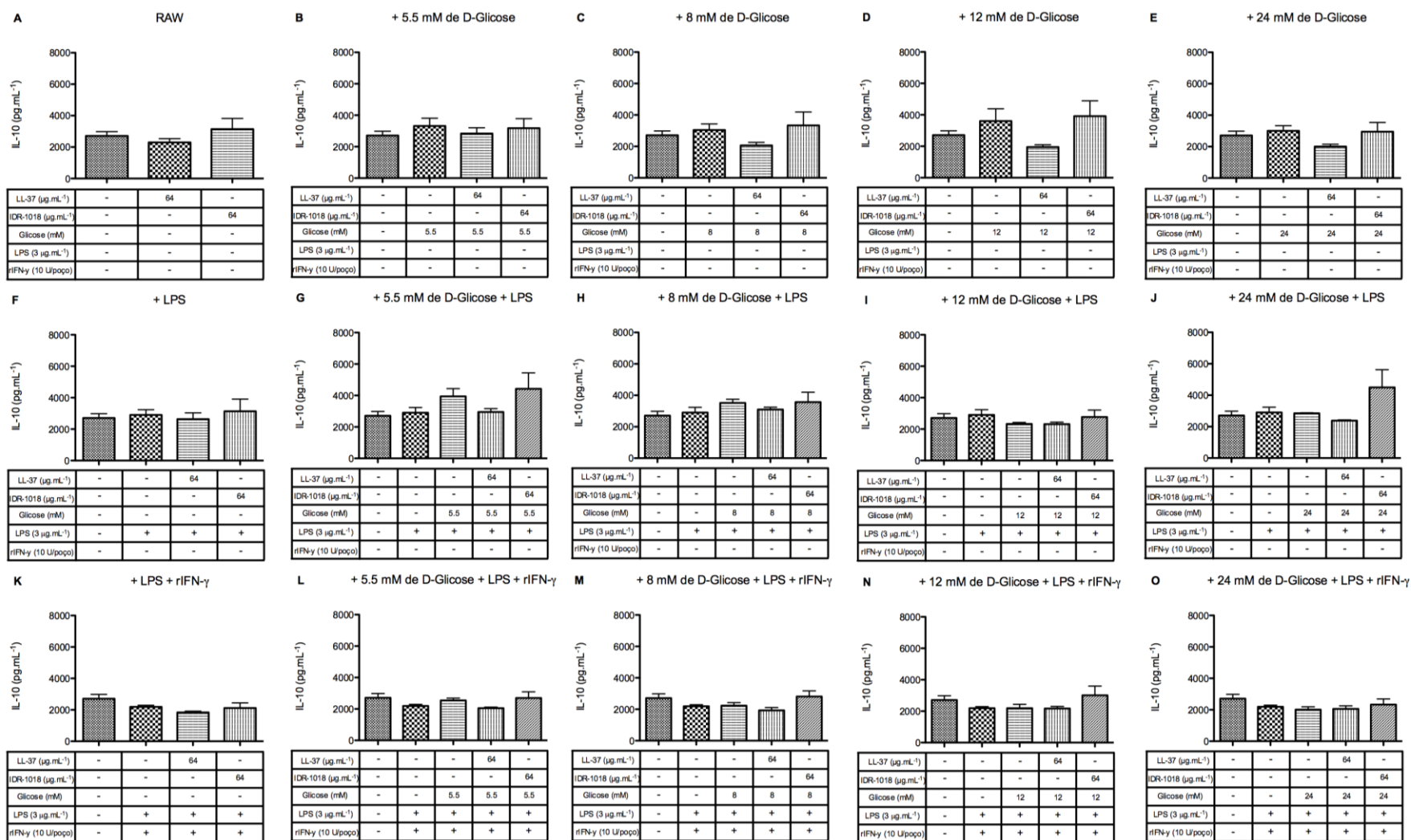


Figura 29 – Produção de IL-10 na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glicose (B, G e L), (C, H e M), (D, I e N), (E, J e O), estimuladas com LPS ( $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G-J) com e sem rIFN- $\gamma$  ( $10 \text{ U.mL}^{-1}$ ) (L-O), após 72h de incubação. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão de 3 réplicas em triplicatas. Não houve diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni.

### 5.3.1.8 Produção de óxido nítrico (NO)

Em todos os grupos estimulados com os peptídeos LL-37 e IDR-1018 ou na presença das diferentes concentrações de D-glicose, houve um padrão de produção de NO, exceto pelo grupo estimulado com o IDR-1018 e 5,5 mM de D-glicose, que apresentou um grande aumento na produção de NO, em comparação ao grupo controle e em comparação a todos os outros grupos ( $p < 0,001$ ). O grupo estimulado pela LL-37 e 24 mM de D-glicose apresentou um leve aumento de NO em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 30A). Já nos grupos estimulados com as diferentes concentrações de D-glicose e LPS, apenas o grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS apresentou aumento na produção de NO, em relação tanto ao grupo controle, quanto aos grupos estimulados somente com glicose e estimulados com LL-37, 24 mM de D-glicose e LPS ( $p < 0,001$ ) (Figura 30B). Já nos grupos estimulados com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 e 24 mM de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$ , houve um aumento na produção de NO em comparação ao grupo controle e aos grupos estimulados apenas com 8 e 24 mM de D-glicose ( $p < 0,001$ ) (Figura 30C)<sup>24</sup>.

<sup>24</sup> ( $p < 0,05$ ) foi representado por \* comparado com o grupo controle de células RAW (C), com o grupo estimulado por estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e 24 mM de D-glicose (A) e por 8 mM de D-glicose e LPS (B), # comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 12 mM de D-glicose e LPS (B) e por LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e ■ comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 5 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C); ( $p < 0,01$ ) foi representado por ° comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose (A) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C); e ( $p < 0,001$ ) foi representado por • comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e 5 mM de D-glicose (A), por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS (B) e por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 8 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) e ♦ comparado com o grupo estimulado por 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, 24 mM de D-glicose e LPS/rIFN- $\gamma$  (C).

