

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO LL-37 E IDR-1018  
EM AMBIENTE DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NOS PROCESSOS  
DE OSTEOCLASTOGÊNESE, MINERALIZAÇÃO E MIGRAÇÃO *IN VITRO*

BRASÍLIA, 2021

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

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO LL-37 E IDR-1018  
EM AMBIENTE DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NOS PROCESSOS  
DE OSTEOCLASTOGÊNESE, MINERALIZAÇÃO E MIGRAÇÃO *IN VITRO*

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Doutora 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

2021

ANA PAULA DE CASTRO CANTUÁRIA

AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO LL-37 E IDR-1018  
EM AMBIENTE DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NOS PROCESSOS  
DE OSTEOCLASTOGÊNESE, MINERALIZAÇÃO E MIGRAÇÃO *IN VITRO*

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

Aprovado em 30 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Taia Maria Berto Rezende (presidente)  
Universidade de Brasília - UnB

Marcelo José Barbosa Silva  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Robert Edward Pogue  
Universidade Católica de Brasília – UCB

Angélica Amorim Amato  
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 **Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende**, pela excelente orientação que me foi prestada, suporte, compreensão 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. Angélica Amorim Amato**, **Prof. Dr. Robert Edward Pogue**, **Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva** e **Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra** pela disponibilidade em avaliar e contribuir;

Aos grandes amigos **Ingrid Aquino**, **Poliana Silva**, **Stella Lima**, **Danilo Martins** por todo o companheirismo e ajuda extraordinárias;

À amiga **Elaine Dantas** pela preocupação e ajuda no momento mais difícil;

Aos amigos de laboratório e de vida **Mirna Freire**, **Nelson de Oliveira Júnior**, **Flávia Dutra**, **Jeeser Almeida**, **Kênia Chaves**, **Camila Guimarães** por sempre estarem ao meu lado na torcida;

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

Aos meus pais **Vicente Cantuária Júnior** e **Luciana Cantuária**, e ao meu irmão **Vinicius Cantuária**, por todo o incentivo, a preocupação, suporte 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 queridos amigos **Henrique Guariento**, **Phellipe Salomão**, **Gabriela Ribeiro**, **Soraya Maia** e **Olga Moraes**, que mesmo sem entender muito bem o que eu faço sempre estão na minha torcida e por serem os mais companheiros e compreensivos;

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

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica **Miguel Sartori**, **Marcelo Melo**, **Érica Pacheco**, **Camyla Ribeiro**, **Laura Pimentel**, **Suelen Resende**, **Natália Cardoso**, **Louise Tavares**, **Daniele Félix**, **Gisleine Masson**, **Aline Lopes**, **Hellen Pereira** e **Alessandra Freitas** por toda a torcida e suporte;

À **Profa. Dra. Juliana Lott** e à colega **Thuany Alencar** pela ajuda prestada;

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

Ao **Biodonto Research Group** e 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.

*“A ciência será sempre uma busca, jamais  
uma descoberta. É uma viagem, nunca uma  
chegada.”  
(Karl Popper)*

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica de importância mundial. Dentre as complicações sistêmicas causadas pelo DM já amplamente descritas, a fragilidade óssea diabética e a cicatrização de feridas prejudicada são algumas das que merecem atenção. Nesse sentido, os peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) podem ser alternativas promissoras de tratamento adjuvante para essas duas complicações. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo verificar os efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 nos processos de osteoclastogênese, mineralização e migração *in vitro*. Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) foram utilizadas para os testes envolvendo osteoclastogênese *in vitro*, células SaOs-2 para os testes envolvendo mineralização *in vitro* e fibroblastos humanos (hFIB) para os testes envolvendo migração *in vitro*. No processo de osteoclastogênese, os peptídeos IDR-1018 e LL-37 não alteraram a viabilidade celular, induziram a produção de óxido nítrico (NO), inibiram a diferenciação de osteoclastos, reduziram a produção de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , não alteraram a produção de interleucina (IL)-6 e melhoraram a produção de IL-10. Já nos testes envolvendo a mineralização, o IDR-1018 reduziu a viabilidade celular e LL-37 não apresentou citotoxicidade. Relativo ao fosfato, o IDR-1018 manteve os níveis de fosfato, enquanto o LL-37 o apresentou redução. Em relação à atividade de fosfatase alcalina (ALP), o IDR-1018 promoveu aumento e o LL-37 a manteve estável, e quando avaliada a formação da matriz mineralizada, ambos os peptídeos apresentaram efeito positivo. Para os testes envolvendo hFIB, o IDR-1018 manteve a viabilidade celular, os estímulos de 15% de soro fetal bovino (SFB) e 24 mM de D-glicose foi o que promoveu maior taxa de proliferação e após 48h, a concentração de 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do IDR-1018 foi a que promoveu o maior número de células migradas. Assim, considerando os tratamentos disponíveis para a fragilidade óssea, tanto o IDR-1018 quanto o LL-37 apresentam-se como uma alternativa de tratamento adjuvante. No entanto, em relação ao processo de cicatrização, mais estudos são necessários para uma melhor avaliação do efeito do IDR-1018.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus; fragilidade óssea diabética; ferida diabética; osteoclastogênese; mineralização; migração; IDR-1018; LL-37.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease of worldwide importance. Among the systemic complications caused by DM, diabetic bone fragility and impaired wound healing are some of the ones that deserve attention. In this sense, host defense peptides (HDPs) may be promising alternatives for adjuvant treatment for these two complications. Thus, this work aimed to verify the effects of IDR-1018 and LL-37 peptides in osteoclastogenesis, mineralization, and migration processes *in vitro*. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used for the testes involving osteoclastogenesis *in vitro*, SaOs-2 cells for the tests involving *in vitro* mineralization, and human fibroblasts (hFIB) for the testes involving *in vitro* migration. In the osteoclastogenesis process, the peptides IDR-1018 and LL-37 did not change cell viability, induced the production of nitric oxide (NO), inhibited osteoclast differentiation, reduced the production of tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , did not alter the production of interleukin (IL)-6 and improved the production of IL-10. In tests involving mineralization, IDR-1018 reduced cell viability, and LL-37 did not show cytotoxicity. Relative to phosphate, IDR-1018 resulted in phosphate levels, while LL-37 resulted in a reduction. Concerning alkaline phosphatase (ALP) activity, IDR-1018 promoted an increase, and LL-37 remained, and when the formation of the mineralized matrix was evaluated, both peptides had a positive parallel effect. For tests involving hFIB, IDR-1018 maintained cell viability, 15% fetal bovine serum (FBS), and 24 mM D-glucose stimuli promoted the highest proliferation rate. After 48h, the concentration of 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of IDR-1018 promoted the highest number of migrated cells. Thus, considering the treatments available for bone fragility and diabetic wounds, both IDR-1018 and LL-37 are presented as alternative adjuvant treatments. However, regarding the healing process, more studies are needed to better assess the effect of IDR-1018.

**Keywords:** Diabetes mellitus; diabetic bone fragility; diabetic wound; osteoclastogenesis; mineralization; migration; IDR-1018; LL-37.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura representativa em 3D do peptídeo LL-37 por ressonância magnética nuclear (NMR) \_\_\_\_\_ 30
- Figura 2 – Representação esquemática da ação do peptídeo LL-37 em células do hospedeiro \_\_\_\_\_ 32
- Figura 3 - Estrutura representativa em 3D do peptídeo IDR-1018 por ressonância magnética nuclear (NMR) \_\_\_\_\_ 34
- Figura 4 – Etapas de desenvolvimento do estudo \_\_\_\_\_ 38
- Figura 5 - Linha do tempo dos ensaios relacionados ao processo de reabsorção óssea \_\_\_\_\_ 41
- Figura 6 - Linha do tempo dos ensaios relacionados ao processo de mineralização \_\_\_\_\_ 47
- Figura 7 - Viabilidade celular de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 24h \_\_\_\_\_ 56
- Figura 8 - Produção de NO por macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 24h \_\_\_\_\_ 58
- Figura 9 - Coloração TRAP para osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias \_\_\_\_\_ 61
- Figura 10 - Coloração TRAP para osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias \_\_\_\_\_ 61
- Figura 11 - Osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias \_\_\_\_\_ 62

Figura 12 - Número de núcleos por osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano _____	63
Figura 13 - Produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por macrófagos derivados de PBMC humano <i>in vitro</i> _____	66
Figura 14 - Viabilidade celular de células SaOs-2 <i>in vitro</i> em condições osteogênicas (ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona), após 21 dias _____	68
Figura 15 - Quantificação de fosfato inorgânico no sobrenadante de células SaOs-2 <i>in vitro</i> sob condições osteogênicas (ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona), após 21 dias _____	69
Figura 16 - Atividade da enzima ALP por miligrama de proteína em lisado de células SaOs-2 cultivadas em condições osteogênicas (ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona) <i>in vitro</i> , após 21 dias _____	70
Figura 17 - Coloração e quantificação da coloração vermelho de alizarina para mineralização de células SaOs-2 sob condições osteogênicas (ácido ascórbico, $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona) <i>in vitro</i> , após 21 dias _____	72
Figura 18 - Viabilidade celular de células hFIB <i>in vitro</i> , após 24h _____	73
Figura 19 - Proliferação celular de células hFIB <i>in vitro</i> , após 0, 24, 48, 72, 96 e 120h _____	74
Figura 20 - Número de células hFIB migradas <i>in vitro</i> , após <i>scratch</i> em 24 e 48h _____	76
Figura 21 - Migração de células hFIB <i>in vitro</i> , após <i>scratch</i> em 0, 24 e 48h _____	77
ANEXO A – Figura 1 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95% _____	103

ANEXO A – Figura 2 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%	104
ANEXO C – Artigo 1 - <b>Cantuária APC</b> , Figueiredo TM, Freire MS, Lima SMF, Almeida JA, Franco OL, et al. The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells. Cytokine [Internet]. 2018	106
ANEXO D – Artigo 1 - Artigo submetido na revista <i>Peptide Science</i>	107
ANEXO D – Artigo 2 - Artigo submetido na revista <i>ACS Applied Bio Materials</i>	108
ANEXO D – Artigo 3 - Artigo a ser submetido na revista <i>Peptides</i>	109
ANEXO E – Artigo 1 - Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, <b>Cantuária APC</b> , Júnior NGO, Santos TS, et al. An immunomodulatory peptide confers protection in an experimental candidemia murine model. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . 2017;61(8)	110
ANEXO E – Artigo 2 - Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, <b>Cantuária APC</b> , Dutra FRP, Magalhães BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, in vitro: An endodontic perspective. <i>Peptides</i> . 2017;95	111
ANEXO E – Artigo 3 - Dantas EMGL, Lima SMF, <b>Cantuária APC</b> , Amorim IA, Almeida JA, Cunha TF, et al. Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Journal of Cellular Physiology</i> . 2019;234(9)	112
ANEXO E – Artigo 4 - Nogueira ME, Sousa Neto IV, Motta-Santos D, <b>Cantuária APDC</b> , Lima SMDF, Rezende TMB, et al. High-protein diet associated with resistance training reduces cardiac TNF- $\alpha$ levels and up-regulates MMP-2 activity in rats. <i>Archives of Physiology and Biochemistry</i> . 2020	113

ANEXO E – Artigo 5 - Lima SMF, Freire MS, **Cantuária APC**, Martins DCM, Amorim IA, Dantas EMGL, et al. The use of host defense peptides in root canal therapy in rats. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25(6) \_\_\_\_\_ 114

ANEXO E – Artigo 6 - Sousa MGC, Xavier PD, **Cantuária AP de C**, Porcino RA, Almeida JA, Franco OL, et al. Host defense peptide IDR-1002 associated with ciprofloxacin as a new antimicrobial and immunomodulatory strategy for dental pulp revascularization therapy. *Microbial Pathogenesis*. 2021;152 \_\_\_\_\_ 115

ANEXO E – Artigo 7 - Amorim IA, de Freitas Lima SM, **de Castro Cantuária AP**, de Souza Freire M, de Almeida JA, Franco OL, et al. Host Defense Peptides Clavanins A and Mo Reduce in Vitro Osteoclastogenesis. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2021;20 \_\_\_\_\_ 116

ANEXO E – Artigo 8 - Medeiros CS, de Sousa Neto IV, Silva KKS, **Cantuária APC**, Rezende TMB, Franco OL, de Cassia Marqueti R, Freitas-Lima LC, Araujo RC, Yildirim A, Mackenzie R, Alves Almeida J. The Effects of High-Protein Diet and Resistance Training on Glucose Control and Inflammatory Profile of Visceral Adipose Tissue in Rats. *Nutrients*. 2021; 13(6):1969 \_\_\_\_\_ 117

ANEXO E – Artigo 9 - Sousa MGC, Xavier PD, **Cantuária APC**, Amorim IA, Almeida JA, Franco OL, et al. Antimicrobial and immunomodulatory in vitro profile of double antibiotic paste. *International Endodontic Journal* [Internet]. 2021 May 25;n/a(n/a) 118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de reabsorção óssea \_\_\_\_\_ 41

Tabela 2 - Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de deposição óssea \_\_\_\_\_ 46

Tabela 3 - Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de cicatrização tecidual \_\_\_\_\_ 50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – Associação Americana de Diabetes  
AGE – Produto de glicosilação avançada  
ALP – Fosfatase alcalina  
BMM – Macrófagos derivados de medula óssea  
CHDPs - Peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro  
Covid-19 – Doença do coronavírus 19  
DM – Diabetes Mellitus  
DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1  
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2  
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
DMG – Diabetes Mellitus gestacional  
DMO – Densidade mineral óssea  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EGF - Fator de crescimento epidérmico  
EGFR - Receptor de fator de crescimento da epidérmico  
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
FPRL – Receptor de peptídeo formil semelhante ao humano  
GAD – Anticorpos glutamato-descarboxilase  
HbA1c – Hemoglobina glicada  
hBD2 – Beta-defensina-2 humana  
HDP – Peptídeo de defesa do hospedeiro  
hFIB - Fibroblastos humanos  
HNPs - Peptídeos de neutrófilos humanos  
HSCs – Células-tronco hematopoiéticas  
IDF – Federação Internacional de Diabetes  
IDRs – Peptídeos reguladores da defesa inata  
IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina  
IL – Interleucina  
IMC – Índice de massa corporal  
IFN-  $\gamma$  - interferon gama

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LPS – Lipopolisacarídeo

M-CSF – Fator estimulador de colônia de monócito/macrófagos

MALDI-ToF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

MCP - Proteína quimioatraente de monócitos

MEM - *Minimum Essential Medium*

MMP – Metaloproteinase de matriz

MSC – Células-tronco mesenquimais

NF-κB – Fator Nuclear kappa B

NMR - Ressonância magnética nuclear

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPG – Osteoprotegerina

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos

PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico humano

PBS - Tampão fosfato salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

P<sub>i</sub> - Fosfato inorgânico

pNPP - p-Nitrofenil fosfato

PPAR<sub>γ</sub> – Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PTH – Hormônio da Paratireoide

RAGE – Receptor de produto de glicosilação avançada

RANKL – Receptor ativador de fator de kappa-B ligante

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RT- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa por tempo de retenção

SFB - Soro fetal bovino

sRANKL - Ligante do receptor de ativação nuclear fator kappa B solúvel

TGF-β1 - Fator de transformação do crescimento beta 1

TLR – Receptores do tipo *toll-like*

TNF – Fator de Necrose tumoral

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>TECIDO ÓSSEO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>CICATRIZAÇÃO TECIDUAL</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES</b> .....	<b>28</b>
2.4.1	Peptídeo LL-37 .....	30
2.4.2	Peptídeo IDR-1018.....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>36</b>
3.1.1	Objetivos específicos .....	36
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS</b> .....	<b>39</b>
4.2.1	Purificação do peptídeo LL-37 e quantificação dos peptídeos LL-37 e IDR-1018.....	39
<b>4.3</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA - OSTEOCLASTOS DERIVADOS DE PBMCS</b> .....	<b>40</b>
4.3.1	Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano .....	42
4.3.2	Condições de cultura e grupos experimentais para o ensaio de osteoclastogênese .....	43
4.3.3	Viabilidade celular .....	43
4.3.4	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	44
4.3.5	Coloração de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).....	45
4.3.6	Dosagem de citocinas .....	45

<b>4.4</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA - OSTEOLASTOS DERIVADOS DE SAOS-2.....</b>	<b>46</b>
4.4.1	Condições de cultura e grupos experimentais para o ensaio de osteoblastogênese .....	47
4.4.2	Viabilidade celular .....	48
4.4.3	Determinação de formação de matriz mineral .....	48
4.4.3.1	Quantificação da formação de matriz mineral.....	48
4.4.3.2	Quantificação de fosfato inorgânico.....	49
4.4.4	Determinação de fosfatase alcalina (ALP).....	49
<b>4.5</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TECIDUAL - FIBROBLASTO HUMANO (HFIB).....</b>	<b>51</b>
4.5.1	Condições de cultura de células hFIB.....	52
4.5.2	Ensaio de proliferação celular .....	52
4.5.3	Teste de migração.....	53
4.5.4	Viabilidade celular .....	53
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA - OSTEOLASTOS DERIVADOS DE PBMCS.....</b>	<b>55</b>
5.1.1	Viabilidade celular .....	55
5.1.2	Produção de óxido nítrico (NO).....	57
5.1.3	Coloração de TRAP .....	59
5.1.3.1	Número de núcleos por osteoclasto diferenciado.....	63
5.1.4	Produção de citocinas .....	64
5.1.4.1	Citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ e IL-6.....	64
5.1.4.2	Citocina anti-inflamatória IL-10 .....	65
<b>5.2</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA - OSTEOLASTOS DERIVADOS DE SAOS-2.....</b>	<b>67</b>
5.2.1	Viabilidade celular .....	67
5.2.2	Quantificação de fosfato inorgânico .....	69
5.2.3	Quantificação de fosfatase alcalina (ALP) .....	70
5.2.4	Coloração e quantificação de vermelho de alizarina.....	71

<b>5.3</b>	<b>ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO</b>	
	<b>TECIDUAL - FIBROBLASTO HUMANO (HFIB).....</b>	<b>73</b>
5.3.1	Viabilidade celular .....	73
5.3.2	Ensaio de migração.....	74
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXO A – ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES</b>	
	.....	<b>104</b>
	<b>ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM</b>	
	<b>PESQUISA.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADO A TRABALHOS COMO</b>	
	<b>PRIMEIRA AUTORA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO .....</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM PROCESSO DE SUBMISSÃO .....</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADO A TRABALHOS COMO</b>	
	<b>COLABORADORA, DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO .....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) consiste em uma desordem metabólica que acarreta comprometimento do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Ele pode estar relacionado à ausência de secreção da insulina (DM tipo 1) ou à produção insuficiente/resistência periférica dos tecidos à mesma (DM tipo 2). A doença apresenta uma resposta secretora deficiente em insulina e conseqüentemente, há o uso inadequado de carboidratos para a obtenção de glicose, gerando uma hiperglicemia sistêmica (1–3). Os quadros de hiperglicemia crônica, por sua vez, podem levar à lesão de células e tecidos culminando em processos de lenta recuperação (4).