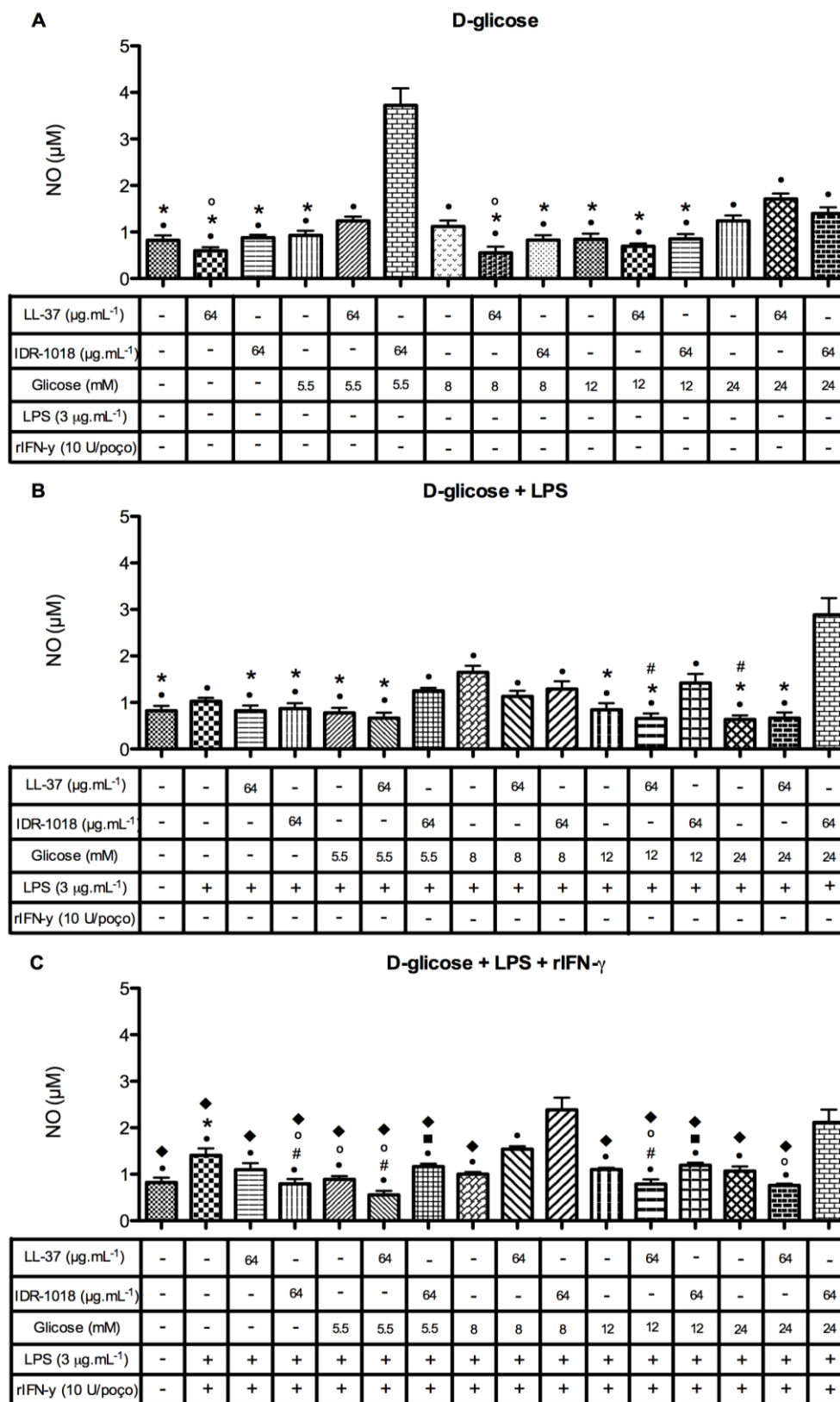


Figura 30 – Produção de NO na presença de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 ou IDR-1018 associados a diferentes concentrações de D-glucose (A), LPS (B) e LPS/rIFN- $\gamma$  (C) após 72h. Todos os gráficos representam a média e o erro-padrão da absorbância de 3 réplicas biológicas em triplicatas. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### Resumo dos resultados da fase 3:

A tabela 6 representa os resultados de uma forma geral e resumida da fase 3 do trabalho. O peptídeo IDR-1018 não alterou a viabilidade celular, manteve os níveis basais de MCP-1, IL-6, IL-12 e IL-10, promoveu a diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e aumentou a produção de NO. Em comparação, o peptídeo LL-37 diminuiu a viabilidade em 72h, manteve os níveis basais de MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10 e NO, aumentou a produção de IL-1 $\alpha$  e diminuiu a produção de TNF- $\alpha$ . Desta forma, o peptídeo IDR-1018 demonstrou um efeito protetor similar a LL-37, ao promover a manutenção nos níveis basais de produção das citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para que assim não seja provocado o dano celular.

Tabela 6 – Resumo dos resultados da fase 3 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle

		LL-37			IDR-1018		
		Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$	Glicose	LPS	LPS/ rIFN- $\gamma$
Viabilidade celular	6h	=	=	=	=	=	=
	24h	=	=	↑	=	=	=
	72h	=	↓	↓	↑	↑	↑
Produção de MCP-1		=	=	=	=	=	=
Produção de IL-1 $\alpha$		↑	↑	↑	=	↑	=
Produção de IL-6		=	=	=	=	=	=
Produção de TNF- $\alpha$		↓	↓	↓	=	↓	↓
Produção de IL-12		=	=	↓	=	=	=
Produção de IL-10		=	=	=	=	=	=
Produção de NO		=	=	↑	=	↑	↑

## 6 DISCUSSÃO

O DM consiste em uma das doenças metabólicas mais comuns, sendo considerada até mesmo uma epidemia, devido a sua crescente incidência anual por todo o mundo. Em 2013, 24 milhões de pessoas possuíam diabetes na América do Sul e Central, enquanto que no mundo existe um total de 381,8 milhões. Contudo, a previsão para 2035 é de que pelo menos 38,5 milhões de pessoas sejam diabéticas na América do Sul e Central e 592 milhões em todo o mundo (2).

O descontrole dos níveis glicêmicos pode causar uma desregulação em níveis metabólicos ou em vias de sinalização, desta forma podendo contribuir para a geração das complicações diabéticas. Essas complicações podem ocorrer, devido a um número crítico de eventos celulares que podem estar alterados (124). As principais complicações associadas ao DM podem incluir a nefropatia, retinopatia, neuropatia, complicações cardiovasculares, doenças vasculares periféricas, doenças periodontais e até mesmo desordens ósseas (111). Grande parte dessas consequências causadas pelo descontrole glicêmico podem ser consideradas resultado de alterações no processo de resposta imune, devido à presença crônica de altas concentrações de glicose, aumentando assim a susceptibilidade à infecções (12). A alteração provocada no sistema imune pode promover deficiências principalmente no sistema imune inato, causando disfunção na adesividade, migração, quimiotaxia, fagocitose, na capacidade bactericida e de apresentação de antígenos de leucócitos, além de causar produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (36).

Desta forma, poucos estudos focam a modulação imunológica como um adjuvante no tratamento das complicações causadas pelo DM. Sendo assim, o objetivo deste estudo consistiu em verificar o potencial biotecnológico de peptídeos imunomoduladores candidatos, em diferentes condições de glicose e resposta inflamatória/infecciosa *in vitro* para no futuro, somar um fármaco que seja capaz de controlar de forma positiva as respostas do sistema imune que, geralmente, acontecem de forma exacerbada. Para tanto, a linhagem de células RAW 264.7, derivada de monócitos, foi utilizada para a análise imunológica do estudo *in vitro*. Os monócitos podem constituir de 3% a 8% dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou no parênquima de órgãos, podem originar os macrófagos ou DCs. Os



monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes e importantes para a resposta imune inata, principalmente durante o processo de inflamação. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via molécula de MHC, estimulando assim respostas mediadas por linfócitos T. Esses tipos celulares consistem em células responsáveis pelo início da resposta inflamatória e possuem papel essencial no desenvolvimento da resposta imune, como a secreção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e NO (33, 125, 126).

Para a determinação das concentrações de D-glicose que foram utilizadas no trabalho, dados previamente publicados por Garcia-Hernandez et al. (111) foram considerados, onde 5,5 mM de D-glicose corresponde a níveis glicêmicos normais ( $\sim 99$  mg.dL<sup>-1</sup>); 8 mM corresponde a níveis pós-prandiais de glicemia ( $\sim 144$  mg.dL<sup>-1</sup>); e 12 mM e 24 mM correspondem a altos níveis glicêmicos, níveis considerados controlados e descontrolados de diabetes ( $\sim 216$  mg.dL<sup>-1</sup> e  $\sim 432$  mg.dL<sup>-1</sup>, respectivamente). A fim de mimetizar um estado de infecção/inflamação, situação muito comum em pacientes diabéticos, o sistema *in vitro* ainda incluiu a adição dos estímulos de LPS e rIFN- $\gamma$  (127, 128).

Desta forma, os principais resultados encontrados nessa primeira fase foram que a presença das diferentes concentrações de D-glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  não provocaram alterações na viabilidade celular até 72h. Contudo, a partir desse momento, ocorreu uma diminuição na viabilidade. Em contraste, Kumar et al. (129) relatou que macrófagos estimulados *in vitro* com 30 mM de glicose por 24h já sofrem queda de 59% de viabilidade.