O tecido ósseo é um tecido dinâmico e está em constante remodelação para a manutenção da integridade, reparação de danos e regulação do metabolismo de cálcio e fosfato (3). Para tanto, o tecido antigo é removido por osteoclastos, a partir do processo de reabsorção óssea e o novo tecido é depositado por osteoblastos, dando origem a uma nova matriz óssea (5). Em suma, a remodelação óssea é de extrema importância para a homeostase e qualquer desequilíbrio nesse processo pode gerar sérios impactos, como por exemplo, osteoporose e artrite reumatoide, em decorrência de processo autoimune (6). Dentre as complicações causadas pelo DM, a fragilidade óssea com maior suscetibilidade a fraturas é cada vez mais reconhecida como uma complicação que merece atenção no manejo do paciente diabético (7). Os mecanismos da fisiopatologia que envolvem a fragilidade óssea presente no DM são complexos e incluem a presença da hiperglicemia, estresse oxidativo e acúmulo de produtos de glicosilação avançada (AGEs) (8).

Além das complicações ósseas causadas pelo DM, há também a cicatrização prejudicada, dando origem a úlceras nos membros inferiores. Em indivíduos diabéticos, a hiperglicemia e inflamação crônica, a disfunção micro e macrocirculatória e hipóxia prejudicam a cicatrização de feridas devido a alterações inflamatórias, a proliferação e a remodelação (9).

Nesta condição, peptídeos já foram descritos com o potencial de modular o sistema imune (10,11), como por exemplo, peptídeos sintéticos derivados do peptídeo bactenecina, que são conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (do inglês – *host defense peptide*, HDPs). Quanto a capacidade imunomoduladora descrita,

esses são 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 (12). Contudo, ainda não há literatura referente quanto ao papel que esses peptídeos podem executar no processo de manutenção da homeostase óssea.

Sendo assim, este estudo visa analisar a ação dos peptídeos, potencialmente imunomoduladores, IDR-1018 e LL-37, nos processos de osteoclastogênese, mineralização e migração associados a altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) *in vitro*. A avaliação da resposta imune será focada nos mediadores envolvidos nos processos de remodelação óssea, para assim estabelecer o desenvolvimento de potenciais novos fármacos adjuvantes, capazes de minimizar os danos teciduais ocorridos em pacientes diabéticos ao longo dos anos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DIABETES MELLITUS

A literatura descreve o DM como uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica podendo ser resultante de defeitos na secreção da insulina produzida pelo pâncreas, de resistência periférica dos tecidos à insulina produzida, ou até mesmo uma combinação de ambos. Dessa forma, como consequência, ocorre a desordem metabólica, que pode acarretar o comprometimento do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, ou seja, no uso inadequado de carboidratos para a obtenção de glicose, gerando assim, uma hiperglicemia sistêmica e crônica (1–3).

Há três principais tipos de diabetes, classificados pela Associação Americana de Diabetes (ADA) desde 1997, e tem sido a classificação mais utilizada até hoje, que divide o diabetes mellitus em tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e o diabetes mellitus gestacional (DMG) (2,3). O DM1 resulta da destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, levando a perda de secreção de insulina, com subsequente hiperglicemia e ocorre geralmente em crianças e/ou jovens adultos. Esse tipo de DM corresponde a cerca de 5 a 10% da população diabética (13). O DM2 pode resultar de uma produção insuficiente ou uma resistência periférica dos tecidos à insulina e geralmente afeta indivíduos adultos. Esse tipo corresponde a cerca de 90 a 95% dos indivíduos diabéticos (3,14). Já o DMG, pode ser definido por uma tolerância diminuída aos carboidratos, com diferentes graus de intensidade, diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez, podendo persistir ou não após o parto (15).

Entretanto, diferentemente das 3 principais classificações de DM, em um estudo, publicado em março de 2018, pacientes diabéticos foram estratificados em 5 subgrupos, baseados na progressão da doença e risco de complicações diabéticas. Foi levada em conta a avaliação de seis variáveis, como anticorpos glutamato-descarboxilase (GAD), idade ao diagnóstico, índice de massa corporal (IMC), hemoglobina glicada (HbA1c) e avaliação do modelo homeostático para estimar a função das células  $\beta$  pancreáticas e a resistência à insulina. Em apoio ao agrupamento, as associações genéticas nos agrupamentos diferiram daquelas observadas no DM2 tradicional. Dessa forma, essa classificação complementar pode eventualmente ajudar a adequar e direcionar o tratamento precoce aos pacientes,

representando assim, um primeiro passo para a medicina de precisão em diabetes (16).

O DM está entre uma das mais prevalentes doenças crônicas não comunicáveis e desta forma, se torna um importante problema de saúde pública, reconhecido como importante causa de incapacidade e morte prematura (17). Segundo estimativa da Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2019, aproximadamente 351,7 milhões da população com idade entre 20 e 64 anos, correspondendo a 4,53% da população mundial, viviam com diabetes diagnosticada ou não e a previsão é de que esse número chegue em até 417,3 milhões até 2030 e 486,1 milhões até 2045. A prevalência do DM aumenta com o avanço da idade, dessa forma, a prevalência estimada é maior para a população acima de 65 anos. Em 2019, o número estimado de pessoas entre 65 e 99 anos com DM no mundo era de 135,6 milhões, em 2030 essa estimativa passa para 195,2 milhões e 276,2 milhões em 2045 (18). Em abril de 2021, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou um novo pacto global para acelerar ações de combate ao DM. O novo pacto tem o objetivo de impulsionar os esforços para prevenir o DM e disponibilizar o tratamento a todas as pessoas que precisam, uma vez que o número de pessoas com DM quadruplicou desde 1981. O DM é a única doença não transmissível importante, cujo risco de morte precoce vem aumentando (19). O surto da doença do coronavírus 19 (Covid-19) iniciado no fim de 2019 e provocado pelo vírus SARS-CoV-2 se tornou uma emergência de saúde pública a nível internacional. O DM é uma das comorbidades mais frequentes em pessoas com Covid-19 e por representar um estado inflamatório crônico de baixo grau, favorece o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exagerada e conseqüentemente, o aparecimento da síndrome do desconforto respiratório agudo. Por isso, o controle do DM, assim como o aumento das medidas de proteção para esses pacientes, tem sido ainda mais importante nessa época de pandemia (20,21).

As terapias existentes e disponíveis atualmente para o tratamento do DM2 geralmente são iniciadas logo após o diagnóstico. Desta forma, existem os medicamentos capazes de aumentar a sensibilidade à ação da insulina endógena, como por exemplo as biguanidas (22,23); os medicamentos que diminuem a absorção intestinal de glicose, como a meglitinidas (24); ou ainda os medicamentos que aumentam a secreção de insulina, como as sulfanilureias (25). A indicação do uso da insulina para o tratamento de DM2 deve ocorrer apenas para diabéticos com

hiperglicemia severa com cetonemia ou cetonúria, ou que não respondam ao tratamento com dieta, exercício e/ou hipoglicemiantes orais (26).

Sendo assim, além de todas as complicações geradas pelo DM, que é considerada uma epidemia emergente que atinge pessoas em todo o mundo, há ainda o aspecto ósseo que a doença é capaz de alterar, onde se sugere que o DM é capaz de causar várias anomalias musculoesqueléticas, como desequilíbrio do metabolismo ósseo, dificuldade na regeneração e aumento do risco de fraturas ósseas. Para tanto, uma avaliação de novos tratamentos que fossem capazes de promover a deposição óssea, ou impedir a reabsorção em pacientes diabéticos, a fim de diminuir o risco de fraturas provocado pela hiperglicemia, trariam uma perspectiva de tratamento para melhora da qualidade de vida desses pacientes.

## 2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é considerado pela literatura um dos mais extensos tecidos do corpo humano, podendo ser denominado tanto como órgão estrutural, quanto endócrino, cujas principais funções são a de sustentação, proteção à órgãos vitais, locomoção e reserva de minerais, incluindo cálcio, fosfato, magnésio e moléculas orgânicas, como fibras de colágeno e matriz amorfa (27). As múltiplas funções endócrinas do osso, além das relacionadas ao metabolismo mineral, incluem também a regulação da sensibilidade à insulina e a homeostase da glicose e metabolismo energético (28). Macroscopicamente, os ossos podem ser divididos em tecido ósseo cortical, que compõe a superfície compacta dos ossos, e tecido ósseo trabecular, que compõe o interior esponjoso, com espaços que abrigam a medula óssea. Para a manutenção das funções clássicas do tecido ósseo e integridade do esqueleto, a sua homeostase está intimamente relacionada à ação de hormônios, fatores de crescimento e citocinas que atuam diretamente na remodelação da sua microarquitetura (29,30).

Normalmente, em estado de equilíbrio, a remodelação óssea ocorre de forma contínua e envolve dois diferentes processos, a remoção do osso velho ou danificado, por meio da reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos e a subsequente reposição de nova matriz óssea, promovida pela atividade dos osteoblastos, a fim de manter o tamanho, a forma e a integridade do esqueleto. Já o estado de desequilíbrio,

pode acarretar diversas doenças ósseas, como por exemplo osteoporose, doença de Paget, osteodistrofia renal e osteopetrose (27,31,32).

Os osteoblastos, células responsáveis pela deposição óssea e consequente formação do osso, podem ser diferenciados por meio do estímulo de hormônios, como o da paratireoide (PTH) e fatores de crescimento, como a vitamina D, prostaglandinas, interleucina (IL)-11, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)-1, a partir de células-tronco mesenquimais (MSCs), correspondem cerca de 5% de todas as células ósseas e de forma geral são responsáveis pela síntese de colágeno tipo I e pela deposição de matriz mineralizada, a fim de facilitar a deposição óssea. Entretanto, a interação direta das células com a matriz extracelular é um evento crucial para a completa diferenciação, proliferação e atividade dos osteoblastos. Após a proliferação, os osteoblastos atingem o ponto em que a proliferação cessa, expressam fosfatase alcalina (ALP) e começam a secretar colágeno do tipo I e proteínas de matriz não colagenosa (14,30,33,34).

Além de estar intimamente envolvido no processo de mineralização, os osteoblastos ainda podem ser responsáveis também pela origem dos osteócitos. Em estado de repouso, a superfície óssea é predominantemente coberta por uma camada de osteócitos que são caracterizados como células de revestimento e a célula óssea mais abundante, correspondendo a cerca de 90% do total das células que compõe o sistema ósseo. Os osteócitos são incorporados à matriz óssea durante seu desenvolvimento ou imediatamente antes do início dos ciclos de remodelação, desempenhando dessa forma, um papel crucial na iniciação da remodelação óssea, pois são os responsáveis por regular a composição óssea através da tradução de tensão mecânica em sinais bioquímicos (30,33,35).

Os osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, podem ser formados a partir da fusão de células-tronco hematopoiéticas (HSCs), promovida por dois importantes mediadores, o fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF) e o receptor ativador do fator kappa-B ligante (RANKL), sendo essa, considerada a citocina chave para a formação e atividade de osteoclastos. De acordo com a ampla literatura estudada até o momento, na presença de concentrações permissivas de M-CSF, o RANKL se liga ao seu receptor, o RANK, o qual é expresso em precursores de osteoclastos e dessa forma, promove a indução da diferenciação celular, gerando os chamados pré-osteoclastos, os quais se fusionam e geralmente originam células gigantes e multinucleadas, os osteoclastos maduros, que por sua vez

promovem a degradação da superfície do osso, dando origem assim as lacunas de Howship (27,32,36,37).

Para promover o processo de reabsorção óssea, os osteoclastos promovem um micro compartimento selado, onde podem ocorrer uma série de mudanças físicas e moleculares. Dentro do vacúolo, são expressas ATPases vacuolares para a membrana de borda enrugada na superfície óssea, onde promovem um bombardeio de prótons no vacúolo de reabsorção para a dissolução da hidroxiapatita. O baixo pH gerado pelo bombardeio de prótons no vacúolo de reabsorção promove a ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs), catepsina K e proteinases de cisteína para degradar a matriz óssea colagenosa, que libera peptídeos que são utilizados clinicamente para determinar a taxa de reabsorção óssea. Todavia, a osteoprotegerina (OPG) tem sido considerada um potente inibidor de diferenciação de osteoclastos, sendo derivada de osteoblastos e podendo ser capaz de se ligar ao receptor de RANKL, onde a proporção OPG/RANKL pode ser determinante para a diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea no organismo (30,32,34).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que participa da regulação de vários processos fisiológicos e entre eles, a remodelação óssea. De forma geral, a transcrição do gene da enzima de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ , gerando grandes quantidades de NO (escala de nanomolar), enquanto inibidas por citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$  (38). O NO pode reagir com radicais livres derivados de oxigênio e formar moléculas altamente reativas, como o anion de peróxinitrito ou o radical de hidroxila, contribuindo assim para o dano tecidual (39,40). Portanto, baixas concentrações de NO foram descritas como capazes de potencializar a reabsorção óssea mediada por IL-1 e a produção constitutiva por osteoclastos sugere ser fator essencial para a função normal de osteoclastos, enquanto altas concentrações de NO inibem a sua formação e atividade, além de induzir a apoptose das células progenitoras de osteoclastos (41–43). Um possível mecanismo para a inibição da atividade de osteoclastos mediada por NO é a modificação da enzima catepsina K, que perde a capacidade de degradar o colágeno ósseo (44).

No estado de inflamação, células imunes ativadas podem promover a destruição óssea por estimulação dos osteoclastos. Entretanto, em condições saudáveis, o sistema imune pode ser capaz de proteger o esqueleto. Todavia, o mecanismo

patofisiológico entre o DM e o metabolismo ósseo comprometido ainda não é bem elucidado. No que se diz respeito aos efeitos celulares, não se sabe se há uma ligação direta e causal entre os metabólitos resultantes da hiperglicemia e as funções celulares diminuídas no processo de manutenção óssea (32,45).

A hiperglicemia por si já possui efeitos tóxicos sobre a diferenciação de MSCs em adipócitos, estimulando a via não-canônica Wnt/proteína kinase C e aumentando a expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ), resultando em adipogênese aumentada e perda óssea. Já o pobre controle glicêmico tende a suprimir alguns dos principais genes, como o Runx2, envolvidos na osteoblastogênese (28).

Em pacientes com DM1 (insulinodependentes), geralmente é observada uma significativa diminuição na formação óssea, podendo levar a uma massa óssea reduzida e um risco aumentado de osteoporose. Já em pacientes com DM2, embora a densidade óssea trabecular geralmente seja mantida, esses pacientes também costumam apresentar prejuízo na sua microarquitetura óssea e na qualidade do esqueleto, onde pode ser observado o aumento da porosidade cortical, o que indica um possível aumento da atividade de osteoclastos promovendo perda óssea e provocando conseqüentemente um aumento de fragilidade. No geral, os pacientes com DM2 podem exibir um aumento de apoptose de osteoblastos, diminuição da diferenciação osteoblástica e aumento reabsorção óssea mediada por osteoclastos (45,46).

Dessa forma, as questões relativas às complicações ósseas de pacientes diabético ainda são um desafio, devido ao aumento acentuado da população diabética e o conseqüente risco aumentado de fraturas (46). Assim, tal problemática possui grande significado clínico para o desenvolvimento de abordagens eficazes para possível prevenção, ou até mesmo tratamento da osteopenia/osteoporose diabética, como por exemplo os peptídeos de defesa do hospedeiro.

### 2.3 CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

A cicatrização de feridas de forma geral pode ser caracterizada por uma reação restaurativa fisiológica processada imediatamente após a ocorrência de lesão tecidual e tem início a partir da migração de células adjacentes às bordas da ferida, enquanto há a proliferação de novas células (47,48).

De maneira geral, a cicatrização está relacionada com organização celular, sinais químicos e matriz extracelular. Uma vez que o ferimento promove extravasamento sanguíneo, a área é preenchida principalmente com plasma e plaquetas e um tampão rico em fibrina é produzido a partir da agregação plaquetária e ativação da coagulação sanguínea. O tampão tem o objetivo hemostático de formar uma nova barreira de emergência e organizar uma matriz extracelular provisória. Dessa forma, a matriz provisória participa como reservatório de citocinas e fatores de crescimento, contribuindo para o processo de cicatrização (49–51).

Nessa situação, as plaquetas podem induzir a liberação de glicoproteínas adesivas (fibronectina e trombospondina) e dos seguintes fatores de crescimento: derivado de plaquetas (PDGF), de transformação do crescimento beta e alfa (TGF- $\beta/\alpha$ ), epidérmico (EGF), do endotélio vascular (VEGF). Em seguida, células parenquimatosas atraídas para esse sítio podem produzir mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, recrutando células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos. Em adição, novos vasos sanguíneos são formados e promovem aumento da permeabilidade vascular. Moléculas extravasadas podem contribuir com a deposição de fibrina. A angiogênese faz-se necessária para a formação do novo tecido de granulação com a migração e estimulação mitogênica de células endoteliais (52–54).

Desta forma, a cicatrização de feridas trata-se de um processo complexo que envolve eventos moleculares e celulares para a restauração do tecido lesado e o processo de reparo pode ser dividido em fase inflamatória, proliferativa e de maturação (47,48).

A fase inflamatória é descrita como fase responsável por uma resposta inflamatória em grande escala, podendo ser considerada parte essencial e crítica de qualquer resposta à cicatrização de feridas. O controle dessa fase se faz de extrema importância, uma vez que inflamações exacerbadas e prolongadas podem representar feridas crônicas e não cicatrizadas. Enquanto, respostas inflamatórias reduzidas podem reduzir a formação de cicatrizes e levar à ruptura do tecido (48).

Dessa forma, o início da resposta inflamatória à um tecido lesado geralmente ocorre por meio do recrutamento de neutrófilos que promovem a limpeza dos fragmentos celulares e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de grânulos e formação de vacúolos para a eliminação de possíveis patógenos invasores, assim como promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, a fim de preparar o local para uma boa cicatrização. Após a fase inicial, cerca de 72h depois,

os neutrófilos começam então a serem fagocitados por macrófagos e fibroblastos que irão então produzir citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12 e fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ 1 (48,55).

Seguido da fase inflamatória, ocorre a fase proliferativa, com duração de 3 a 5 dias, que pode ser caracterizada pelo acúmulo de diferentes tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e tecido conjuntivo para exercer o papel de matriz extracelular, incluindo proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno, elastina. Essa nova matriz extracelular forma o tecido de granulação a fim de substituir o coágulo formado para o fechamento temporário da ferida. Citocinas e fatores de crescimento, como TGF- $\beta$  1, 2 e 3 geralmente estão envolvidos nessa fase, que dura cerca de dias a semanas (56).

A última fase, a fase de maturação promove uma recuperação do tecido normal com o depósito de proteoglicanas e colágeno é processada a partir da remodelação, que exige um balanço entre a apoptose das células residentes e proliferação de novas células. A degradação da profusa matriz extracelular e a substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I pode ser considerada como ponto crítico, onde qualquer desequilíbrio pode promover um excesso de cicatrização ou a permanência de uma ferida crônica. Nesse processo, os fibroblastos produzem TNF- $\alpha$ , IL-1, PDGF e TGF- $\beta$  e as células epiteliais produzem EGF e TGF- $\beta$ . Por fim, a reepitelização ocorre por recobrimento da ferida com novo epitélio, a partir da migração e proliferação de queratinócitos regulados por fatores de crescimento, integrinas e MMP (47,56–59).