Os peptídeos foram escolhidos com base na ampla atuação na modulação de funções imunes sem comprometer os elementos da imunidade requeridos para a resolução de infecções, assim como descritos na literatura (9). Esses peptídeos podem ser naturalmente produzidos pelo corpo humano, como por exemplo a LL-37, mas também podem ser alterados de forma sintética para o aumento da atividade imunomoduladora, como por exemplo os IDRs. Estes possuem como função, estimular o sistema imune para ajudar a proteger o organismo de diversas e contínuas exposições a microrganismos e assim, manter a homeostase da microbiota, além de contribuírem para a cicatrização de feridas (130). A escolha da LL-37 baseou-se no fato deste ser um peptídeo de origem humana com capacidade antimicrobiana. Além disso, esta catelecidina possui um amplo espectro de atividade

moduladora, por exemplo, estimula a proliferação celular, induz a angiogênese *in vivo* e possui potencial quimiotático (93). Já o IDR-1018, o IDR-1002 e o DJK-6 fazem parte da classe dos IDRs, ou seja, são denominados peptídeos reguladores da defesa inata (9, 98). O IDR-1018 pode ser descrito como potente indutor de quimiocinas, capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e um bom promotor de cicatrização de feridas. O peptídeo IDR-1002 apresentou maior recrutamento de leucócitos na presença de infecções e o DJK-6 tem sido descrito como uma versão otimizada do peptídeo IDR-1018. A otimização foi realizada através de uma modificação na estrutura do peptídeo IDR-1018, a fim de originar um peptídeo D-enantiômero, mantendo as mesmas propriedades do peptídeo original e adicionando ao peptídeo uma proteção extra contra proteases de microrganismos ou até mesmo proteases do próprio hospedeiro. Isso porque, peptídeos naturais e peptídeos sintéticos derivados de peptídeos naturais podem ser extremamente susceptíveis à degradação por essas proteases (107, 109).

A ação dos peptídeos imunomoduladores depende do tipo celular e do estímulo inflamatório presente. Todavia, as concentrações biológicas produzidas dos peptídeos são naturalmente baixas (variando de  $\text{ng.mL}^{-1}$  a  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (90, 130). Desta forma, várias concentrações dos peptídeos estudados foram testadas a fim de verificar a melhor concentração capaz de alterar *in vitro* a produção de mediadores do sistema imune. Sendo assim, na segunda fase, a presença da LL-37 aumentou a viabilidade celular diante dos estímulos de glicose e LPS, enquanto que todos os outros peptídeos não promoveram alteração na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. Quanto a produção de IL-6, somente a LL-37 foi capaz de reduzir sua produção, enquanto que o IDR-1018 e o DJK-6 aumentaram. O TNF- $\alpha$  aumentou na presença da LL-37, LPS e LPS/rIFN- $\gamma$ , enquanto que o IDR-1018 reduziu sua produção. Além disso, o NO teve seus níveis aumentados na presença da LL-37, foi reduzido na presença do DJK-6 e se manteve similar aos níveis basais na presença do IDR-1018.

Levando em conta a produção de quimiocinas e citocinas, vários tipos celulares, como as células endoteliais, epiteliais, fibroblastos e monócitos produzem a quimiocina MCP-1, tanto naturalmente ou após a indução por estresse oxidativo ou citocinas (47). As quimiocinas podem ser secretadas em resposta a citocinas pró-inflamatórias e atuam um importante papel no recrutamento seletivo de monócitos, neutrófilos e linfócitos em direção a sítios de infecção onde altas concentrações de

citocinas pró-inflamatórias tenham sido liberadas (47). Adicionalmente a sua capacidade de recrutar monócitos, a ação da MCP-1 também já foi descrita na patogênese de doenças renais associadas ao DM, onde os níveis séricos de MCP-1 aumentam com a presença da disfunção renal e são ainda maiores em pacientes em hemodiálise (47, 49). Além do mais, Daniele et al. (48) descreveu a MCP-1 como uma quimiocina fortemente correlacionada à resistência à insulina *in vivo* em humanos. Portanto, sabe-se que os monócitos e macrófagos são as principais células responsáveis pela produção de quimiocina e que a hiperglicemia pode ser a principal responsável pelo estresse oxidativo celular, a partir da produção de ROS (47, 48, 131-133). No entanto, nos nossos achados, tanto na primeira, quanto na terceira fase, não observou-se diferença na produção de MCP-1, mesmo levando em conta todos os estímulos, tais como diferentes concentrações de glicose, LPS ou rIFN- $\gamma$ , ainda mais por todos os grupos apresentarem 100% de viabilidade. Adicionalmente, apesar do IDR-1018 ser descrito como o mais potente indutor de quimiocinas (7, 9) e da LL-37 ser descrita como capaz de aumentar a produção de MCP-1 (134), os níveis obtidos de MCP-1 não se alteraram, quando comparados aos grupos controles. Um dos motivos que talvez possa explicar o resultado obtido de MCP-1, seja pelo fato da cultura utilizar apenas monócitos como tipo celular de teste, o que não necessitaria da atração de mais monócitos, ou ainda pela não ativação das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs), o que faz a célula responder a estímulos externos (9). Entretanto, num contexto mais amplo, em uma situação *in vivo*, também pode refletir a ausência de insuficiência renal ou de resistência à insulina (48).

O DM2 pode estar intimamente relacionado à inflamação crônica, o que conseqüentemente pode gerar uma infiltração de leucócitos e aumentar os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (126). No entanto, os efeitos da hiperglicemia sobre a resposta inflamatória ainda podem ser controversos. Estudos sugerem que a exposição de monócitos a altas concentrações de glicose pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  (135, 136). A hiperglicemia presente no DM pode causar efeitos diretos em vários componentes do sistema imune, mas principalmente nos componentes do sistema imune inato, como relatado anteriormente (36). Quando associada à obesidade, a inflamação crônica causada pela secreção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , pode resultar em maior resistência à insulina (137).

Sabe-se ainda que macrófagos podem ser altamente sensíveis a estimulação por LPS e também podem responder com a produção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis por eventos inflamatórios, como os comumente encontrados na hiperglicemia (138). Apesar disso, no presente estudo, os resultados demonstraram que as diferentes concentrações de glicose não foram capazes de induzir a produção de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  em macrófagos murinos, mesmo na presença de LPS, e com a viabilidade celular permanecendo em 100% em todos os grupos testados como previamente observado (126, 139, 140). Entretanto, na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018, foi detectado um aumento na produção de IL-1 $\alpha$ , o que sugere que as células podem ter sofrido modificações nos seus DAMPs, talvez por estresse celular devido a grande quantidade de estímulos aplicados, uma vez que a IL-1 $\alpha$  é uma citocina já presente no citosol celular e precisa somente de um estímulo de estresse para ser liberada (52, 53). Em contraste, Hill et al. (141) reportou que altos níveis de glicose (8 – 20 mM) inibem a liberação de IL-1 mas não a produção mediada por células RAW 264.7 e que esses efeitos causados pela glicose poderiam ser mediados pela ativação da proteína quinase C (PKC). Já a IL-6, em um primeiro momento, somente na presença das diferentes concentrações de glicose, LPS e rIFN- $\gamma$  sofreu um aumento na produção. Assim como, em um segundo momento, quando as várias concentrações do peptídeo IDR-1018 foram adicionadas a produção de IL-6 também sofreu aumento. Contudo, na segunda fase, quando as diferentes concentrações de LL-37 e DJK-6 foram adicionadas, houve uma redução na produção de IL-6, dado corroborado por Mookherjee et al. (142) que demonstrou que em monócitos THP-1, assim como em PBMCs *in vitro*, a presença do estímulo da LL-37 foi capaz de suprimir a produção de IL-6. Em um terceiro momento, onde apenas uma concentração (64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 foram adicionadas às culturas, as produções de IL-6 se mantiveram em níveis basais após todos os estímulos. Entretanto, o nível basal de produção da citocina foi considerado alto. Em contraste, o peptídeo catelecidina 2 (CATH-2) foi capaz de inibir a produção de IL-6 induzida por LPS em PBMCs humano *in vitro* (91).