Já no contexto de pacientes diabéticos, de forma geral muitos possuem comprometimento no processo de cicatrização de feridas, devido à presença de inflamação crônica, somado ao comprometimento vascular e neuropático, o que pode provocar o aparecimento de úlceras e feridas sépticas, comumente conhecidas como feridas diabéticas. Apesar do processo inflamatório ser fator importante na cicatrização de feridas, a inflamação descontrolada costuma ser prejudicial à regeneração de tecidos, uma vez que mediadores inflamatórios influenciam negativamente na migração de fibroblastos e células epiteliais (48,60). Dessa forma, além do aspecto inflamatório, outros fatores também contribuem para o comprometimento na cicatrização de feridas diabéticas, como a resposta angiogênica prejudicada, as complicações microvasculares (hipóxia), a função prejudicada de neutrófilos e macrófagos, assim como produção reduzida de fatores de crescimentos associados à cicatrização (61).

Evidências sugerem que outro fator agravante para o paciente diabético é o envelhecimento avançado das fibras de colágeno, devido a hipóteses relacionadas ao metabolismo alterado em condições de constante hiperglicemia, o que pode promover glicosilação proteica. Em adição, danos ao colágeno podem contribuir para o início precoce e o aumento da gravidade de aterosclerose presente nesses pacientes, diminuição do recolhimento elástico pulmonar e espessamento difuso das membranas capilares (62).

Dessa maneira, peptídeos imunomoduladores poderiam se tornar uma proposta de tratamento complementar em feridas de pacientes diabéticos, a fim de controlar a resposta imune exacerbada nesses pacientes e com isso, promover um balanço no processo de cicatrização tecidual e conseqüentemente, promover uma melhoria na qualidade de vida.

## 2.4 PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES

Recentemente, muitos estudos estão sendo desenvolvidos a fim de desvendar, ou até mesmo aprofundar, o conhecimento relacionado ao potencial de novos peptídeos, sendo eles naturais ou sintéticos. O estudo desses peptídeos objetiva o seu uso para auxílio em terapias já existentes, como adjuvantes e/ou substitutos de classes de anti-inflamatórios ou até antibióticos contra diversos tipos de infecções (63,64). Esses possíveis novos peptídeos poderiam ser utilizados como opções terapêuticas mais eficazes, rápidas 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 dos pesquisadores tem sido o desenvolvimento de peptídeos, que além de antimicrobianos, apresentem outras funções, como por exemplo, a imunomodulação. Estes peptídeos são denominados de peptídeos promíscuos, onde vários alvos estão associados a uma única estrutura de peptídeo (65). Dessa forma, o foco deste trabalho são peptídeos capazes de alterar o sistema imune, chamados de peptídeos de defesa do hospedeiro.

Os peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro (do inglês *cationic host defense peptides*, *CHDPs*) ou simplesmente HDPs são conservados, pequenos (<50

aminoácidos), de carga positiva, catiônicos e com tendência a adotar estrutura anfipática em meios hidrofóbicos, além de ser componentes inatos de defesa do hospedeiro, possuindo duas principais classes de peptídeos: as catelecidinas e as defensinas (66–68). Os HDPs são descritos como capazes de eliminar uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias multirresistentes, fungos, protozoários e até mesmo vírus. Esses peptídeos são capazes de agir tanto por meio de ataque à membrana, quanto através de alvos intracelulares (69).

Além da ação antimicrobiana, os HDPs podem também ser utilizados como moléculas com potencial imunomodulatório. No que diz respeito à sua ação sobre o sistema imune, esses peptídeos podem possuir expressão pleiotrópica e múltiplos alvos e dessa forma, podendo ser capazes de induzir, direta ou indiretamente, a produção de citocinas a partir de leucócitos, reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta a antígenos, recrutar leucócitos para o sítio da provável infecção, modular a expressão de quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO), estimular a angiogênese, contribuir para o processo de cicatrização de feridas e ainda ativar e promover a diferenciação de leucócitos e macrófagos (70–72). Em adição à ação imunomoduladora e ação cicatrizante, os HDPs ainda demonstram na literatura um efeito anti-inflamatório via inibição da geração de citocinas induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), em macrófagos e monócitos (73).

As catelecidinas, uma das classes de HDPs, possuem a região N-terminal altamente conservada e são produzidas como pré-pró-peptídeos e armazenadas no interior de vacúolos granulares. Uma vez que as células são ativadas, as catelecidinas podem então ser secretadas e o N-terminal é clivado, gerando assim sua forma madura e um peptídeo biologicamente ativo (74). Recebem esse nome devido a habilidade do domínio catelina 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 de sua proteína precursora, onde há o predomínio do domínio catelina (75). Dentre os 30 membros da família das catelecidinas, descritos como de origem mamífera, existe apenas um membro com origem humana, a proteína hCAP-18, que é a precursora do peptídeo natural LL-37 (76).

De forma semelhante às catelecidinas, a classe das defensinas possui peptídeos multifuncionais catiônicos que contêm cisteína, que são ativadas por

processo proteolítico a partir de um precursor inativo. As defensinas possuem os tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$ , sendo este último, circular, sem N- ou C- terminal (77–79). Os peptídeos pertencentes a classe das defensinas possuem efeitos antibacterianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como efeitos antivirais e antifúngicos e possuem papel ativo na resposta imune do hospedeiro em resposta a infecções. As mais importantes defensinas humanas são: os peptídeos de neutrófilos humanos (HNPs) e as  $\beta$ -defensinas humanas (HBDs) (80,81).

Desta forma, devido ao potencial imunomodulador, nos próximos tópicos, será dado destaque aos HDPs de interesse para este estudo.

### 2.4.1 Peptídeo LL-37

O peptídeo LL-37 pertence a classe das catelecidinas, sendo o único membro de origem humana da família dos HDPs. É um peptídeo 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 (82). Possui o nome LL-37 pois é um peptídeo que possui 37 resíduos de aminoácidos, iniciado por duas leucinas, como descrito na sequência a seguir LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES e possui 4493,33 Da (Figura 1) (78). 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 (83).



Figura 1 – Estrutura representativa em 3D do peptídeo LL-37 por ressonância magnética nuclear (NMR). Fonte: PDB ID: 2K6O – Wang, G. 2008 (84) <https://www.rcsb.org/structure/2K6O> acessado em: 06/12/2018.

Inicialmente, o peptídeo LL-37 foi descrito e caracterizado 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. Contudo, várias estratégias de resistência ao peptídeo já 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 seria tão eficiente (83).

Entretanto, o amplo espectro de atividade do peptídeo LL-37 ainda inclui a indução de proliferação celular e angiogênese e promoção de migração de células epiteliais e fechamento de feridas, tendo assim um importante papel na homeostase de tecidos e no processo regenerativo (85). O peptídeo LL-37 demonstra ação na homeostase e regeneração de tecidos e ainda age como molécula capaz de modular o sistema imune, com o potencial de quimiotaxia, atraindo neutrófilos, monócitos e linfócitos T, e pode controlar o processo de inflamação em sítios de infecção e injúrias, tendo efeitos tanto pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórios (85–87). Assim, pode-se dizer que o peptídeo 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 (88).

O mecanismo de modulação imune utilizado pelo peptídeo LL-37 ainda é complexo. Contudo, tem sido demonstrado que alvos da via inflamatória, como os receptores do tipo *toll-like* (TLR) para fator nuclear-kappa B (NF-κB), 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. Entretanto, a literatura também descreve que a LL-37 possui a capacidade de promover a produção e secreção de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias a partir de células circulantes ou células epiteliais (88,89).

O peptídeo LL-37 tende a possuir uma tendência a alterar sua conformação em solução salina e dessa forma, a interação do peptídeo com a membrana celular neutra das células hospedeiras tende a ser favorecida. Na interação peptídeo-membrana, a LL-37 tende a ser capaz de atuar na célula do hospedeiro formando poros transitórios ou lesões nas membranas e permitir a liberação do material intracelular, promover o acúmulo de peptídeo nas regiões de receptores, interagir com fatores ancorados na

membrana e componentes extracelulares, como LPS, impedindo dessa forma a interação com os receptores e ainda, pode distribuir tais moléculas a receptores ou compartimentos intracelulares por endocitose, controlando assim a resposta inflamatória (Figura 2) (89).

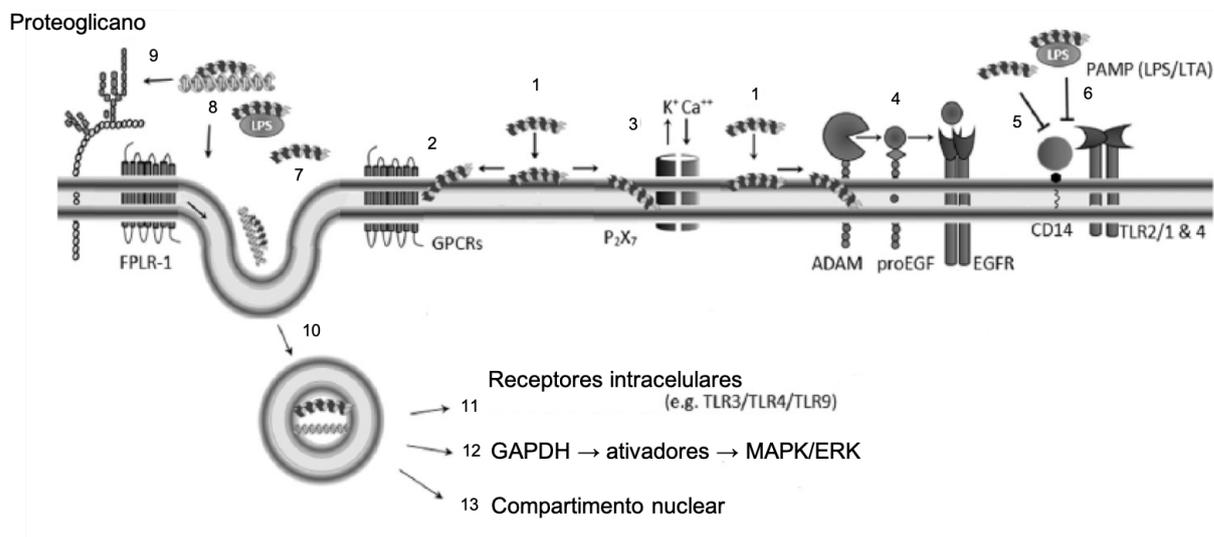


Figura 2 – Representação esquemática da ação do peptídeo LL-37 em células do hospedeiro. **(1)** Interação com a membrana da célula hospedeira em forma de oligômero, **(2)** preferindo a forma de jangada lipídica e permanecendo ligada à superfície da membrana como tal. Pode interagir com o domínio TM do receptor de peptídeo formil semelhante ao humano (FPLR)-1 **(3)** e do receptor do canal P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>, resultando em uma possível ativação do tipo não-canônica. **(4)** Ativação de proteases de membrana, liberando fatores de crescimento ancorados que podem ativar o receptor de fator do crescimento epidérmico (EGFR). **(5)** Interação com receptor do tipo *Toll-like* (TLR)-4 ou seu co-receptor CD14, **(6)** ou ligação com PAMPs, por meio de ligação ao LPS, reduzindo seus efeitos pró-inflamatórios. **(7 e 10)** Interação com receptor, mediando a endocitose de agregados de LL-37. **(8, 9 e 10)** Ligação com moléculas aniônicas extracelulares, como dsDNA, dsRNA ou LPS, seguido de endocitose mediada por jatos lipídicos auxiliada por interação direta com proteoglicano, FPLR-1 ou EGFR, levando à sua internalização. **(11)** Acesso a receptores intracelulares, **(12)** à proteínas como GAPDH que são capazes de modular a atividade de vias de sinalização, **(13)** ou ao compartimento nuclear, podendo ser capaz de promover respostas pró-inflamatórias úteis ao hospedeiro. Fonte: Adaptado de Xhindoli et al. 2016 (89).

No que diz respeito à relação entre o peptídeo 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 quanto na pele,

quando comparados a pessoas saudáveis. Esse dado sugere que o aumento dos níveis de glicose sanguínea pode estar relacionado com a baixa produção dos HDPs (90).

Em um outro estudo, foi demonstrado que as altas taxas de glicose suprimiram 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 (91).

Já quando relacionado ao metabolismo ósseo, em dois diferentes estudos, o peptídeo LL-37 foi capaz de suprimir a osteoclastogênese induzida por RANKL em culturas de PBMC humana no período inicial de 0 a 4 dias, entretanto, o mesmo não ocorreu em cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMM) de camundongos, indicando que os precursores de osteoclastos de humanos e camundongos possuem respostas diferentes ao peptídeo (37,92,93).

Desta forma, o peptídeo LL-37 foi selecionado para ser utilizado como peptídeo comparativo por ser uma catelecidina natural humana com efeitos imunomodulatório e de inibição da osteoclastogênese humana, previamente descritos.

#### **2.4.2 Peptídeo IDR-1018**

Os peptídeos reguladores da defesa inata (do inglês, *innate defense regulators* *IDRs*) são versões sintéticas dos HDPs naturais. Os IDRs possuem ampla ação protetora contra infecções bacterianas sistêmicas, mesmo com ausência de atividade antimicrobiana, representando assim uma nova terapia contra infecções e com potencial anti-inflamatório (12,94).

Os peptídeos IDR pertencem a uma classe complexa de peptídeos imunomoduladores, derivados de HDPs endógenos e com a potente habilidade de combater patógenos bacterianos através da complexa regulação da resposta imune inata, diminuindo respostas pró-inflamatórias e assim, limitando inflamações potencialmente danosas (12,95). 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 mediada 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 L-selectina e as integrinas  $\beta_2$  (12,96,97).

O peptídeo IDR-1018 possui 1788,17 Da e sequência com 12 resíduos de aminoácidos, VRLIVAVRIWRR-NH<sub>2</sub> (Figura 3). O IDR-1018 é relatado como o mais potente indutor de quimiocinas, como a proteína quimioatraente de monócitos (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 (12,98–100).

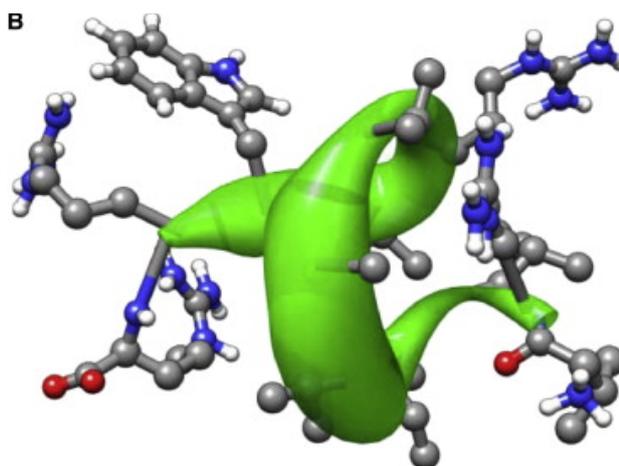


Figura 3 - Estrutura representativa em 3D do peptídeo IDR-1018 elucidada por ressonância magnética nuclear (NMR). Fonte: Wieczorek et al. 2010 (99).

A cicatrização de feridas e a fagocitose de células que sofreram apoptose são funções características de macrófagos. 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 peptídeo IDR-1018 apresentou-se como um bom promotor de cicatrização em tecidos de camundongos e porcos (101,102).

Seguindo a linha de diferenciação de macrófagos, estudos sugerem que macrófagos diferenciados na presença do peptídeo IDR-1018 atuam principalmente durante a resolução de 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 (101). E em estudo prévio, demonstrou efeito protetor *in vitro*, com melhores resultados quando comparado aos peptídeos IDR-1002 e DJK-6, mantendo os níveis de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios similares aos níveis basais em culturas de células RAW 264.7 estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose.

Contudo, ainda não há relatos do efeito do peptídeo IDR-1018 sobre o metabolismo ósseo e sendo assim, e 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 como um possível bom candidato para a avaliação do seu efeito quando exposto à um modelo *in vitro* de diferentes concentrações de glicose.

O DM possui alta prevalência mundial e possui características relacionadas aos seus efeitos sistêmicos culminando em diversos processos de lenta recuperação e de grande impacto, não só na vida do paciente, mas também na sociedade. Os custos relacionados à detecção e tratamento da doença são altos e as complicações causadas pelo DM, tanto agudas, quanto crônicas contribuem significativamente para o impacto econômico da sociedade. Esse impacto econômico é gerado, uma vez que o DM contribui para uma mortalidade prematura, maior possibilidade de deficiências e conseqüentemente, o absenteísmo de indivíduos economicamente ativos. Dessa forma, as complicações relacionadas à fragilidade óssea diabética e à cicatrização de feridas diabéticas prejudicada são algumas das condições que impactam direta e negativamente no indivíduo e sociedade. Portanto, este trabalho visa verificar os efeitos de peptídeos de defesa do hospedeiro frente à um modelo de altas concentrações de glicose *in vitro*, relacionados ao aspecto ósseo e cicatricial, para futuramente vir a ser desenvolvidos produtos adjuvantes que possam contribuir para a melhora da qualidade de vida de indivíduos com DM.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de peptídeos imunomoduladores, na presença e ausência de altas concentrações de D-glicose, na osteoclastogênese, mineralização e migração *in vitro*.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) e determinar a menor concentração do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) capaz de inibir a osteoclastogênese em osteoclastos derivados de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), por meio da viabilidade celular, produção de NO e diferenciação de osteoclastos *in vitro*;
- Avaliar os efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 (na concentração determinada pelo objetivo específico anterior), na ausência e presença de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) em osteoclastos derivados de PBMCs, por meio da viabilidade celular, produção de NO, diferenciação de osteoclastos e produção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  *in vitro*;
- Avaliar os efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) em osteoblastos derivados de SaOs-2, por meio da viabilidade celular e quantificação de matriz mineralizada *in vitro*;
- Avaliar os efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 (na concentração determinada pelos ensaios envolvendo osteoclastos derivados de PBMCs), na ausência e presença de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) em osteoblastos derivados de SaOs-2, por meio da viabilidade celular, quantificação de fosfato, atividade de ALP e quantificação de matriz mineralizada *in vitro*;
- Avaliar os efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) e determinar a menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em fibroblastos humanos (hFIB), por meio da viabilidade celular, proliferação e migração celular *in vitro*;

## 4 MÉTODOS

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo envolveu uma avaliação quantitativa e qualitativa do efeito dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 nos processos de osteoclastogênese, mineralização e migração *in vitro* na presença e ausência de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM), a fim de mimetizar *in vitro* as condições de compensação glicêmica (216 mg.dL<sup>-1</sup>) e descompensação glicêmica (432 mg.dL<sup>-1</sup>) de um paciente diabético (103). Para tanto, esse estudo foi dividido em 3 fases (Figura 4), onde o intuito foi iniciar a determinação do potencial destes peptídeos como nova forma terapêutica adjuvante contra fragilidades ósseas/teciduais provocadas em pacientes diabéticos como consequência da hiperglicemia crônica.

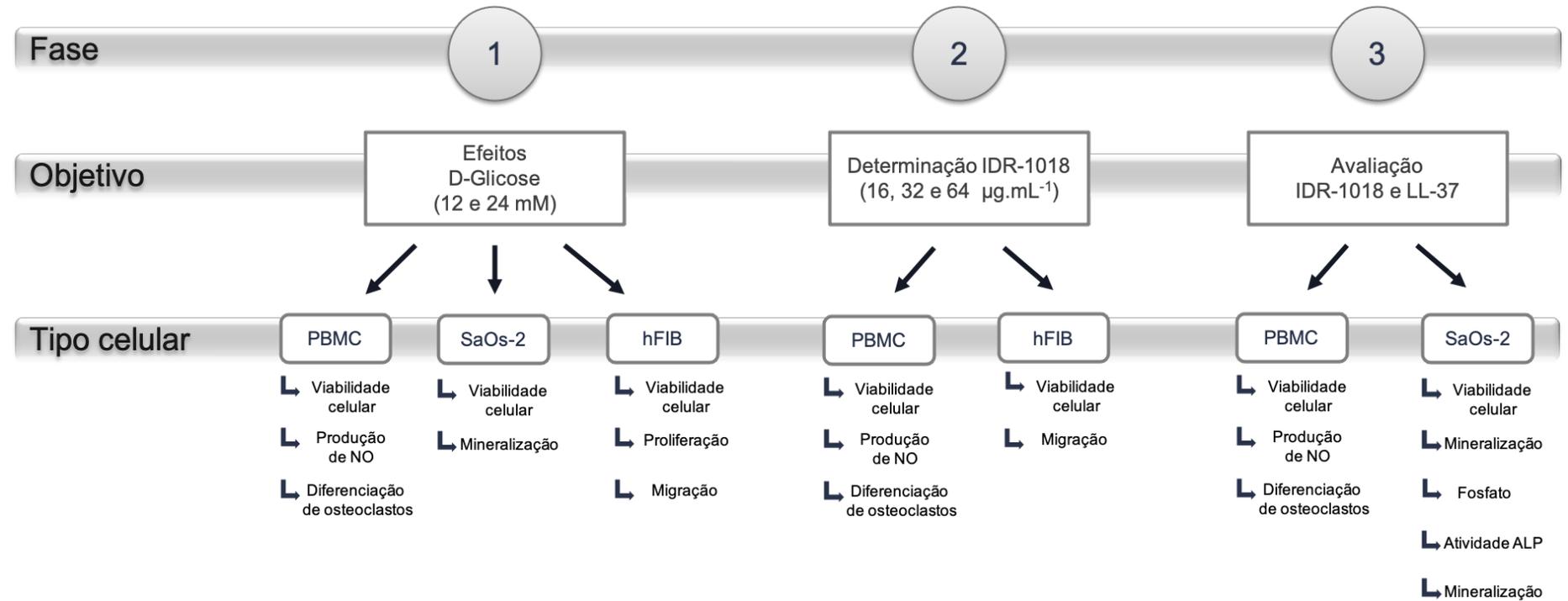


Figura 4 – Etapas de desenvolvimento do estudo.

## 4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos LL-37 e IDR-1018 foram sintetizados, purificados (>95 %), liofilizados e armazenados pela empresa *Peptide 2.0 Inc.* (EUA). A síntese foi realizada em fase sólida a partir da metodologia F-moc (104). Antes dos experimentos, foi realizada confirmação da massa molecular e pureza dos peptídeos 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. Depositadas na placa (*AnchorchipVar-384*) em triplicata, as amostras cristalizaram à temperatura ambiente. As massas moleculares foram determinadas via MALDI-ToF *Ultra Flex III* (Bruker Daltonics, EUA). As massas monoisotópicas foram obtidas a partir de espectrometria de massa (Bruker Daltonics, EUA), utilizando o método de operação refletido e positivo de 700 a 3500 Da, com calibração externa (Anexo A – Figuras 1 e 2).

### 4.2.1 Purificação do peptídeo LL-37 e quantificação dos peptídeos LL-37 e IDR-1018

Uma vez que o espectro da massa do peptídeo LL-37 tenha 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 por tempo de retenção (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.

Para os experimentos, ambos os peptídeos (IDR-1018 e LL-37) foram diluídos em água ultrapura e quantificados pela absorção de UV a 205, 215 e 225 nm utilizando a fórmula de concentração (105):

$$A = (\text{abs215} - \text{abs225}) \times 144$$

$$B = (\text{abs205}) \times 31$$

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

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

#### 4.3 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA - OSTEOCLASTOS DERIVADOS DE PBMCS

Nesta parte do trabalho foram utilizados osteoclastos derivados do isolamento de PBMCs. No primeiro momento, avaliou-se apenas o efeito de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) no processo de osteoclastogênese (fase 1), através da contagem do número de osteoclastos, após coloração de TRAP. Em seguida, a definição da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 foi avaliada pelos parâmetros: números de osteoclastos diferenciados, viabilidade celular e produção de NO (fase 2). Posteriormente, avaliou-se de forma mais profunda, o efeito do peptídeo IDR-1018, em comparação com o peptídeo LL-37, nos processos de osteoclastogênese, com avaliação da produção das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  (fase 3) (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 1 – Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de reabsorção óssea

Fase	Objetivo	Parâmetros	Metodologia	Tipo celular
1	Avaliação dos efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM)	Viabilidade celular	MTT	Osteoclastos derivados de PBMCs
		Diferenciação em osteoclastos	Coloração de TRAP	
2	Determinação da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Viabilidade celular	MTT	
		Diferenciação em osteoclastos	Coloração de TRAP	
		Dosagem de óxido nítrico	Reação de Griess	
3	Avaliação dos efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 OBS: o peptídeo LL-37 foi utilizado como padrão comparativo.	Viabilidade celular	MTT	
		Diferenciação em osteoclastos	Coloração de TRAP	
		Dosagem de óxido nítrico	Reação de Griess	
		Produção de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$	ELISA	

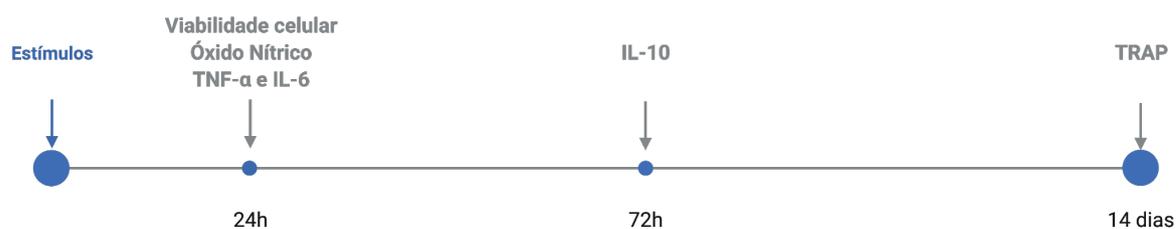


Figura 5 - Linha do tempo dos ensaios relacionados ao processo de reabsorção óssea.

### 4.3.1 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano

O sangue total (cerca de 48 mL) foi coletado de 3 diferentes voluntários saudáveis, com a amostra de cada paciente utilizada para a realização de cada réplica biológica, nos laboratórios do Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma Universidade (CAAE nº. 72087317.1.0000.0029) (Anexo B).

As células PBMCs foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade utilizando Ficoll Paque Premium (GE Healthcare, EUA). Resumidamente, 48 mL de sangue total foram diluídos em 48 mL de tampão fosfato salino (PBS) e então, cada 6 mL da diluição foram adicionados sobre 6 mL de *Ficoll Paque Premium* em temperatura ambiente em tubos de fundo cônico de 15 mL e centrifugado (400 g, 30 min, 20°C, sem freio). A camada superior foi descartada restando apenas a camada de células mononucleares (linfócitos, monócitos e trombócitos) que foi coletada cuidadosamente e transferida para um novo tubo de fundo cônico. No novo tubo, as células foram diluídas na proporção de 1:4 em PBS e novamente centrifugada (400 g, 30 min, 20 °C, sem freio). O sobrenadante foi descartado e a camada de células mononucleares foi lavada com 10 mL de PBS, seguido de nova centrifugação (250 g, 10 min, 20 °C, sem freio). Subsequentemente, após a eliminação do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso em 10 mL de 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 0,5 % de penicilina/estreptomicina (1000 U.mL<sup>-1</sup>; Gibco, EUA), acrescentado 25 ng.mL<sup>-1</sup> de M-CSF (Peprotech, EUA) e mantido em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C e 95 % de umidade por 72 h (106,107).

### 4.3.2 Condições de cultura e grupos experimentais para o ensaio de osteoclastogênese

Após 72 h do isolamento, as células não aderentes foram descartadas e o cultivo das PBMCs (macrófagos M-CSF-dependentes) foi realizado na concentração de  $16 \times 10^3$  células por poço, em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, Brasil), em meio de cultura alpha MEM (*Minimum Essential Medium Alpha Medium*; Gibco, EUA) suplementado com 15 % de soro bovino fetal (Gibco, EUA), 2,6 % de  $\text{NaHCO}_3$  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 ( $1000 \text{ U.mL}^{-1}$ ; Gibco, EUA). As culturas foram submetidas aos estímulos de  $25 \text{ ng.mL}^{-1}$  de M-CSF (PeproTech, EUA),  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  do ligante do receptor de ativação nuclear fator kappa B solúvel (sRANKL; Peprotech, EUA) e altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM; Sigma-Aldrich, EUA) e tratadas com o peptídeo IDR-1018 (16, 32 e  $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 24 h após o semeio das células, totalizando 14 dias de cultivo. Em um segundo momento, as células foram tratadas também com o peptídeo LL-37 (na mesma concentração definida a partir do peptídeo IDR-1018), de acordo com fase 3 do trabalho (Tabela 2). Para o grupo controle considerou-se o grupo de macrófagos derivados de células PBMC humano estimulados apenas com M-CSF. Cada grupo experimental foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas (108,109).

### 4.3.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada após o período de 24 h de incubação das placas, contendo os grupos experimentais, a 5 % de  $\text{CO}_2$ , 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), 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 (110). Após os períodos de incubação, todo o sobrenadante foi removido e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio alpha MEM por poço, seguido de 10  $\mu\text{L}$  do reagente de MTT (500  $\mu\text{g}$  por poço). As placas de cultura foram novamente incubadas por 3 h a 5 % de  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$  e 95 % de umidade. Após esse período, a reação foi bloqueada com 100  $\mu\text{L}$  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 570 nm.

#### 4.3.4 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Outro parâmetro analisado para a avaliação da osteoclastogênese foi a produção de NO. A partir das culturas utilizadas para a análise de viabilidade celular, os sobrenadantes de 24 h foram coletados para a avaliação dos níveis de nitrito. O método utilizado para avaliação da produção de nitrito foi o da reação de Griess descrito por Green *et al.* (111), com modificações. Brevemente, foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes das culturas para uma nova placa de 96 poços (Kasvi, Brasil). Nos poços da curva padrão de nitrito de sódio foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio alpha MEM suplementado (Gibco, EUA) e em seguida, adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de nitrito de sódio ( $74 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) diluído na proporção de 1:1000, seguido de diluição seriada. Por fim, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de sulfanilamida 1 % em ácido fosfórico 2,5 % e naftiletlenodiamina 1 % em ácido fosfórico 2,5 %, na proporção de 1:1, em todos os poços contendo curva padrão e amostras. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), à 490 nm. O cálculo para estimar a quantidade de nitrito foi realizado a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio ( $1,5625 \mu\text{M}$  - 200  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.3.5 Coloração de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Após o décimo quarto dia experimental, as PBMCs cultivadas em placas de 96 poços (Kasvi, Brasil), de acordo com os grupos controle e experimentais, foram submetidas à fixação e coloração de TRAP para posterior contagem em microscópio do número de osteoclastos diferenciados. Para a coloração de TRAP, foi utilizado o kit *Acid Phosphatase, Leukocyte* (Sigma-Aldrich, EUA), modificado. Brevemente, após a remoção do sobrenadante da cultura celular, a camada celular foi fixada em cada poço na placa com uma solução fixadora (700 µL de solução citrato, 1,9 mL de acetona e 200 µL de formaldeído 37 %), por 2 min. Em seguida, 2,7 mL de água destilada à 37 °C, 60 µL de solução corante *fast garnet*, sal sulfato GBC diazotada (100 µL de solução GBC e 100 µL de solução de nitrito de sódio), 30 µL de solução naphthol AS-TR fosfato, 120 µL de solução de acetato e 60 µL de solução tartarato foram aquecidos à 37 °C e em cada poço adicionados 100 µL, seguido de incubação da placa em estufa à 37 °C, por 1 h. Após este período, a solução foi removida dos poços e água destilada foi adicionada. Para a coloração do núcleo das células, após a remoção da água, foi adicionada a solução de hematoxilina aos poços, por 30 s e em seguida, os poços foram lavados e os osteoclastos contabilizados por observador cego em microscópio invertido. Foram considerados osteoclastos, as células TRAP positivas (com coloração vermelho/alaranjada), com mais de três núcleos em seu interior (112).

#### 4.3.6 Dosagem de citocinas

A produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  foram verificadas a partir do sobrenadante das culturas incubadas por 24 h e da IL-10, após 72 h. A produção das citocinas foi determinada pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), utilizando os respectivos *human 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 (113).

#### 4.4 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA - OSTEOLASTOS DERIVADOS DE SAOS-2

Nesta parte do trabalho foram utilizadas células derivadas de osteosarcoma humano SaOs-2, capazes de se diferenciar em osteoblastos quando estimuladas em condições osteogênicas. Nos dois primeiros momentos avaliou-se apenas o efeito de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) no processo de osteoblastogênese (fase 1), seguido pela definição da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 (fase 2), através da avaliação da formação de matriz mineral, após coloração por vermelho de alizarina e viabilidade celular. Posteriormente, avaliou-se o efeito do peptídeo IDR-1018, em comparação com o peptídeo LL-37, nos processos de osteoblastogênese, com verificação da diferenciação em osteoblastos por dosagem de fosfato e ALP (fase 3) (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2 - Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de deposição óssea

<b>Fase</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Tipo celular</b>
<b>1</b>	Avaliação dos efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM)	Viabilidade celular	MTT	Osteoblastos derivados de SaOs-2
		Formação de matriz mineral	Vermelho de alizarina	
<b>2</b>	Determinação da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 µg.mL <sup>-1</sup> )	Viabilidade celular	MTT	
		Formação de matriz mineral	Vermelho de alizarina	
<b>3</b>	Avaliação dos efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 OBS: o peptídeo LL-37 foi utilizado como padrão comparativo.	Viabilidade celular	MTT	
		Formação de matriz mineral	Vermelho de alizarina e Fosfato	
		Diferenciação em osteoblastos	Fosfatase alcalina	



Figura 6 - Linha do tempo dos ensaios relacionados ao processo de mineralização.

#### 4.4.1 Condições de cultura e grupos experimentais para o ensaio de osteoblastogênese

A linhagem de células SaOs-2, gentilmente doada pelo Prof. Marcelo Silva (Universidade Federal de Uberlândia), é do tipo epitelial, derivada de osteosarcoma humano, com características de osteoblastos (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 0,5 % de penicilina/estreptomicina ( $1000 \text{ U.mL}^{-1}$ ; Gibco, EUA), em estufa contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ , a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 95 % de umidade. O cultivo de células SaOs-2 foi realizado na concentração de  $16 \times 10^3$  células por poço durante 21 dias, em placas de cultura de 24 poços (Kasvi, Brasil), em meio alpha MEM (Gibco, EUA) suplementado, com condições osteogênicas ( $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $100 \text{ nM}$  de dexametasona; Sigma-Aldrich, EUA;  $8 \text{ mM}$  de  $\beta$ -glicerofosfato; Sigma-Aldrich, EUA). As culturas foram submetidas aos estímulos de altas concentrações de D-glicose ( $12$  e  $24 \text{ mM}$ ; Sigma-Aldrich, EUA) e com o peptídeo IDR-1018 ( $16$ ,  $32$  e  $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e, posteriormente, também tratadas com LL-37 (na mesma concentração definida a partir do peptídeo IDR-1018),  $24 \text{ h}$  após o semeio das células, de acordo com cada fase do trabalho descrita na tabela 3. Para o grupo controle considerou-se o grupo de células SaOs-2 em condições osteogênicas. Cada grupo experimental foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas.

#### 4.4.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada após o período de 24 h de incubação das células em placas de 96 poços, contendo os grupos experimentais, a 5 % de CO<sub>2</sub>, 37 °C e 95 % de umidade. Os grupos controle positivo e negativo do teste, assim como o ensaio de MTT foram realizados conforme previamente descrito (110).

#### 4.4.3 Determinação de formação de matriz mineral

Para a determinação de matriz mineral, as células SaOs-2 foram cultivadas em placas de 24 poços durante 21 dias em condições osteogênicas, de acordo com os grupos experimentais acima citados (115). Após o período experimental, o meio foi descartado e as células lavadas com tampão PBS e fixadas com formaldeído 10 % (v/v) (Vetec, Brasil) em temperatura ambiente, por 15 min. A camada celular foi então lavada 2x com água destilada e então adicionado 1 mL do corante *Vermelho de alizarina S* (40 mM; pH 4,1; Sigma-Aldrich, EUA) por poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 20 min, sob constante agitação. Após o descarte do corante não incorporado, a camada celular foi lavada 4 vezes com 4 mL de água destilada, com agitação de 5 min entre as lavagens. A água destilada foi totalmente descartada e a camada celular corada foi então observada em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha).

##### 4.4.3.1 Quantificação da formação de matriz mineral

Para a quantificação da coloração realizada para determinação de matriz mineral, foram adicionados em cada poço 800 µL de ácido acético 10 % (v/v) (Dinâmica, Brasil), seguido de incubação da placa por 30 min a temperatura ambiente, sob constante agitação. A camada celular, juntamente com o ácido acético 10 % (v/v), foi então raspada do fundo do poço e transferida para tubos do tipo *ependorf* de 1,5 mL. Após vortexar por 30 s, a suspensão foi coberta com 500 µL de óleo mineral (Vetec, Brasil), aquecida a 85 °C por 10 min e em seguida, resfriada em gelo por 5 min. Após o completo resfriamento, a suspensão foi centrifugada a 20.000 g por 15 min e 500 µL do sobrenadante transferido para um novo tubo. Para a neutralização

do ácido, foi adicionado 200 µL de hidróxido de amônio 10 % (v/v) (Vetec, Brasil). As alíquotas (150 µL) do sobrenadante foram dispostas em triplicata em placa de 96 poços (Kasvi, Brasil) para leitura em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), à 405 nm.

#### 4.4.3.2 Quantificação de fosfato inorgânico

A determinação da concentração de fosfato inorgânico ( $P_i$ ) foi verificada a partir do sobrenadante das culturas de células SaOs-2 após 21 dias experimentais em condições osteogênicas. Para a realização do ensaio foi utilizado o kit *Phosphate Colorimetric Assay* (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de  $P_i$  foram expressos em nanomol (nMol), após comparação realizada com a curva padrão proposta pelo kit (0 – 5 nMol).

#### 4.4.4 Determinação de fosfatase alcalina (ALP)

A determinação da concentração de ALP foi verificada a partir das culturas de células SaOs-2, na concentração de  $7,5 \times 10^3$  células por poço em placas de cultura de 96 poços, após 21 dias experimentais em condições osteogênicas (114). Para a determinação de ALP, foi utilizado o kit *Alkaline Phosphatase, Diethanolamine Detection* (Sigma-Aldrich, EUA), modificado. Brevemente, a partir das culturas, o sobrenadante foi reservado e adicionado o tampão de lise celular Yasu (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % glicerol, 1 % Triton X-100, 2,5 mM Pirofosfato de sódio e 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato) sobre as células por 1 h em temperatura ambiente. Após a lise celular, as amostras foram adicionadas ao tampão de reação do kit, seguido da solução de 0,67 M p-Nitrofenil fosfato (pNPP) e imediatamente misturadas. Em seguida, foi registrado em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), o aumento da absorbância a 405 nm por 5 min e a taxa linear máxima por minuto foi obtida para as amostras, o branco e o controle positivo.