A produção elevada de IL-6 no DM *in vivo*, como dito anteriormente, pode estar relacionada à nefropatia, aterosclerose ou obesidade. Todas essas complicações podem ocorrer pela presença da hiperglicemia crônica. Todavia, a produção elevada de IL-6, também se reflete também nas culturas *in vitro*, uma vez que mesmo a presença dos peptídeos não foi capaz de inibir ou pelo menos diminuir

a alta produção da citocina. Dado confirmado por Morohoshi et al. (61), que sugere que a presença de altas concentrações de glicose pode provocar o aumento da produção de IL-6 e por meio do mRNA em PBMCs de humanos.

Outro ponto importante relativo à IL-6 consiste no fato dela poder ser produzida em grandes quantidades por células tumorais (57). A linhagem RAW 264.7 consiste em uma linhagem celular derivada de uma leucemia murina e por isso, talvez os peptídeos, principalmente o IDR-1018, ao invés de inibir a produção do mediador, estimulem sua produção (143). Já o TNF- $\alpha$ , no primeiro momento, na presença apenas das diferentes concentrações de glicose, LPS e LPS e rIFN- $\gamma$ , não apresentou alteração na sua produção. Contudo, na maioria dos peptídeos testados, em grande parte dos grupos, houve uma redução da produção de TNF- $\alpha$ . Assim como na terceira fase, nos grupos testados apenas com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dos peptídeos LL-37 e IDR-1018 também ocorreu uma redução na produção de TNF- $\alpha$ . Esses resultados sugerem que apenas os estímulos de glicose não são capazes de alterar a produção de TNF- $\alpha$ . Mas que ao estimular as culturas com LPS e rIFN- $\gamma$ , os peptídeos podem ser capazes de diminuir a produção da citocina. A diminuição da produção de TNF- $\alpha$  pelos peptídeos LL-37 e IDR-1018 na presença de LPS e rIFN- $\gamma$  corrobora com dados apresentados por Pena et al. (102). Esse trabalho demonstra que o peptídeo IDR-1018 foi apresentado como um candidato promissor na modulação do sistema imune, capaz de reduzir significativamente a produção de TNF- $\alpha$ . Entretanto, segundo Mookherjee et al. (142), a presença de LL-37, aumenta seletivamente a produção de TNF- $\alpha$ . Os dados obtidos são semelhantes com os de Bowdish et al. (144), com o peptídeo indolicidina, outra catelecidina, que também diminui a produção de TNF- $\alpha$  na presença de LPS.

Já uma possível explicação para a não alteração na produção de TNF- $\alpha$  na primeira fase do estudo, pode ser devido a não liberação do fator de transcrição NF- $\kappa\text{B}$  do citoplasma para o núcleo, fator responsável pela transcrição do gene alvo para a produção da citocina (125). Em adição às principais citocinas pró-inflamatórias, outras citocinas importantes na resposta imune relacionada ao DM são as citocinas de perfil M1 e M2, IL-12 e IL-10, respectivamente. As APCs, os macrófagos, principalmente os de perfil M1 e M2, e as DCs produzem IL-12 e IL-10 quando ativadas (71, 145). A presença de rIFN- $\gamma$  promove um aumento da produção e secreção de IL-12, promovendo o chamado *feedback* positivo e já em relação a IL-

10, a presença de rIFN- $\gamma$  causa um bloqueio na produção de IL-10, promovendo o chamado *feedback* negativo (71, 77).

Levando em conta os resultados relativos à IL-12, as diferentes concentrações de glicose não foram capazes de alterar a produção da citocina. Contudo, quando estimuladas com LPS, houve um aumento na produção de IL-12, principalmente no grupo com 12 mM de D-glicose. Já nos grupos onde a concentração de 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de LL-37 e IDR-1018 foram testadas, a produção de IL-12 manteve os níveis basais de produção, diminuindo apenas nos grupos com LL-37 e LPS/rIFN- $\gamma$ , semelhante ao efeito modulador da clavanina A *in vivo*, que reduziu a produção da porção p70 da IL-12 (146). Assim como nas outras citocinas, a viabilidade dos grupos foi mantida em 100%.

Dados similares em outros estudos demonstraram que as altas concentrações de glicose podem estar envolvidas na alteração da resposta de macrófagos à LPS em modelos de animais diabéticos, fazendo com que a produção de IL-12 aumente (73). No estudo desenvolvido por Pena et al. (102), a presença do peptídeo IDR-1018 nas culturas de macrófagos em diferenciação promoveu apenas uma leve redução na produção de IL-12, corroborando com os nossos achados, uma vez que os níveis de IL-12 foram mantidos em níveis basais. Desta forma, a manutenção da produção em níveis basais pelo peptídeo IDR-1018 e na maioria dos grupos com LL-37, chegando até mesmo a diminuir a produção, na presença de LPS e rIFN- $\gamma$ , sugere um efeito protetor/imunomodulador dos peptídeos, evitando assim um possível dano celular. Esse dado foi corroborado por Scott et al. (96) e Nijnik et al. (147) que relatam que o gene responsável pela produção de IL-12 tem a sua expressão diminuída na presença de LL-37.

Já a produção de IL-10, a única citocina anti-inflamatória testada, pode ser responsável por limitar a ativação das células tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo para a manutenção da homeostase (71). Desta forma, a sua produção diminuiu na primeira fase, na presença de altas concentrações de glicose quando comparados aos grupos não estimulados. Entretanto, quando as células foram estimuladas com LPS, observou-se um aumento na produção de IL-10. Contudo, quando adicionado rIFN- $\gamma$  a produção de IL-10 voltou a cair, fato ocorrido devido a presença do rIFN- $\gamma$  que causa o processo de *feedback* negativo nas células. Em relação a viabilidade celular, não houve alteração na presença das diferentes concentrações de glicose, porém houve uma diminuição de aproximadamente 40%

nos grupos estimulados com 12 mM de D-glicose e LPS ou LPS e rIFN- $\gamma$  após 72h. De acordo com os estudos de Hu et al. (148), a presença de IFN resultou em uma redução da efetividade do IL-10 em diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuiu a expressão do MHC de classe II. Todavia, a produção de IL-10 não foi alterada na presença dos peptídeos LL-37 e IDR-1018. Dado que sugere que os peptídeos podem até possuir um efeito protetor, ou seja, não permitindo que as citocinas pró-inflamatórias se elevem. Contudo, o efeito imunomodulador não é observado, pois também não estimulam o aumento de IL-10. Entretanto, mesmo que na presença dos peptídeos não tenha ocorrido um aumento na produção de IL-10, comparados ao grupo controle, as produções basais de IL-10 foram altas quando comparadas as produções basais de IL-12. Em contraste, Scott et al. (96) relatou que o tratamento de células RAW 264.7 com o peptídeo LL-37 foi capaz de aumentar a expressão de IL-10, assim como nos experimentos realizados por Yu et al. (149), utilizando PBMCs humano *in vitro*.

A alta produção de IL-10 pode indicar uma possível polarização do tipo M2 pelos macrófagos da cultura, fato consistente com os achados de Pena et al. (102). Entretanto, em contraste com os dados de Torres-Castro et al. (78), que diz que em grandes quantidades de glicose, os macrófagos tendem a se polarizar em perfil M1, produzindo maior quantidade de IL-12 e citocinas pró-inflamatórias (150). Assim como os outros mediadores do sistema imune, o NO tem sido considerado um dos principais mediadores pró-inflamatórios e pode ser produzido principalmente por macrófagos ativados em resposta à infecções (44, 139). Hua et al. (139) demonstrou que somente altas concentrações de glicose não são suficientes para induzir a expressão de NO, porém a expressão de iNOS e a consequente produção de NO pode ser aumentada em células induzidas por LPS a partir da ativação do NF- $\kappa$ B em macrófagos murinos. Essa informação corrobora com os achados do estudo, onde houve um pico de produção de NO em 72h, principalmente nos grupos estimulados com LPS e LPS e rIFN- $\gamma$ , tanto na primeira fase, onde somente as diferentes concentrações de glicose estavam sendo testadas, quanto na terceira fase, principalmente na presença do peptídeo IDR-1018 (117).

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados das 3 diferentes fases demonstraram que:

- As diferentes concentrações de D-glicose alteram negativamente a viabilidade celular somente quando também estimuladas com LPS ou LPS e rIFN- $\gamma$ , após 72h.
- As diferentes concentrações de D-glicose sozinhas não são capazes de alterar a produção *in vitro* dos mediadores do sistema imune.
- Nenhum dos peptídeos testados foram capazes de afetar negativamente a viabilidade das culturas.
- Os peptídeos LL-37 e o DJK-6 diminuíram a produção de IL-6; a produção de TNF- $\alpha$  foi mantida a níveis basais pelo DJK-6 e reduzida pelo IDR-1018.
- Os níveis relativos à produção de NO foram praticamente mantidos por todos os peptídeos.
- Na terceira etapa, o peptídeo IDR-1018, demonstrou manter a viabilidade das culturas e manteve a produção dos principais mediadores a níveis basais, não permitindo que aumentassem.

Desta forma, levando em conta todos os resultados, o peptídeo IDR-1018 não demonstrou um efeito propriamente modulador *in vitro*. Todavia, sugere um efeito protetor, por não permitir que os níveis dos mediadores pró-inflamatórios aumentem e nem que o mediador anti-inflamatório diminua. Levando em conta que este é um estudo *in vitro*, ressalta-se as limitações das condições celulares estressantes e restritivas. Outro ponto que deve ser considerado, consiste no tempo de estímulo da glicose na cultura celular, que pode não ser suficiente para ser comparado com as situações de hiperglicemia *in vivo*.



## 8 REFERÊNCIAS

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional sixth ed: Guanabara Koogan 2000. 1251 p.
2. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World journal of diabetes. 2015;6(6):850-67.
3. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010;33(Suppl 1):S62-S9.
4. SMELTZER SC, BARE BG. Histórico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus. In: \_\_\_\_\_. Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 9 ed ed: Guanabara Koogan; 2002.
5. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJd. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2002;46:16-26.
6. FEITOSA-FILHO GS, FEITOSA ACR. Atualização em Perioperatório de Cardiopatas Submetidos a Cirurgia Não-Cardíaca. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2006;16(4).
7. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WR, Elliott M, Hilpert K, et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. Chemistry & biology. 2010;17(9):970-80.
8. Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. Journal of immunology. 2010;184(5):2539-50.
9. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock RE. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. Journal of leukocyte biology. 2013;94(1):159-70.
10. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. Pediatric Diabetes. 2009;10:3-12.
11. Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, Mottawea W, Wang GS, Abujamel T, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. Diabetes. 2015;64(12):4135-47.

12. Daoud AK, Tayyar MA, Fouda IM, Harfeil NA. Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. *J Immunotoxicol.* 2009;6(1):36-41.
13. Association AD. Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes 2015 [updated June 9, 2015. Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/>.
14. Mendes ABV, Fittipaldi JAS, Neves RCS, Chacra AR, Moreira ED. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brazil. *Acta Diabetologica.* 2010;47(2):137-45.
15. Organization WH. Global Report on Diabetes. Geneva: World Health Organization, 2016.
16. World Health Organization - Diabetes country profiles [press release]. 2016.
17. Gonzalez-Curiel I, Trujillo V, Montoya-Rosales A, Rincon K, Rivas-Calderon B, deHaro-Acosta J, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces LL-37 and HBD-2 production in keratinocytes from diabetic foot ulcers promoting wound healing: an in vitro model. *PloS one.* 2014;9(10):e111355.
18. Yin J, Yu F-SX. LL-37 via EGFR Transactivation to Promote High Glucose–Attenuated Epithelial Wound Healing in Organ-Cultured Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2010;51(4):1891-7.
19. Araújo LMB, Britto MMdS, Porto da Cruz TR. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2000;44:509-18.
20. Akbar DH. Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine.* 2003;20(3):215-8.
21. Salazar JJ, Ennis WJ, Koh TJ. Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 2015.
22. Association AD. Treatment and care <http://www.diabetes.org2016> [Available from: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/>].
23. Zomer E, Gurusamy K, Leach R, Trimmer C, Lobstein T, Morris S, et al. Interventions that cause weight loss and the impact on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews.* 2016:n/a-n/a.

24. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;advance online publication.
25. Raikwar SP, Kim E-M, Sivitz WI, Allamargot C, Thedens DR, Zavazava N. Human iPS Cell-Derived Insulin Producing Cells Form Vascularized Organoids under the Kidney Capsules of Diabetic Mice. *PloS one*. 2015;10(1):e0116582.
26. LSFM4LIFE. Production and characterization of endocrine cells derived from human pancreas organoids for cell-based therapy of type 1 diabetes 2016 [Available from: <http://lsfm4life.eu>].
27. Deacon CF, Lebovitz HE. Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016;18(4):333-47.
28. Monica Reddy RP, Inzucchi SE. SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Endocrine*. 2016:1-9.
29. Córdova Martínez A, Alvarez-Mon M. O sistema imunológico (I): conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 1999;5:120-5.
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Sixth ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
31. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. 767 p.
32. Girello AL, de Bellis Kühn TIB. *Fundamentos Da Imunohematologia Eritrocitaria*: Editora SENAC São Paulo; 2002.
33. Cruvinel WdM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Silva NPd, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010;50:434-47.
34. Nagatoshi F, Kazuo K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy*. 2005;4(3):281-6.
35. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Cruvinel WdM, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010;50:552-80.

36. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. *Am J Med Sci*. 2016;351(2):201-11.
37. Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Wykrętowicz A, Klimas R. The influence of increasing glucose concentrations on selected functions of polymorphonuclear neutrophils. *Acta diabetologia latina*. 1988;25(4):283-8.
38. Perner A, Nielsen SE, Rask-Madsen J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Medicine*. 2003;29(4):642-5.
39. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al. High Glucose Causes Upregulation of Cyclooxygenase-2 and Alters Prostanoid Profile in Human Endothelial Cells: Role of Protein Kinase C and Reactive Oxygen Species. *Circulation*. 2003;107(7):1017-23.
40. Kim S-H, Park K-W, Kim Y-S, Oh S, Chae I-H, Kim H-S, et al. Effects of Acute Hyperglycemia on Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Diabetes Mellitus or Impaired Glucose Metabolism. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2003;10(2):65-70.
41. Bahia L, Aguiar LGKd, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50:291-303.
42. Moura HVd, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2001;16:376-87.
43. Hennessey PJ, Black CT, Andrassy RJ. Nonenzymatic Glycosylation of Immunoglobulin G Impairs Complement Fixation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1991;15(1):60-4.
44. Spinass GA. The Dual Role of Nitric Oxide in Islet beta-Cells. *News Physiol Sci*. 1999;14:49-54.
45. D'Ávila VGdFC, Sousa Júnior NBd, Sousa FBd, Guillo LA. Avaliação da produção de óxido nítrico em ratos, submetidos aos exercícios aeróbio e anaeróbio. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008;44:755-61.
46. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(6):1157-62.

47. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.
48. Daniele G, Guardado Mendoza R, Winnier D, Fiorentino TV, Pengou Z, Cornell J, et al. The inflammatory status score including IL-6, TNF- $\alpha$ , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*. 2014;51(1):123-31.
49. Grzegorzewska AE, Pajzderski D, Sowinska A, Jagodzinski PP. Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1 -2518 A/G) and responsiveness to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Pol Arch Med Wewn*. 2014;124(1-2):10-8.
50. Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M. High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;305(1):122-8.
51. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.
52. Brough D, Denes A. Interleukin-1 $\alpha$  and brain inflammation. *IUBMB Life*. 2015;67(5):323-30.
53. Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1 $\alpha$ . *Seminars in Immunology*. 2013;25(6):430-8.
54. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(15–16):1163-70.
55. LeRoith D.  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *The American Journal of Medicine*. 113(6):3-11.
56. Zhou Y-Q, Liu Z, Liu Z-H, Chen S-P, Li M, Shahveranov A, et al. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13:141.
57. Ho L-J, Luo S-F, Lai J-H. Biological effects of interleukin-6: Clinical applications in autoimmune diseases and cancers. *Biochemical Pharmacology*. 2015;97(1):16-26.
58. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DL. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of Clinical Pathology*. 2014;67(11):932-7.

59. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. *Cardiology in Review*. 2014;22(3).
60. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70(1):11-20.
61. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimuraa I, Numano F. Glucose-Dependent Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor Production by Human Peripheral Blood Monocytes In Vitro. *Diabetes*. 1996;45(7):954-9.
62. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(12):4196-200.
63. Qu D, Liu J, Lau CW, Huang Y. IL-6 in diabetes and cardiovascular complications. *British journal of pharmacology*. 2014;171(15):3595-603.
64. Jurjus A, Eid A, Al Kattar S, Zeenny MN, Gerges-Geagea A, Haydar H, et al. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clinical*. 2016;5:16-24.
65. Ramseyer VD, Garvin JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : regulation of renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2013;304(10):F1231-F42.
66. Wu Y, Zhou BP. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*. 2010;102(4):639-44.
67. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(1):49-62.
68. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
69. Carvalho MHCd, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50:304-12.
70. Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal Cell Responses and Role of TNF- $\alpha$  in Impaired Diabetic Wound Healing. *BioMed Research International*. 2013;2013:754802.

71. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research*. 2015;4:F1000 Faculty Rev-465.
72. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994;84(12):4008-27.
73. Wen Y, Gu J, Li S-L, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL. Elevated Glucose and Diabetes Promote Interleukin-12 Cytokine Gene Expression in Mouse Macrophages. *Endocrinology*. 2006;147(5):2518-25.
74. Apostolopoulos V, de Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016;60(1):43-57.
75. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81.
76. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):683-765.
77. Cope A, Le Friec G, Cardone J, Kemper C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- $\gamma$  to IL-10 switching. *Trends in Immunology*. 2011;32(6):278-86.
78. Torres-Castro I, Arroyo-Camarena ÚD, Martínez-Reyes CP, Gómez-Arauz AY, Dueñas-Andrade Y, Hernández-Ruiz J, et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. *Immunology letters*. 2016;176:81-9.
79. Robinson MA, Baumgardner JE, Otto CM. Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(11):1952-65.
80. Lee J, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Medical Journal*. 2016;52(2):81-90.
81. Molina MN, Ferder L, Manucha W. Emerging Role of Nitric Oxide and Heat Shock Proteins in Insulin Resistance. *Current Hypertension Reports*. 2015;18(1):1-13.
82. Wajchenberg BL. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46:514-9.

83. Betz B, Conway BR. An Update on the Use of Animal Models in Diabetic Nephropathy Research. *Current Diabetes Reports*. 2016;16:18.
84. Chellat MF, Raguz L, Riedl R. Targeting Antibiotic Resistance. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016.
85. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2014;15(10):1351-70.
86. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:321.
87. Lim S, Koo J-H, Choi J-M. Use of Cell-Penetrating Peptides in Dendritic Cell-Based Vaccination. *Immune Network*. 2016;16(1):33-43.
88. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009;30(3):131-41.
89. Beaumont PE, Li H-N, Davidson DJ. LL-37: An Immunomodulatory Antimicrobial Host Defence Peptide. In: Hiemstra SP, Zaat JSA, editors. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. Basel: Springer Basel; 2013. p. 97-121.
90. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol*. 2013;9(12):761-8.
91. van Dijk A, van Eldik M, Veldhuizen EJ, Tjeerdsma-van Bokhoven HL, de Zoete MR, Bikker FJ, et al. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activities of Chicken Cathelicidin-2 Derived Peptides. *PloS one*. 2016;11(2):e0147919.
92. Gupta K, Subramanian H, Ali H. Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS. *Innate Immun*. 2016;22(1):21-30.
93. Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, et al. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016;64:33-46.
94. Machado LR, Ottolini B. An Evolutionary History of Defensins: A Role for Copy Number Variation in Maximizing Host Innate and Adaptive Immune Responses. *Frontiers in immunology*. 2015;6:115.
95. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:404.



96. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of immunology*. 2002;169(7):3883-91.
97. Torres-Juarez F, Cardenas-Vargas A, Montoya-Rosales A, Gonzalez-Curiel I, Garcia-Hernandez MH, Enciso-Moreno JA, et al. LL-37 immunomodulatory activity during *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4495-503.
98. Steinstraesser L, Hirsch T, Schulte M, Kueckelhaus M, Jacobsen F, Mersch EA, et al. Innate Defense Regulator Peptide 1018 in Wound Healing and Wound Infection. *PloS one*. 2012;7(8):e39373.
99. Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, et al. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotech*. 2007;25(4):465-72.
100. Madera L, Hancock RE. Anti-infective peptide IDR-1002 augments monocyte chemotaxis towards CCR5 chemokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(3):800-6.
101. Lee HY, Bae YS. The anti-infective peptide, innate defense-regulator peptide, stimulates neutrophil chemotaxis via a formyl peptide receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;369(2):573-8.
102. Pena OM, Afacan N, Pistolic J, Chen C, Madera L, Falsafi R, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PloS one*. 2013;8(1):e52449.
103. Morgenthau A, Partha SK, Adamiak P, Schryvers AB. The specificity of protection against cationic antimicrobial peptides by lactoferrin binding protein B. *Biometals*. 2014;27(5):923-33.
104. Rivas-Santiago B, Castaneda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook M, Gonzalez-Curiel I, Leon-Contreras JC, et al. Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models. *PloS one*. 2013;8(3):e59119.
105. Madera L, Hancock REW. Synthetic Immunomodulatory Peptide IDR-1002 Enhances Monocyte Migration and Adhesion on Fibronectin. *Journal of Innate Immunity*. 2012;4(5-6):553-68.
106. Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, et al. Synthetic Cationic Peptide IDR-1002 Provides Protection against Bacterial Infections

through Chemokine Induction and Enhanced Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology*. 2010;184(5):2539-50.

107. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernández D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multi-drug resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry & biology*. 2015;22(2):196-205.

108. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(1):37-51.

109. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4673-9.

110. Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:128.

111. Garcia-Hernandez A, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. 2012;50(1):276-88.

112. Maggiora LL, Smith CW, Zhang ZY. A general method for the preparation of internally quenched fluorogenic protease substrates using solid-phase peptide synthesis. *Journal of medicinal chemistry*. 1992;35(21):3727-30.

113. MURPHY J, KIES M. Note on the spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. *Boichimica et biophysica acta*. 1960;3:382-4

.

114. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261-7.

115. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

116. VAN DE LOOSDRECHT AA, NENNIE E, OSSENKOPPELE GJ, BEELEN RHJ, LANGERHUIJSEN MMAC. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. *Journal of Immunological Methods*. 1991;141:15-22.

117. Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuaria AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida*

albicans and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *Journal of endodontics*.

2015;41(7):1061-5.

118. Shih MF, Chen LC, Cherng JY. Chlorella 11-peptide inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules and reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability. *Mar Drugs*. 2013;11(10):3861-74.

119. Rezende TM, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *Int Endod J*. 2005;38(12):896-903.

120. Song Y, Liu X, Yue H, Ji J, Dou H, Hou Y. Anti-inflammatory effects of benzenediamine derivate FC-98 on sepsis injury in mice via suppression of JNK, NF-kappaB and IRF3 signaling pathways. *Molecular immunology*. 2015;67(2 Pt B):183-92.