Para o cálculo da estimativa da atividade de ALP (mMol de pNPP/min x mg de proteína) também foi realizada a quantificação de proteína utilizando-se o *Qubit Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, EUA), onde a intensidade de fluorescência

é diretamente proporcional à concentração de proteína presente em cada amostra e em posse dos dados calculou-se a atividade de ALP a partir da equação:

$$\text{ALP (mMol de pNPP/ min} \times \text{mg de proteína)} = \frac{\left( \left[ \left( \frac{\text{média } A_{405 \text{ nm}}}{18,5} \right) \times 1000 \right] \right)}{60} \times \text{mg de Proteína}$$

18,5: Coeficiente de extinção do pNPP em mM a 405 nm.

#### 4.5 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TECIDUAL - FIBROBLASTO HUMANO (HFIB)

Nesta parte do trabalho foram utilizadas células do tipo fibroblastos humano (hFIB). No primeiro momento, avaliou-se apenas o efeito de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) nos processos de proliferação e migração celular (fase 1). Em seguida, a definição da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 foi avaliada pelos parâmetros: migração e viabilidade celular (fase 2) (Tabela 3).

Tabela 3 - Etapas de desenvolvimento dos ensaios relacionados ao processo de cicatrização tecidual

<b>Fase</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Tipo celular</b>
1	Avaliação dos efeitos de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM)	Proliferação celular	Azul de tripan	Fibroblastos humanos
		Migração celular	<i>Scratch</i>	
2	Determinação da menor concentração ativa do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Migração celular	<i>Scratch</i>	
		Viabilidade celular	MTT	

#### 4.5.1 Condições de cultura de células hFIB

A linhagem de células hFIB é uma cultura primária de fibroblastos derivados do epitélio humano e foi gentilmente doada pela empresa CellSeq (116). 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 0,5 % de penicilina/estreptomicina ( $1000 \text{ U.mL}^{-1}$ ; Gibco, EUA), em estufa contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ , a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 95 % de umidade. O cultivo dos fibroblastos foi realizado na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células por poço, durante 48 h para as placas de 6 poços (Kasvi, Brasil) e  $2 \times 10^4$  por poço durante 24, 48, 72, 96 e 120 h para as placas de 96 poços (Kasvi, Brasil), em meio alpha MEM (Gibco, EUA) suplementado. As culturas foram submetidas aos estímulos de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM; Sigma-Aldrich, EUA) e pelo peptídeo IDR-1018 (4, 16 e  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 24 h após o semeio das células, de acordo com cada fase do trabalho descrita na tabela 4. Para o grupo controle considerou-se o grupo de células hFIB em meio de cultura. Cada grupo experimental foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas.

#### 4.5.2 Ensaio de proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada a partir da combinação do teste de exclusão de azul de tripan associado ao ensaio colorimétrico de MTT. O cultivo de células hFIB foi realizado na concentração de  $16 \times 10^3$  células por poço durante 5 dias, nos tempos experimentais de 24, 48, 72, 96 e 120 h, em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, Brasil), contendo meio alpha MEM (Gibco, EUA) suplementado, contudo, sem adição de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram submetidas aos estímulos de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM; Sigma-Aldrich, EUA), em grupos com 0 e 15 % de SFB. Cada grupo experimental foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas. Todo o sobrenadante foi descartado e adicionou-se a cada poço  $50 \mu\text{L}$  de solução de Tripsina-EDTA 0,25 % (Sigma-Aldrich, EUA) para a desagregação celular. As placas foram então incubadas em estufa contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ , a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 95 % de umidade, por 5 min. Após incubação, foi adicionado  $50 \mu\text{L}$  de meio alpha MEM (Gibco, EUA) incompleto, seguido da adição de  $25 \mu\text{L}$  de solução azul de tripan 0,4 % (Sigma-

Aldrich, EUA) por poço e homogeneização. A contagem das células viáveis foi realizada nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer (117).

#### 4.5.3 Teste de migração

Os fibroblastos são envolvidos na migração, proliferação, contração e produção de colágeno. O teste de migração verifica a atividade de regeneração tecidual/cicatrização de feridas *in vitro*. As células hFIB foram cultivadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  por poço em placas de 6 poços (Kasvi, Brasil), em meio alpha MEM (Gibco, EUA) suplementado. Após 24 h e uma vez formada uma camada celular confluyente, um risco (*Scratch*) foi promovido no meio do poço com uma ponteira de pipeta de 1000  $\mu\text{L}$  (118). O meio de cultura foi então descartado e os *debris* celulares foram removidos por meio de lavagem do poço com tampão PBS 1X em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se novo meio de cultura, sem a presença de SBF, em todos os poços. O poço controle positivo foi suplementado com 10 % de SBF, o controle negativo foi mantido sem SBF. As células então foram submetidas ao estímulo de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM; Sigma-Aldrich, EUA) e tratadas com 3 diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). As fotografias foram obtidas no aumento de 10x em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) nos dias 0, 1 e 2. Foram realizados em cada poço 3 riscos (lado esquerdo, direito e centro) e foram considerados 1 ponto por risco. A quantificação do número de células migradas foi realizada por meio da análise das imagens obtidas de cada grupo experimental utilizando o *software ImageJ* versão 2.0.0-rc-43/1.50e.

#### 4.5.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada após o período de 24 h de incubação das células em placas de 96 poços, contendo os grupos experimentais, a 5 % de  $\text{CO}_2$ , 37 °C e 95 % de umidade. Os grupos controle positivo e negativo do teste, assim como o ensaio de MTT foram realizados conforme previamente descrito (110).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas. Os resultados foram expressos como média e erro padrão das réplicas. A verificação de normalidade dos dados foi realizada pelo teste de *Kolmogorov Smirnov*, seguido pela análise de variância *one-way* ANOVA e o pós teste de Bonferroni pelo *software GraphPad Prism 8* (Instat Califórnia, EUA), considerando-se o valor de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA - OSTEOCLASTOS DERIVADOS DE PBMC

#### 5.1.1 Viabilidade celular

O ensaio de MTT foi realizado para verificar a viabilidade dos macrófagos derivados de PBMC humano após os tratamentos aplicados. Macrófagos derivados de PBMC humano foram usados para simular o processo de osteoclastogênese *in vitro*.

Os macrófagos derivados de PBMC humano foram capazes de manter a viabilidade celular após 24 h de incubação, em todas as situações testadas, ou seja, com os estímulos de concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM), com três diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 e sRANKL (Figura 5).

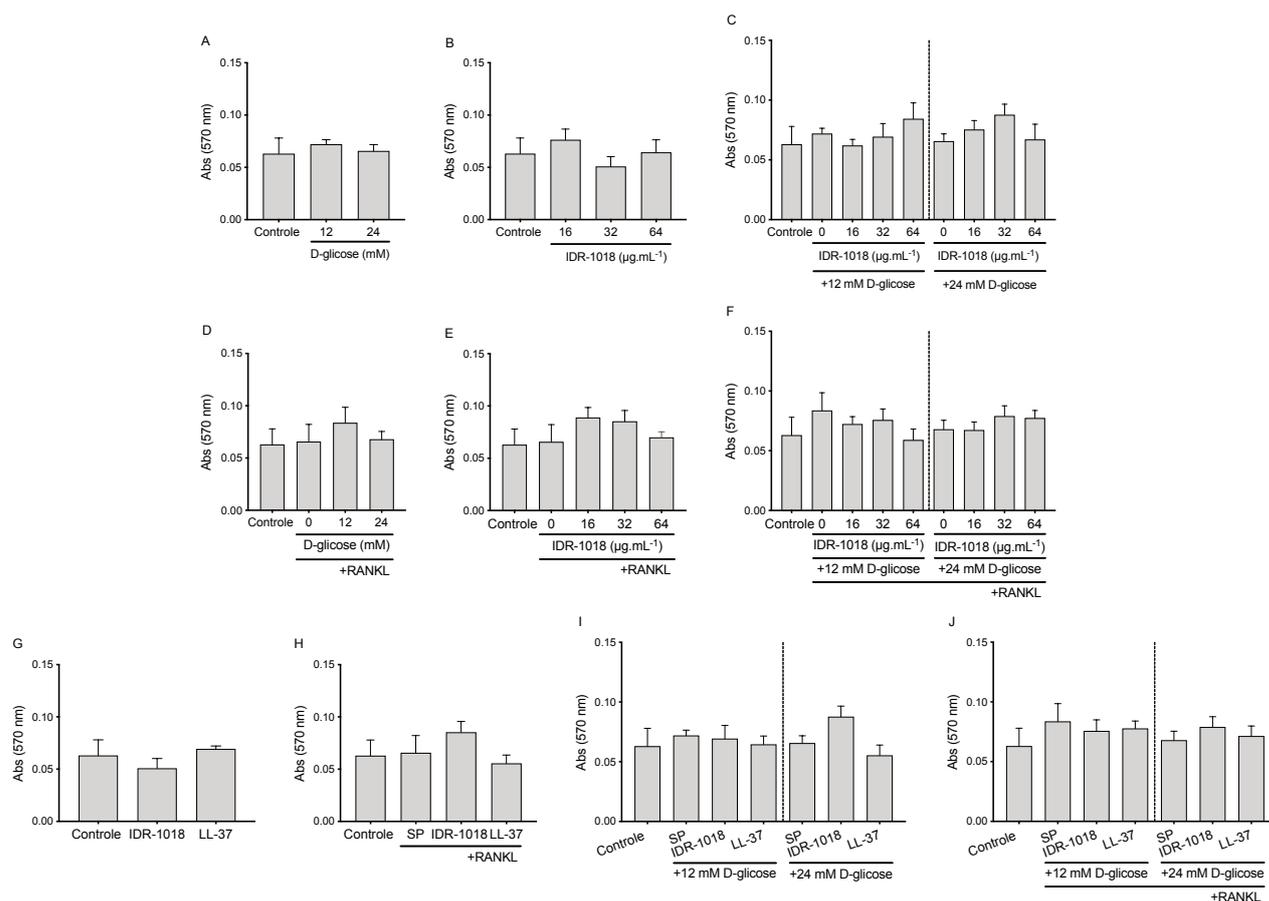


Figura 7 - Viabilidade celular de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 24h. Macrófagos derivados de células PBMC humano estimulados com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose **(A)**. + sRANKL **(D)**. Células estimuladas com M-CSF e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(B)** + sRANKL **(E)**. Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(C)** + sRANKL **(F)**. Células estimuladas com M-CSF, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(G)** + sRANKL **(H)**. Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(I)** + sRANKL **(J)**. SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão em triplicatas técnicas e biológicas. Nenhuma diferença estatística pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.1.2 Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada a partir do sobrenadante de macrófagos derivados do PBMC humano e verificada devido ao seu potencial citotóxico e a sua importância na modulação dos efeitos da inflamação e, conseqüentemente, no processo de osteoclastogênese (Figura 6). Todas as condições testadas, tais como as concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM) e as diferentes concentrações de peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na ausência e presença de sRANKL, promoveram a manutenção da concentração basal de NO, exceto o grupo estimulado com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IDR-1018, 24 mM de D-glicose e sRANKL, comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) que apresentou um aumento na produção de NO (Figura 6F). Este resultado indica um potencial anti-osteoclastogênico *in vitro* do peptídeo IDR-1018, uma vez que a presença de NO em concentrações acima da linha de base inibem a diferenciação e a sobrevivência dos osteoclastos. Quando o peptídeo LL-37 foi adicionado como estímulo, foi possível observar um aumento na produção de NO quando testado sem ( $p < 0,001$ ) ou com sRANKL ( $p < 0,0001$ ), 12 ou 24 mM de D-glicose ( $p < 0,0001$ ), ou mesmo na presença de ambos sRANKL e as altas concentrações de D-glicose ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ ) (Figuras 6G-J). Dessa forma, assim como o peptídeo IDR-1018, o peptídeo LL-37, também apresentou um potencial anti-osteoclastogênico, uma vez que houve uma detecção ainda maior de produção de NO em comparação com o grupo de células estimulado com 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de IDR-1018 (Figura 6J). Dessa forma, nossos achados corroboram os já descritos na literatura, pois os peptídeos IDR-1018 e LL-37, ambos a 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram capazes de aumentar a produção de NO, mesmo em condições de alta glicose. Assim, podem contribuir positivamente para a inibição do processo de diferenciação dos osteoclastos.

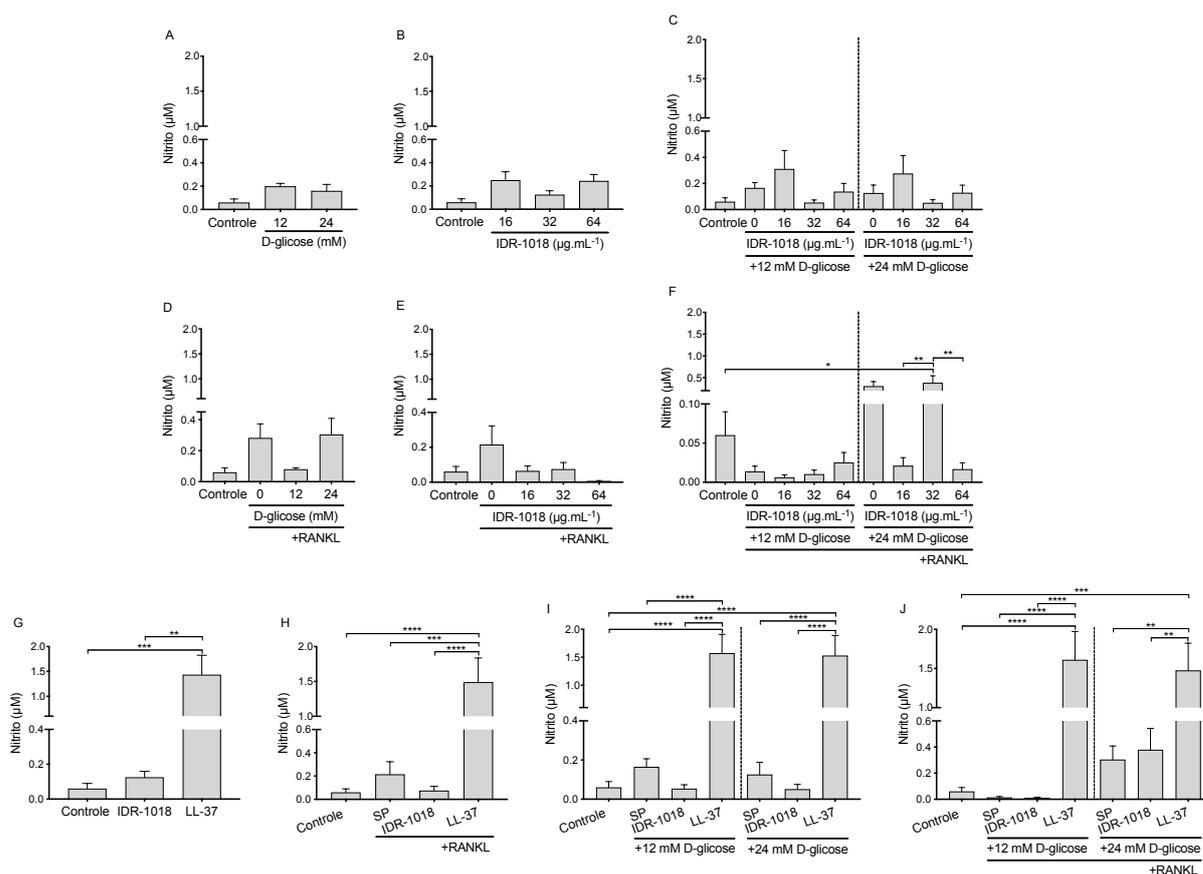


Figura 8 - Produção de NO por macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 24h. Macrófagos derivados de células PBMC humano estimulados com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose **(A)**. + sRANKL **(D)**. Células estimuladas com M-CSF e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 µg.mL<sup>-1</sup>) **(B)** + sRANKL **(E)**. Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 µg.mL<sup>-1</sup>) **(C)** + sRANKL **(F)**. Células estimuladas com M-CSF, peptídeo IDR-1018 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) e peptídeo LL-37 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) **(G)** + sRANKL **(H)**. Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) e peptídeo LL-37 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) **(I)** + sRANKL **(J)**. SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ ) foram representadas por \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\*, respectivamente.

### 5.1.3 Coloração de TRAP

Para a verificação da diferenciação dos osteoclastos foi realizada a coloração TRAP. Células com três ou mais núcleos foram consideradas células TRAP positivas semelhantes a osteoclastos (Figuras 7, 8 e 9). Primeiro, nos grupos estimulados com as altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM), foram contadas aproximadamente 43 células TRAP positivas na cultura de células estimuladas com 12 mM de D-glicose ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 7F e 9A) e 61 células TRAP positivas na cultura de células estimuladas com 24 mM de D-glicose ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 7K e 9A).

O peptídeo IDR-1018 foi testado em três concentrações diferentes (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A cultura de células estimulada com a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou uma diferenciação de apenas 9 células TRAP positivas (Figuras 7B e 9B), 12 células TRAP positivas foram verificadas na cultura de células estimuladas com a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) (Figuras 7C e 9B) e 10 células TRAP positivas foram verificadas na cultura de células estimulada com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figuras 7D e 9B).

Quando as culturas de células foram estimuladas simultaneamente com altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) e diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foi possível observar uma redução na contagem de células TRAP positivas, se comparado com os grupos estimulados apenas com D-glicose. Nas culturas de células que receberam o estímulo de 12 mM de D-glicose, a diferenciação observada foi de 14 células TRAP positivas para todas as três concentrações testadas do peptídeo ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 7G-I e 9C). Os grupos que receberam o estímulo 24 mM de D-glicose e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do IDR-1018 apresentaram diferenciação de aproximadamente 13 células TRAP positivas ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 7L e 9C), enquanto que para ambas as concentrações de 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  observou-se a diferenciação de 15 células TRAP positivas, para cada grupo ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 7M-N e 9C). Nesse primeiro momento, onde apenas as diferentes concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) e do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram testadas, pode-se observar que a adição de D-glicose promoveu a diferenciação dos macrófagos derivados de PBMC humano em osteoclastos *in vitro* e que a adição do peptídeo IDR-1018 foi capaz de inibir o processo de diferenciação de osteoclastos.

O sRANKL é um mediador inflamatório conhecido por sua capacidade de diferenciar macrófagos em osteoclastos. Portanto, devido a essa capacidade, o sRANKL foi utilizado como controle positivo para diferenciação de osteoclastos. O

estímulo sRANKL isolado promoveu a diferenciação de 86 células TRAP positivas (Figuras 8A e 9D). Quando adicionado 12 mM de D-glicose simultaneamente, o sRANKL foi capaz de promover a diferenciação de 109 células TRAP positivas (Figuras 8F e 9D), enquanto quando a concentração de 24 mM de D-glicose foi adicionada à cultura de células juntamente com o sRANKL, houve uma diferenciação de 144 células TRAP positivas (Figuras 8K e 9D).