121. Lee C, Lee JW, Seo JY, Hwang SW, Im JP, Kim JS. Lupeol inhibits LPS-induced NF-kappa B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis. *Life Sci*. 2016;146:100-8.

122. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, et al. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3170-9.

123. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [<sup>15</sup>N]Nitrate in Biological Fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126:131-8.

124. Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:1227-39.

125. Jia Y, Zheng Z, Wang Y, Zhou Q, Cai W, Jia W, et al. SIRT1 is a regulator in high glucose-induced inflammatory response in RAW264.7 cells. *PloS one*. 2015;10(3):e0120849.

126. de Souza LF, Jardim FR, Sauter IP, de Souza MM, Bernard EA. High glucose increases RAW 264.7 macrophages activation by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Clin Chim Acta*. 2008;398(1-2):130-3.

127. Sun Y, Shang D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:167572.

128. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(2):163-89.

129. Kumar P, Swain MM, Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;73:82-98.
130. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(5):321-34.
131. Zheng H, Wu J, Jin Z, Yan L-J. Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications. *Biochemistry Insights*. 2016;9:1-9.
132. Wright E, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *International Journal of Clinical Practice*. 2006;60(3):308-14.
133. Maciel FR, Punaro GR, Rodrigues AM, Bogsan CS, Rogero MM, Oliveira MN, et al. Immunomodulation and nitric oxide restoration by a probiotic and its activity in gut and peritoneal macrophages in diabetic rats. *Clin Nutr*. 2015.
134. Mansour SC, Pena OM, Hancock RE. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol*. 2014;35(9):443-50.
135. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells. *Diabetes*. 2003;52(5):1256-64.
136. Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Gene Expression in Monocytic Cells via Hyperglycemia-induced Oxidant Stress-dependent and -independent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(23):17728-39.
137. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(1):15-28.
138. Qureshi AA, Guan XQ, Reis JC, Papasian CJ, Jabre S, Morrison DC, et al. Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. *Lipids in Health and Disease*. 2012;11:76-.
139. Hua KF, Wang SH, Dong WC, Lin CY, Ho CL, Wu TH. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- $\alpha$ / $\delta$  and NF- $\kappa$ B. *Inflammation research* :

official journal of the European Histamine Research Society [et al].

2012;61(10):1107-16.

140. Lo C-J. Upregulation of Cyclooxygenase-II Gene and PGE<sub>2</sub> Production of Peritoneal Macrophages in Diabetic Rats<sup>1</sup>. *Journal of Surgical Research*. 2005;125(2):121-7.

141. Hill JR, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML. Hyperglycemic Levels of Glucose Inhibit Interleukin 1 Release from RAW 264.7 Murine Macrophages by Activation of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(6):3308-13.

142. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. *The Journal of Immunology*. 2006;176(4):2455-64.

143. Ralph P, Nakoinz I. Antibody-Dependent Killing of Erythrocyte and Tumor Targets by Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement by PPD and LPS. *The Journal of Immunology*. 1977;119(3):950-4.

144. Bowdish DME, Davidson DJ, Scott MG, Hancock REW. Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(5):1727-32.

145. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers in immunology*. 2015;6:637.

146. Silva ON, Fensterseifer IC, Rodrigues EA, Holanda HH, Novaes NR, Cunha JP, et al. Clavanin A improves outcome of complications from different bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1620-6.

147. Nijnik A, Pistollic J, Wyatt A, Tam S, Hancock REW. Human Cathelicidin Peptide LL-37 Modulates the Effects of IFN- $\gamma$  on APCs. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5788-98.

148. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of IFN and TLR Signaling During Macrophage Activation by Opposing Feedforward and Feedback Inhibition Mechanisms. *Immunological reviews*. 2008;226:41-56.

149. Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DME, Pistollic J, Li Y, et al. Host Defense Peptide LL-37, in Synergy with Inflammatory Mediator IL-1 $\beta$ , Augments Immune Responses by Multiple Pathways. *The Journal of Immunology*. 2007;179(11):7684-91.

150. Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):17-23.

## 9 ANEXO A – ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES

Figura 31 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95%.

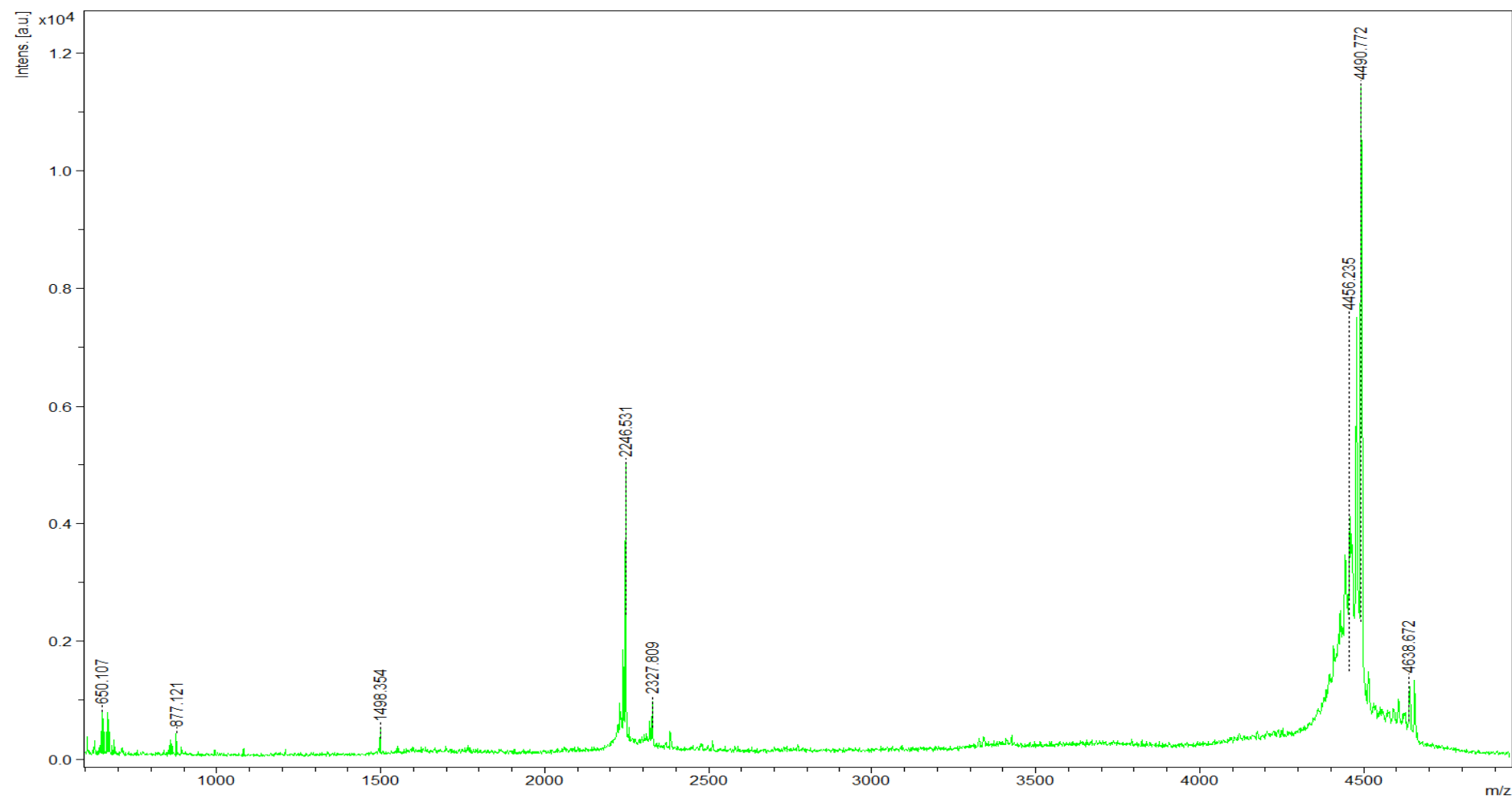


Figura 32 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%.