A etapa seguinte foi avaliar o efeito do peptídeo IDR-1018 quando na presença de sRANKL. O IDR-1018 foi capaz de reduzir a diferenciação de macrófagos em células TRAP positivas nas três concentrações testadas. Nas culturas de células estimuladas com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo, foram observadas 55 células TRAP positivas (Figuras 8B e 9C), enquanto nas culturas de células estimuladas com 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, foi observado apenas 30 e 34 células TRAP positivas, respectivamente ( $p < 0,01$ ) (Figuras 8C-D e 9E).

Considerando todos os resultados obtidos, a concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi a escolhida para comparação com o peptídeo LL-37 e a concentração utilizada nas análises subsequentes. Essa foi a menor concentração capaz de promover inibição significativa da diferenciação de osteoclastos *in vitro*. Uma situação semelhante, foi observada quando as culturas celulares foram estimuladas com o peptídeo LL-37, onde observou-se apenas a diferenciação de 4 células TRAP positivas (Figura 7E e 9G). Ao adicionar sRANKL juntamente com o peptídeo LL-37, foi obtida uma contagem de 28 células TRAP positivas (Figura 8E e 9H), e na presença de 12 e 24 mM de D-glicose, sRANKL e o peptídeo LL-37, observou-se uma contagem de 23 e 42 células TRAP positivas diferenciadas, respectivamente para os grupos de 12 e 24 mM de D-glicose (Figuras 8J, 8O e 9J). Dessa forma, observou-se que tanto o peptídeo IDR-1018, quanto o LL-37, foram capazes de reduzir a diferenciação de osteoclastos *in vitro*.

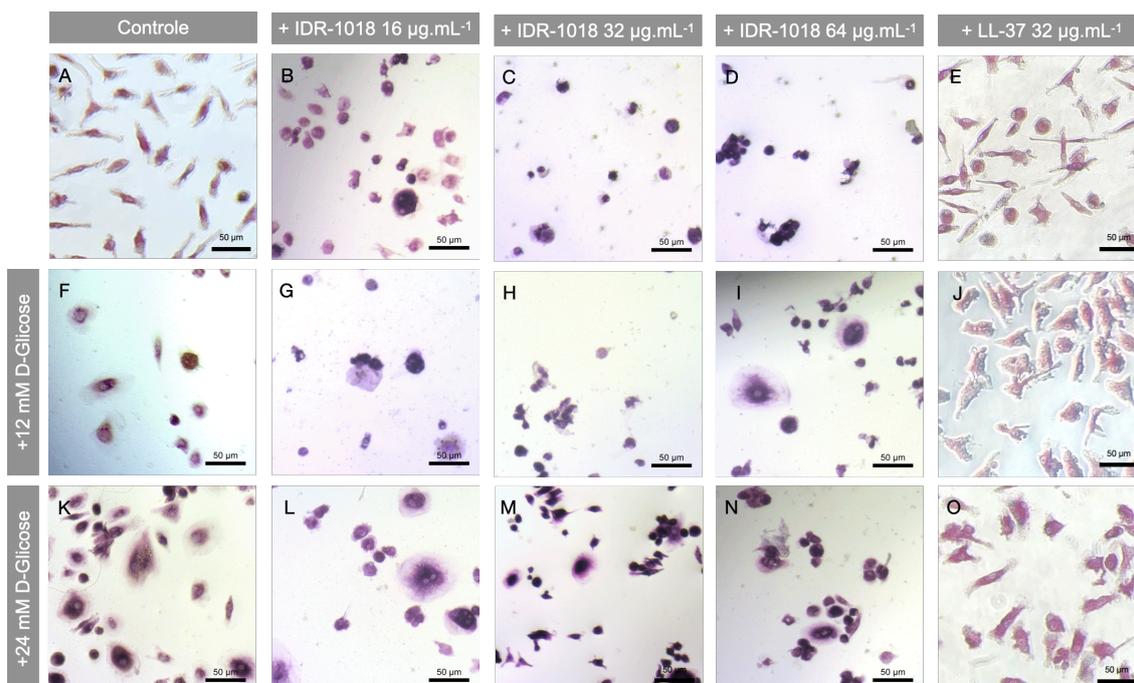


Figura 9 - Coloração TRAP para osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias. Macrófagos derivados de PBMC humano estimulados com M-CSF, D-glicose, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), conforme descrito nas imagens (A-O). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Fotos representativas de triplicatas técnicas e biológicas.

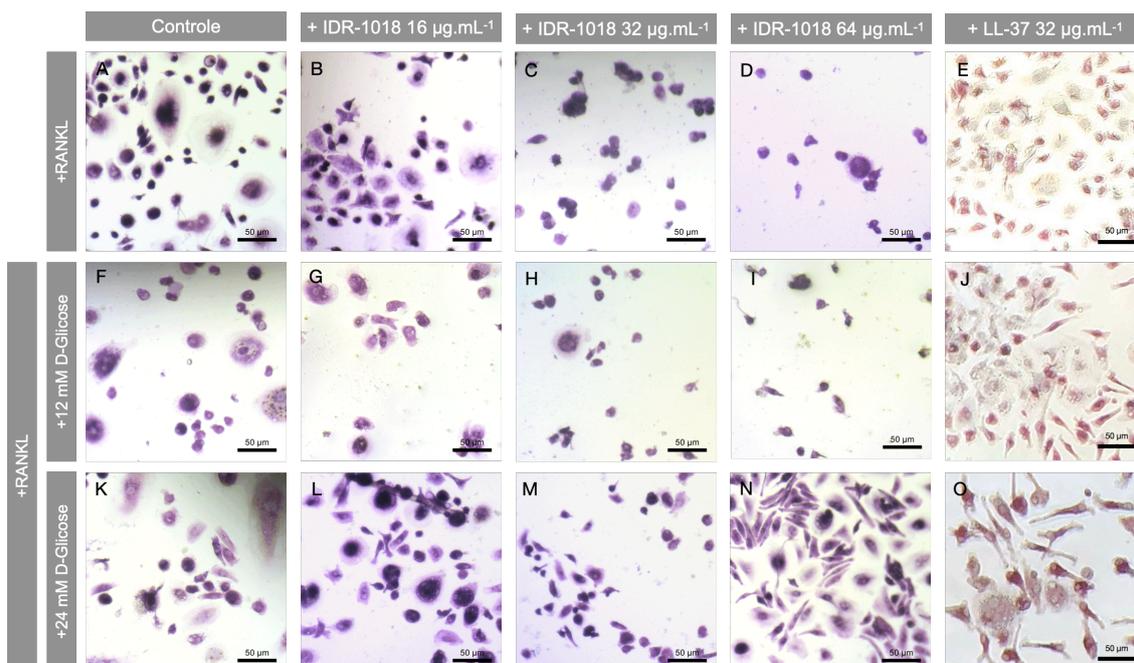


Figura 10 - Coloração TRAP para osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias. Macrófagos derivados de PBMC humano estimulados com M-CSF, D-glicose, sRANKL, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), conforme descrito nas imagens (A-O). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Fotos representativas de triplicatas técnicas e biológicas.

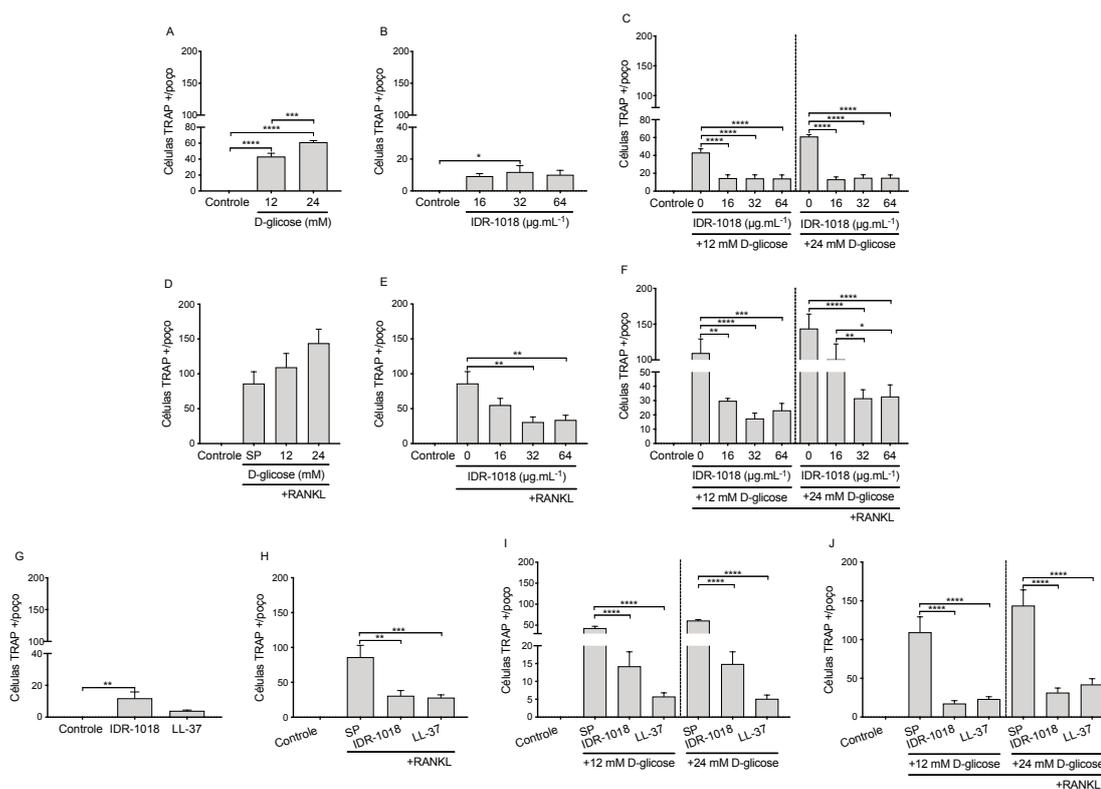


Figura 11 - Osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano *in vitro*, após 14 dias. Macrófagos derivados de PBMC humano estimulados com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose (A) + sRANKL (D). Células estimuladas com M-CSF e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (B) + sRANKL (E). Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (C) + sRANKL (F). Células estimuladas com M-CSF, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G) + sRANKL (H). Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (I) + sRANKL (J). SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) foram representadas por \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, respectivamente.

### 5.1.3.1 Número de núcleos por osteoclasto diferenciado

O número de núcleos por osteoclasto diferenciado foi outro parâmetro avaliado a partir da coloração TRAP. Em todos os tratamentos testados em que houve diferenciação de osteoclastos, foi também realizada a contagem de núcleos e a contagem permaneceu em aproximadamente 3 núcleos para cada osteoclasto diferenciado (Figura 10).

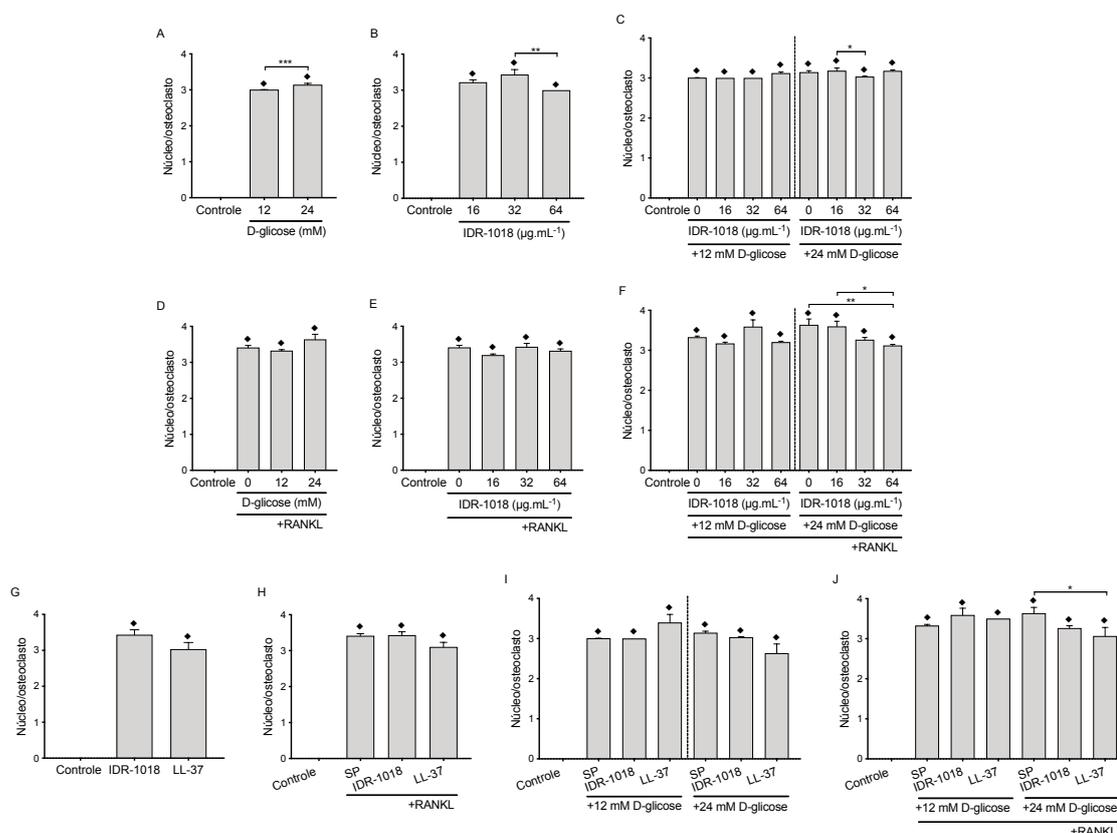


Figura 12 - Número de núcleos por osteoclastos diferenciados de macrófagos derivados de PBMC humano. Macrófagos derivados de PBMC humano estimulados com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose (A) + sRANKL (D). Células estimuladas com M-CSF e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 µg.mL<sup>-1</sup>) (B) + sRANKL (E). Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64 µg.mL<sup>-1</sup>) (C) + sRANKL (F). Células estimuladas com M-CSF, peptídeo IDR-1018 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) e peptídeo LL-37 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) (G) + sRANKL (H). Células estimuladas com M-CSF, 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) e peptídeo LL-37 (32 µg.mL<sup>-1</sup>) (I) + sRANKL (J). SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) foram representadas por \*, \*\*, e \*\*\*, respectivamente. ( $p < 0,0001$ ) foi representado por ◆ em comparação com o grupo controle de macrófagos derivados de PBMC humano não estimulados.

## 5.1.4 Produção de citocinas

### 5.1.4.1 Citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ e IL-6

Para entender os fatores que podem estar associados à inibição na osteoclastogênese *in vitro* promovida pelos peptídeos IDR-1018 e LL-37, avaliou-se a produção das citocinas envolvidas neste processo. As citocinas desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase óssea com influência na formação e função dos osteoclastos (119,120). Uma vez que os peptídeos IDR-1018 e LL-37 não causaram alteração na viabilidade celular e até promoveram diminuição na diferenciação dos osteoclastos, foram verificados os efeitos das concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM), de ambos os peptídeos (IDR-1018 e LL-37), associados ou não ao sRANKL sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, produzidas pelos macrófagos derivados de PBMC humano (Figura 11).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que estimula a reabsorção óssea por induzir a proliferação de precursores de osteoclastos e atua nos osteoclastos como uma citocina anti-apoptótica (121,122). Dessa forma, ambas as altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) não foram capazes de alterar a produção de TNF- $\alpha$ , comparado ao grupo controle. Em contraste, a cultura de células estimulada apenas com sRANKL apresentou um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11A). Já o estímulo do peptídeo IDR-1018 nas culturas de células apresentou uma redução na produção de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11B), enquanto o peptídeo LL-37 manteve o nível de TNF- $\alpha$  semelhante ao do grupo controle (Figura 11B). Da mesma forma, mesmo quando as culturas de células foram estimuladas com os peptídeos IDR-1018 e LL-37 e também com sRANKL, ambos os peptídeos demonstraram uma redução na produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11B). Na presença das altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM), os peptídeos IDR-1018 e LL-37 apresentaram uma redução na produção de TNF- $\alpha$ , comparado ao grupo de controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 11C).

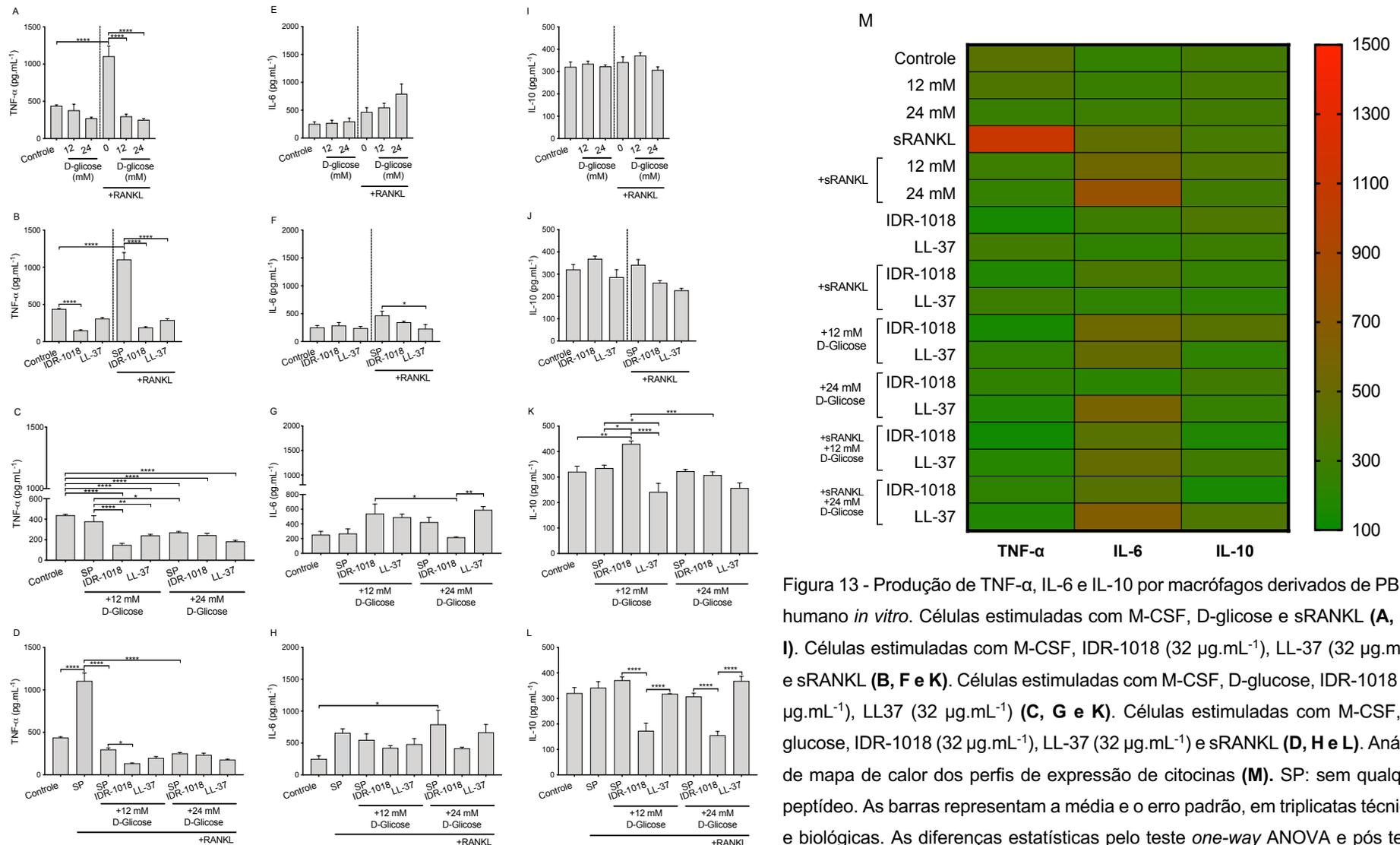
Já a produção de IL-6 está relacionada à regulação de osteoclastos maduros. Apenas o peptídeo LL-37 apresentou uma redução na produção de IL-6, quando comparado ao grupo estimulado com sRANKL ( $p < 0,05$ ) (Figura 11F). Quando as altas

concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) foram adicionadas às culturas, o grupo contendo o peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose também apresentou uma redução na produção de IL-6, quando comparado com o grupo estimulado com o peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (Figura 11G).

#### 5.1.4.2 Citocina anti-inflamatória IL-10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória conhecida por sua capacidade de inibir a formação de osteoclastos (119). Quando as culturas de células foram estimuladas com as concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM) e os peptídeos IDR-1018 e LL-37, ambos na ausência ou presença de sRANKL, não houve alteração na produção de IL-10 em comparação com o grupo de controle (Figuras 11I e 11J). No entanto, quando as culturas de células foram estimuladas simultaneamente com 12 mM de D-glicose e o peptídeo IDR-1018, houve um aumento na produção de IL-10, comparado ao grupo controle e o grupo estimulado com 24 mM de D-glicose e o peptídeo IDR-1018 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) (Figura 11K). Em contraste, quando sRANKL foi adicionado às culturas de células estimuladas com ambos os peptídeos e as altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM), foi observada uma redução na produção de IL-10 nos grupos estimulados com o peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose e com o peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose, em comparação com os grupos estimulados 12 mM de D-glicose e sRANKL e 24 mM de D-glicose e sRANKL ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ ) (Figura 11L). Dessa forma, ao comparar ambos os peptídeos, o peptídeo LL-37 apresentou melhor resposta anti-inflamatória.

O mapa de calor apresenta o compilado da expressão das citocinas testadas. Na escala do mapa de calor, o verde representa uma redução na produção, enquanto o vermelho representa um aumento na produção das citocinas analisadas (Figura 11M).



de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) foram representadas por \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\*, respectivamente.

## 5.2 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE DEPOSIÇÃO ÓSSEA - OSTEOLASTOS DERIVADOS DE SAOS-2

### 5.2.1 Viabilidade celular

Ao contrário da viabilidade celular apresentada pelos macrófagos derivados de PBMC humano, a cultura de células SaOs-2 não seguiu o mesmo padrão de viabilidade. As células SaOs-2 apresentaram mais de 50% de redução na viabilidade quando a cultura celular foi exposta ao estímulo de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) (Figura 12A). Quando as concentrações do peptídeo IDR-1018 foram testadas, a viabilidade diminuiu em aproximadamente 60 % no grupo estimulado com a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ) e aproximadamente 70 % nos grupos estimulados com 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 12B). Quando as altas concentrações de D-glicose foram associadas às diferentes concentrações do peptídeo, o IDR-1018 apresentou uma recuperação de viabilidade na presença de 12 mM de D-glicose, com uma redução apenas de aproximadamente 35% da viabilidade nos grupos contendo 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já no grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, houve redução de viabilidade celular de aproximadamente 56 %, em comparação ao grupo controle. No entanto, essa recuperação da viabilidade não pode ser observada nos grupos testados com 24 mM de D-glicose, onde observou-se uma redução de aproximadamente 70 % da viabilidade celular nos grupos contendo 16 e 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) e redução de 47 % da viabilidade celular no grupo estimulado com 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , quando comparado ao grupo controle (Figura 12C).

Em um segundo momento, ambos os peptídeos (IDR-1018 e LL-37) foram testados com concentração de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , na ausência e presença de concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM). Primeiramente, os peptídeos foram analisados de forma isolada e o peptídeo IDR-1018 apresentou redução de aproximadamente 70 % da viabilidade, comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, o peptídeo LL-37 promoveu um aumento de aproximadamente 53 % da viabilidade celular, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 12D). Quando os peptídeos e as concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM) foram testados, o peptídeo IDR-1018 manteve a viabilidade celular em 64 % e o peptídeo LL-37

aumentou 22 %, comparado ao grupo estimulado apenas com 12 mM de D-glicose ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, houve diminuição de aproximadamente 70 % da viabilidade celular no grupo estimulado com o peptídeo IDR-1018 e 24 mM de D-glicose. Enquanto o peptídeo LL-37 aumentou aproximadamente 50 % quando comparado ao grupo estimulado com 24 mM de D-glicose ( $p < 0,0001$ ) (Figura 12E).

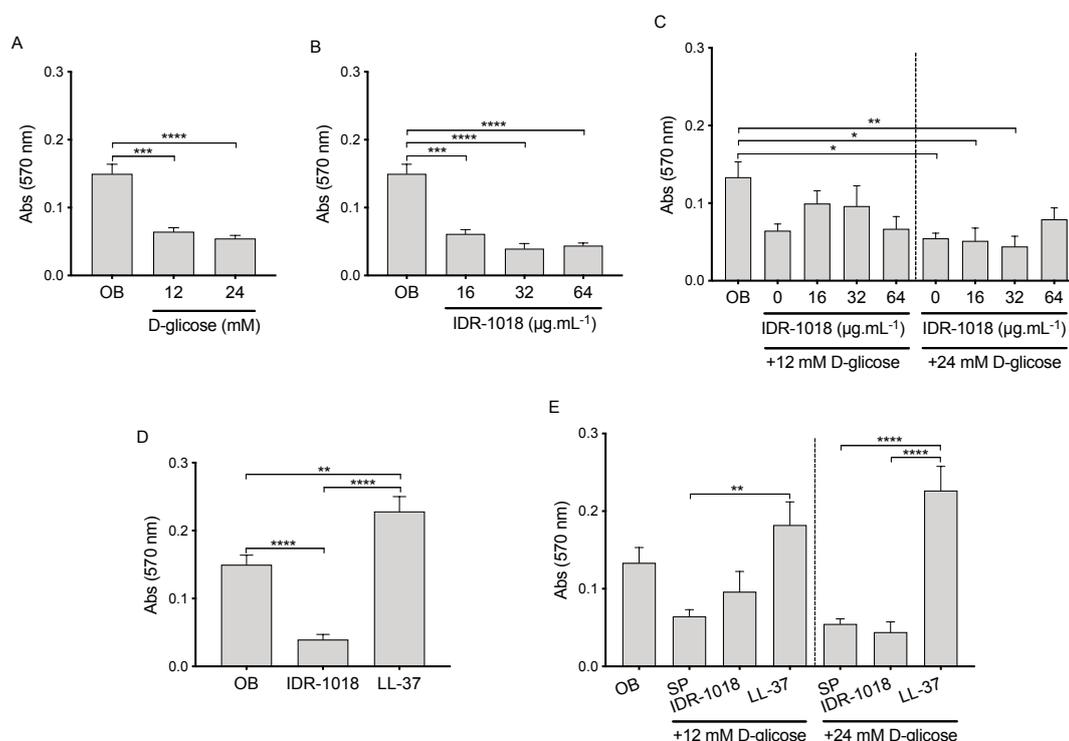


Figura 14 - Viabilidade celular de células SaOs-2 *in vitro* em condições osteogênicas (ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona), após 21 dias. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose **(A)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(B)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(C)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e o peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(D)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(E)**. OB: células semelhantes a osteoblastos; SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) foram representadas por \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\*, respectivamente.

## 5.2.2 Quantificação de fosfato inorgânico

O  $P_i$  é um dos principais componentes necessários à formação mineral óssea, por isso foi quantificado no sobrenadante das células SaOs-2 (123). Após 21 dias, a quantificação de  $P_i$  apresentou valores semelhantes em todas as situações testadas, envolvendo as concentrações crescentes de D-glicose (12 e 24 mM), as diferentes concentrações de IDR-1018 e LL-37 (Figura 13). Apenas as células estimuladas com  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo LL-37 apresentaram uma redução na quantificação de  $P_i$  em comparação com o grupo estimulado com  $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 ( $p < 0,05$ ) (Figura 13D).

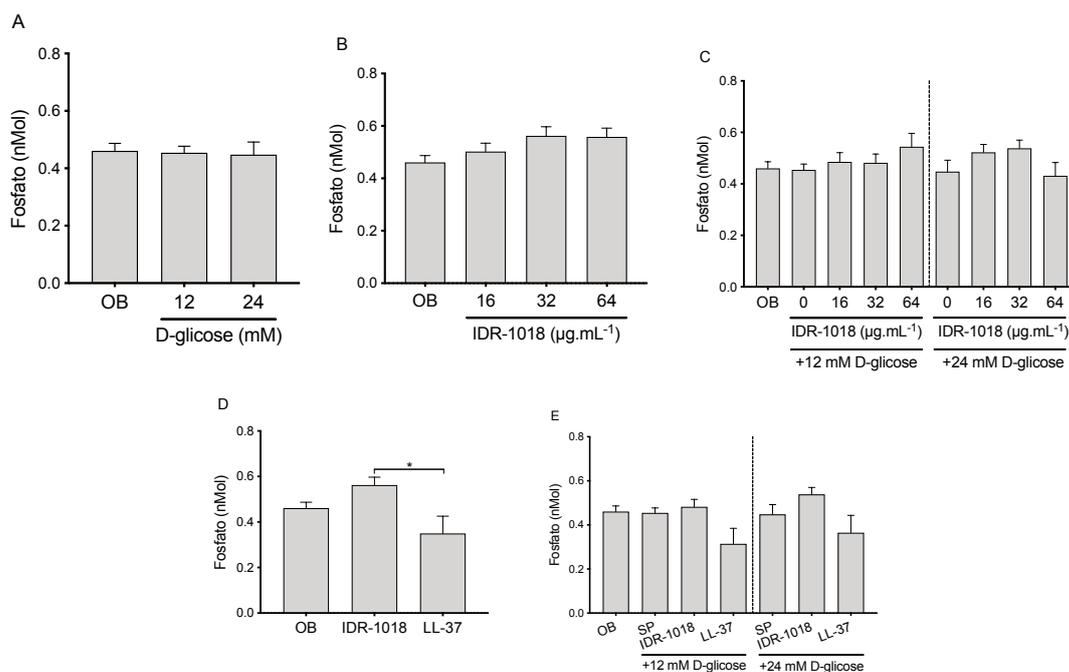


Figura 15 - Quantificação de fosfato inorgânico no sobrenadante de células SaOs-2 *in vitro* sob condições osteogênicas (ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona), após 21 dias. Sobrenadante de células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose (A). Sobrenadante de células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (16, 32 e  $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (B). Sobrenadante de células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e  $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (C). Sobrenadante de células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com peptídeo IDR-1018 ( $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 ( $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (D). Sobrenadante de células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 ( $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 ( $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (E). OB: células semelhantes a osteoblastos; SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. A diferença estatística pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) foi representada por \*.

### 5.2.3 Quantificação de fosfatase alcalina (ALP)

A ALP é uma enzima importante envolvida no processo de mineralização e, portanto, sua atividade foi verificada nas culturas de células SaOs-2 (Figura 14) (124). Após 21 dias, observou-se que apenas as culturas celulares estimuladas com 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 apresentaram uma atividade de ALP mais significativa em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (figura 14B e 14D).

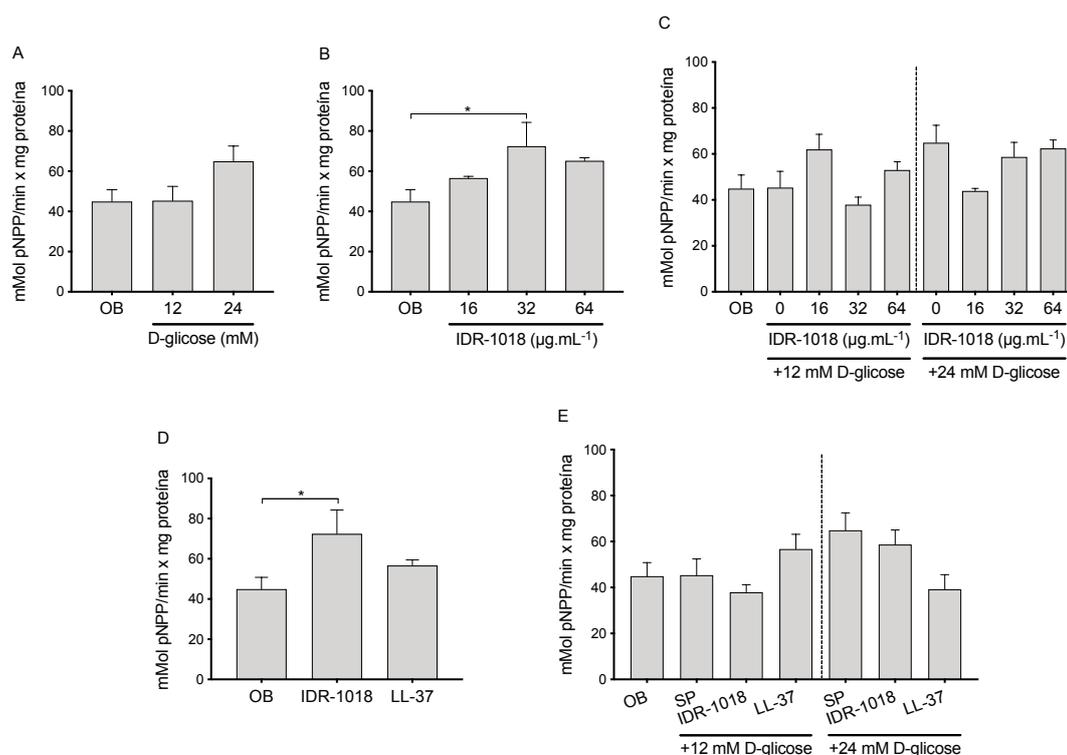


Figura 16 - Atividade da enzima ALP por miligrama de proteína em lisado de células SaOs-2 cultivadas em condições osteogênicas (ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona) *in vitro*, após 21 dias. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose **(A)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) **(B)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) **(C)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e o peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) **(D)**. Células SaOs-2 em condições osteogênicas estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose, peptídeo IDR-1018 (32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e peptídeo LL-37 (32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) **(E)**. OB: células semelhantes a osteoblastos; SP: sem qualquer peptídeo. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. A diferença estatística pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) foi representada por \*.

#### 5.2.4 Coloração e quantificação de vermelho de alizarina

Para a verificação da diferenciação dos osteoblastos, a quantificação da coloração de vermelho de alizarina foi realizada (Figura 15). Primeiro, as células SaOs-2 foram estimuladas apenas com as diferentes concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) e o grupo de células estimulado com 12 mM de D-glicose apresentou um ligeiro aumento na quantificação de vermelho de alizarina em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15A). O próximo passo foi verificar o efeito das três diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), onde a concentração de 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  apresentou um ligeiro aumento na quantificação de vermelho de alizarina quando comparado com a observada no grupo estimulado com 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 ( $p < 0,05$ ) (Figura 15B). Em seguida, as três diferentes concentrações de peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram testadas na presença das altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM). A cultura de células estimulada com 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, tanto na presença de 12 mM, quanto 24 mM de D-glicose apresentaram uma quantificação ligeiramente maior do que os grupos estimulados com 32 e 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , na presença de ambas as concentrações (12 e 24 mM) de D-glicose ( $p < 0,05$ ) (figura 15C e 15D).

Em um segundo momento, as culturas de células SaOs-2 foram estimuladas com 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos peptídeos IDR-1018 e LL-37, além das altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM). A presença apenas dos peptídeos na cultura de células não apresentou nenhuma alteração na quantificação de vermelho de alizarina, quando comparado com o grupo de controle (Figura 15E). Mas quando 12 mM de D-glicose foi adicionado às culturas de células, o peptídeo LL-37 apresentou maior quantificação de vermelho de alizarina quando comparado com o grupo estimulado com o peptídeo IDR-1018 e 12 mM de D-glicose ( $p < 0,01$ ) (Figura 15F). E por fim, apenas o grupo de células estimulado com 24 mM de D-glicose apresentou uma redução na quantificação de vermelho de alizarina, quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15G).

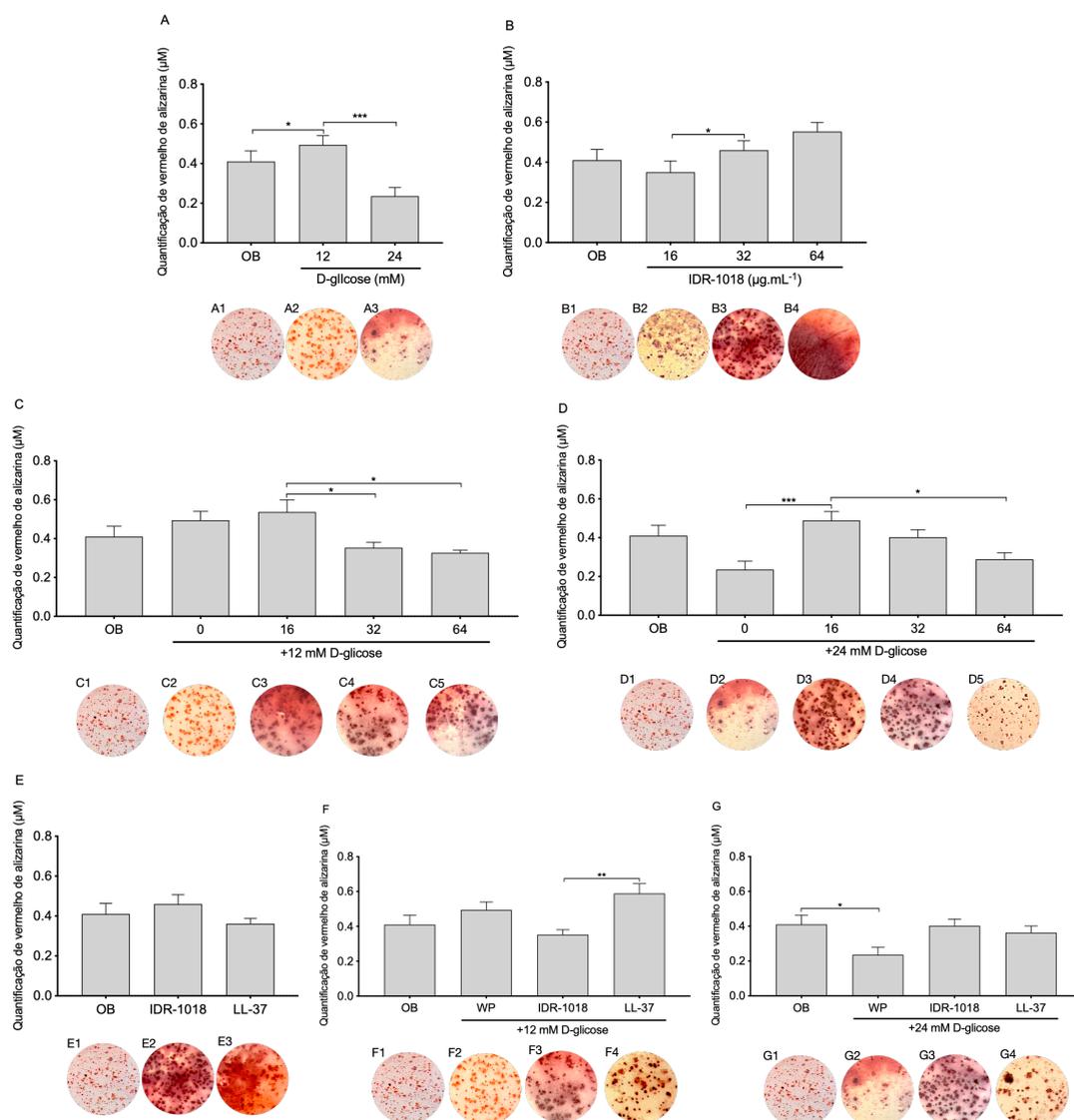


Figura 17 - Coloração e quantificação da coloração vermelho de alizarina para mineralização de células SaOs-2 sob condições osteogênicas (ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona) *in vitro*, após 21 dias. Células SaOs-2 em condições osteogênicas (A1) estimuladas com 12 (A2) e 24 mM de D-glicose (A3; A). Células estimuladas com IDR-1018 - 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (B1), 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (B2) e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (B3; B). Células estimuladas com 12 mM de D-glicose, e IDR-1018 - 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (C1), 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (C2) e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (C3; C). Células estimuladas com 24 mM de D-glicose e IDR-1018 - 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (D1), 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (D2) e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (D3; D). Células estimuladas com IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (E1) e LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (E3; E). Células estimuladas com 12 mM de D-glicose, IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F3) e LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (F4; F). Células estimuladas com 24 mM de D-glicose, IDR-1018 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G3) e LL-37 (32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (G4; G). OB: células do tipo osteoblasto. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. SP: sem qualquer peptídeo. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) foram representadas por \*, \*\* e \*\*\*, respectivamente. Imagens em escala de 500  $\mu\text{m}$ . Fotos representativas de triplicatas técnicas e biológicas.