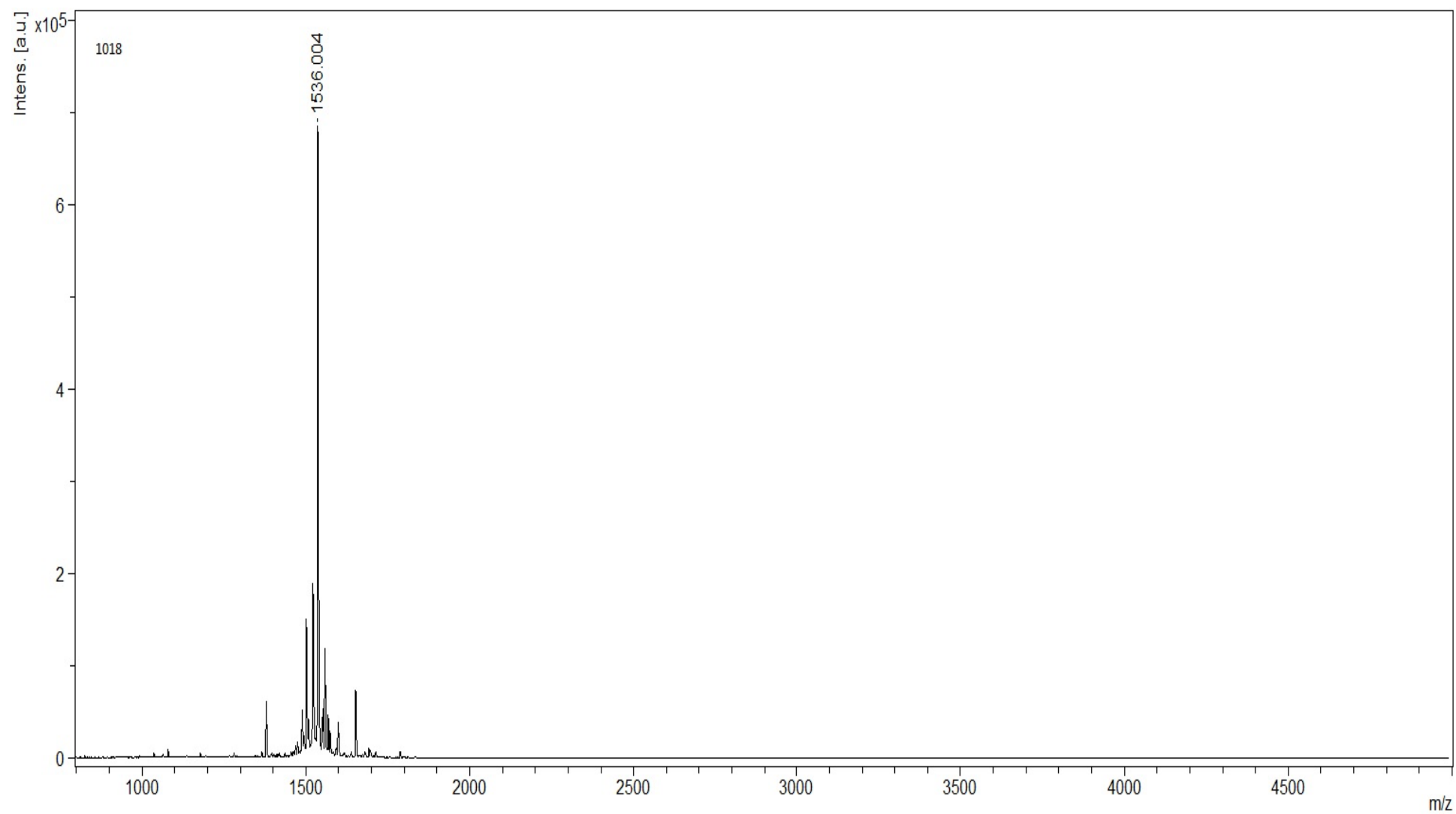




Figura 33 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1002 (1652,1 Da), com pureza superior a 95%.

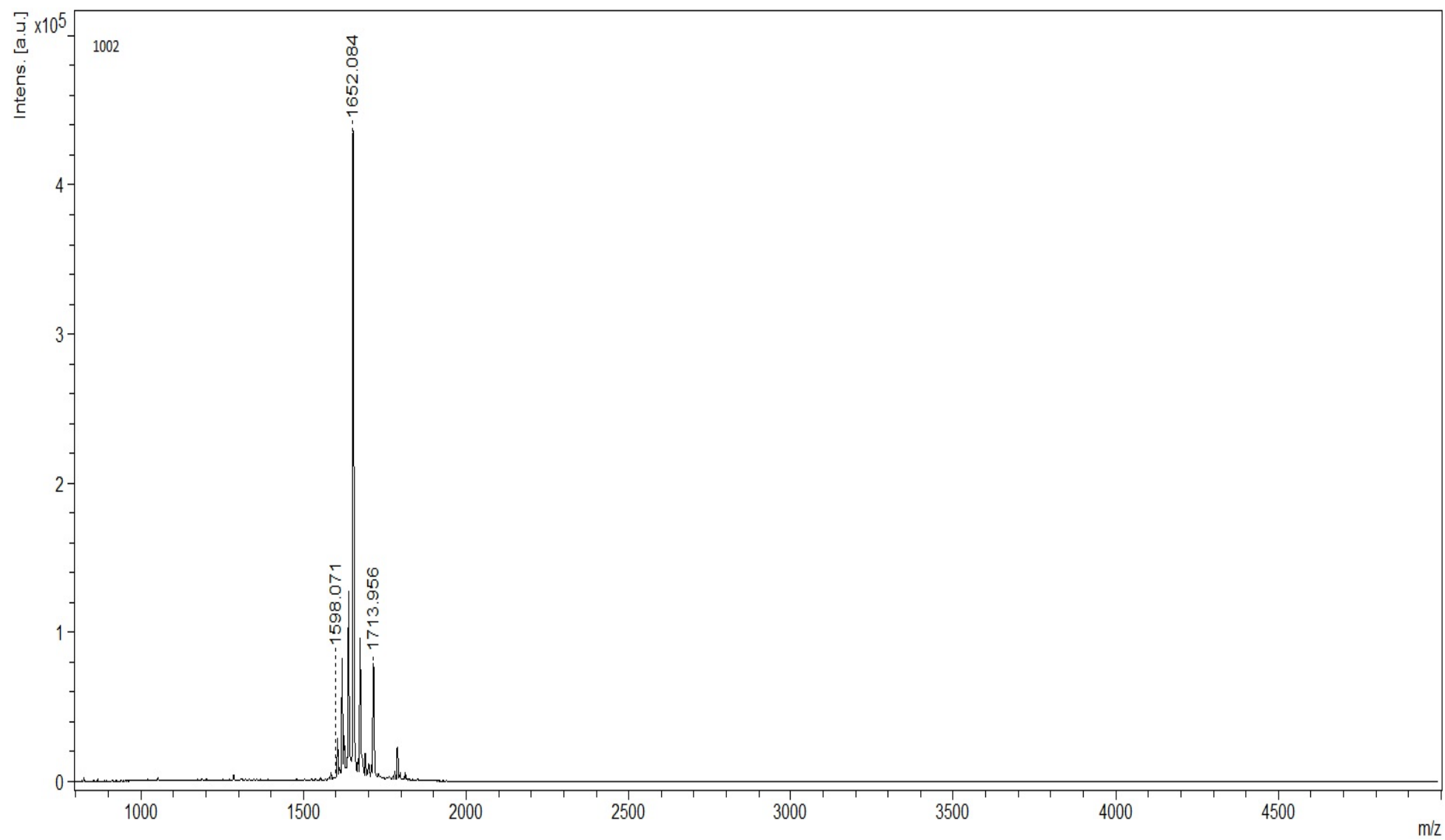


Figura 34 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo DJK-6 (1666,9 Da), com pureza superior a 95%.