### 5.3 ENSAIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TECIDUAL - FIBROBLASTO HUMANO (HFIB)

#### 5.3.1 Viabilidade celular

Assim como nas culturas de macrófagos derivados de PBMC humano, as células HFIB mantiveram sua viabilidade após 24 h de incubação em todas as condições testadas, ou seja, na presença das diferentes concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) e com as diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A menor taxa de viabilidade celular foi observada na cultura celular que recebeu o estímulo de 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018, apresentando 79 % de viabilidade celular, quando comparada ao grupo estimulado com 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

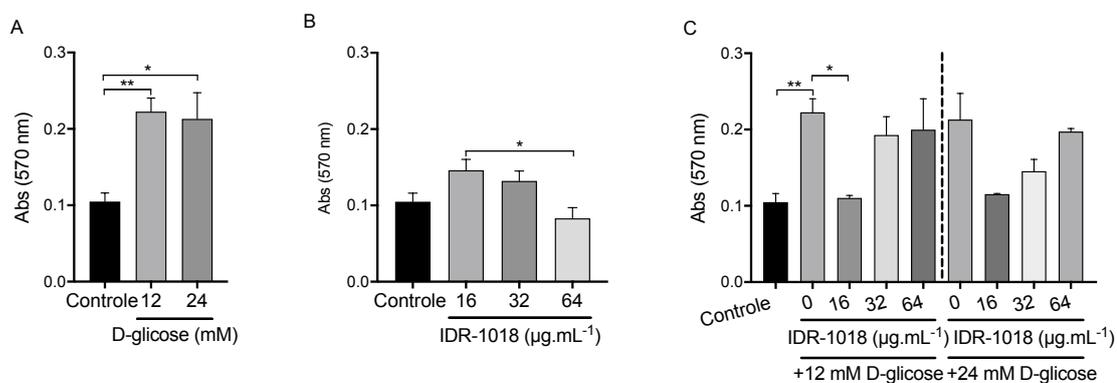


Figura 18 - Viabilidade celular de células hFIB *in vitro*, após 24h. Células hFIB estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose **(A)**. Células hFIB estimuladas com peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(B)**. Células hFIB estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) **(C)**. Controle: células hFIB com 0% de SBF. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) foram representadas por \* e \*\*, respectivamente.

### 5.3.2 Ensaio de migração

Para a caracterização preliminar dos grupos de controle e, em seguida, para avaliar os efeitos reais do peptídeo IDR-1018 na migração celular, os efeitos da D-glicose e do SFB na proliferação celular foram avaliados em culturas de células hFIB utilizando o ensaio de exclusão de azul de tripan. Como mostrado na Figura 17, após 24 horas de incubação, todas as condições testadas mantiveram de forma semelhante o número de células. Após 72 h, foi possível verificar a diferença promovida pela presença da D-glicose e do SFB nas culturas. Quando ambos os estímulos (SFB e D-glicose) foram aplicados à cultura de células, um número maior de células contadas foi observado, quando comparado a contagem de células do grupo sem nenhum estímulo. Curiosamente, foi possível perceber um aumento de aproximadamente 117 % do número de células, no tempo de 72 h, quando metade do meio de cultura e estímulos foram renovados, para o tempo de 96 h, nas culturas estimuladas ao mesmo tempo com 15 % de SFB e 24 mM de D-glicose. Após esse período, no mesmo grupo foi observada uma redução de 42,6 % na contagem de células após 120 h, indicando que ambos os estímulos atuam rapidamente na proliferação celular. Mesmo no tempo experimental final (120 h), todas as células estimuladas com D-Glucose (12 ou 24 mM) e/ou SFB mantiveram o número de células superior ao da cultura de células na ausência de estímulos (0% SFB e 0 mM de D-glicose).

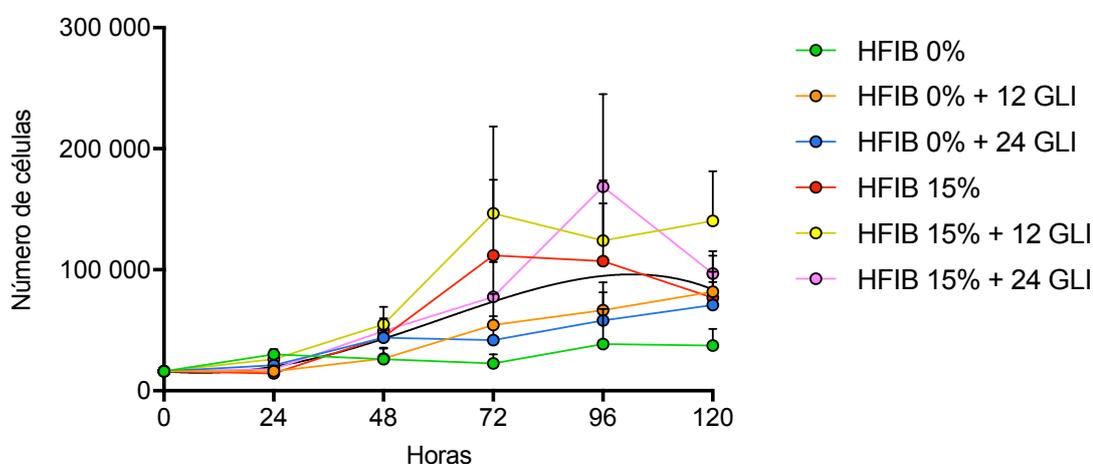


Figura 19 - Proliferação celular de células hFIB *in vitro*, após 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. Células hFIB estimuladas com 0 e 15% de SBF e 12 e 24 mM de D-glicose. Os dados representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. Os dados foram analisados por regressão não linear e pós teste de Kolmogorov-smirnov ( $p < 0,05$ ).

Após o ensaio de proliferação celular, o potencial do peptídeo IDR-1018 para migrar e promover o fechamento de uma ferida foi avaliado em células hFIB por meio de ensaio de *scratch in vitro*. Após 24 h, observou-se que a concentração de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 sozinha promoveu leve migração celular (Figura 18B e 19AD), que foi acentuada com a adição de 12 mM de D-glicose (Figura 18C e 19AG). Em contraste, todas as outras condições testadas (diferentes concentrações de D-glicose sozinhas e diferentes concentrações de peptídeo IDR-1018 em associação com 12 e 24 mM de D-glicose) foram capazes de promover aproximadamente 50 % do fechamento da ferida (Figura 18A, 18C, 19E, 19N, 19X, 19AG, 19H, 19Q, 19AA e 19AJ).

Após 48 h, a concentração de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 promoveu um maior número de células migradas (Figura 14E e 15L) em comparação com o grupo controle e com os grupos estimulados pelo IDR-1018 ( $32$  e  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os grupos estimulados com  $32$  e  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 não foram capazes de promover mudanças no número de células migradas, quando comparado ao grupo controle (Figura 18E, 19C, 19U e 19AE). Quando as diferentes concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) foram adicionadas às diferentes concentrações do peptídeo IDR-1018, todas as condições testadas foram capazes de promover 100 % do fechamento da ferida (Figura 19F, 19O, 19Y, 19AH, 19I, 19R, 19AB e 19AK), quando comparadas ao grupo controle.

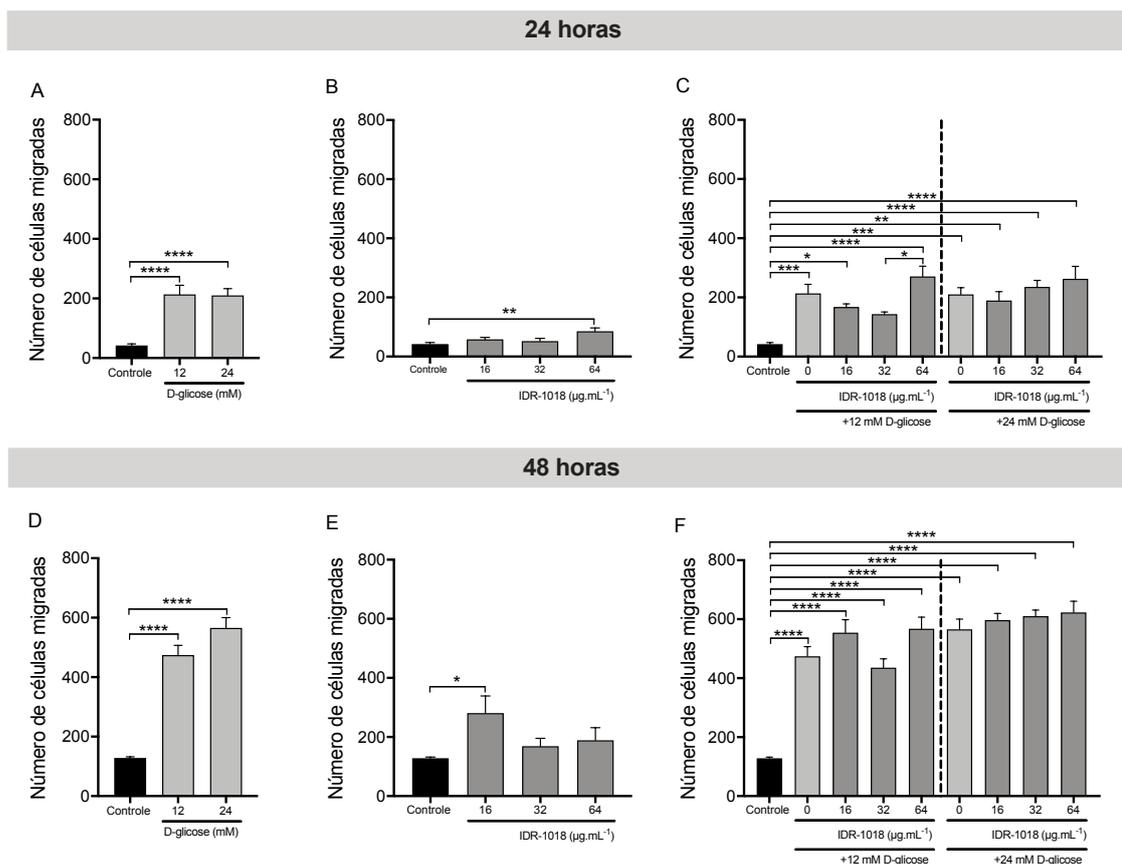


Figura 20 - Número de células hFIB migradas *in vitro*, após *scratch* em 24 e 48h. Células hFIB estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose (**A e D**). Células hFIB estimuladas com o peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (**B e E**). Células hFIB estimuladas com 12 e 24 mM de D-glicose e peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (**C e F**). Controle: células hFIB com 0% de SBF. As barras representam a média e o erro padrão, em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ ) foram representadas por \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\*, respectivamente.

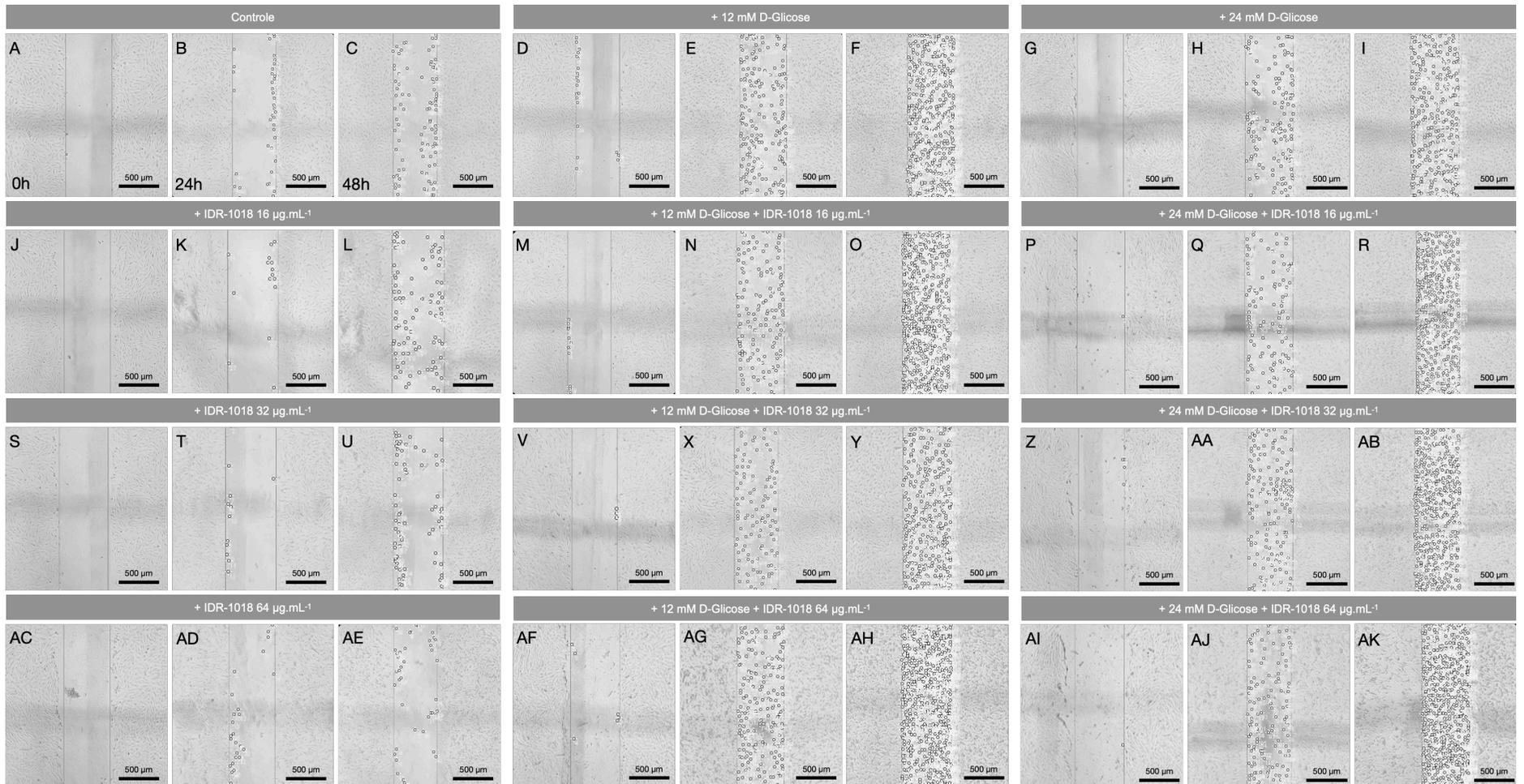


Figura 21 - Migração de células hFIB *in vitro*, após *scratch* em 0, 24 e 48h. Células hFIB estimuladas na ausência de SFB (0%) (A - C), na presença do peptídeo IDR-1018 (16, 32 e 64  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (J-L, S-U, AC-AE), 12 mM (D-F, M-O, V-Y, AF-AH) e 24 mM de D-glicose (G-I, P-R, Z-AB, AI-AK). Os pontos em cinza representam as células migradas marcadas. Barra de escala = 500  $\mu\text{m}$ . Fotos representativas de triplicatas técnicas e biológicas.

## 6 DISCUSSÃO

O DM se apresenta como um problema de saúde pública que afeta cerca de 463 milhões de pessoas em todo o mundo (125). O envelhecimento populacional e as mudanças no estilo de vida geralmente são identificados como os principais determinantes para o DM2 (126). Já se sabe que o DM é responsável por várias complicações sistêmicas e que a hiperglicemia está relacionada a grande parte delas. Nesse sentido, do ponto de vista ósseo, apesar da alta densidade mineral óssea (DMO) em pacientes com DM2, a fragilidade óssea também foi reconhecida como uma complicação relacionada à hiperglicemia crônica devido a alterações na microestrutura óssea. A persistência da alta concentração de açúcar no sangue aumenta os níveis de estresse oxidativo, que por sua vez aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ROS, resultando em um ciclo vicioso de inflamação crônica, aumento de reabsorção óssea e redução de formação óssea (7,127). Para isso, ainda não há terapia e diretrizes explicitamente projetadas para o tratamento da fragilidade óssea em pacientes diabéticos (7,128). Atualmente, o recomendado é a manutenção de um bom controle glicêmico, intervenções de estilo de vida (perda de peso) e, quando indicado, medicamentos voltados para o tratamento da osteoporose (7,129).

Nessa condição, considerando a estreita relação entre o sistema imunológico e o metabolismo ósseo, uma vez que as citocinas são responsáveis pela manutenção da homeostase óssea, peptídeos já foram descritos com potencial para modular o sistema imunológico e peptídeos antimicrobianos já foram utilizados em estudos envolvendo osteoclastos e osteoblastos (130,131). Por exemplo, Yang et al. (132) desenvolveu um hidrogel formado a partir da combinação do peptídeo carreador RADA16 e o peptídeo antimicrobiano catiônico Tet213 para avaliação de osteogênese na tíbia de coelhos infectadas com *S. aureus*. A combinação se mostrou eficaz na proliferação de osteoblastos, melhorou a osteogênese e diminuiu a osteomielite induzida nos animais. Já o peptídeo antimicrobiano beta-defensina-2humana (hBD2) apresentou inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* e *S. epidermidis* e uma danificação das membranas dessas bactérias, além de promover a diferenciação osteogênica precoce e tardia de células-tronco mesenquimais da medula óssea de

camundongos avaliada por meio de proliferação celular, atividade de ALP e coloração de vermelho de alizarina (133).

De modo semelhante, o peptídeo LL-37 pertence ao grupo das catelecidinas, que por sua vez pertence à família dos peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos fazem parte da resposta imune inata e são expressos por neutrófilos, monócitos, e por osteoblastos e macrófagos da medula óssea (37). Por falta de um fármaco padrão ouro no tratamento de fragilidade óssea diabética e por ser um peptídeo amplamente descrito na literatura, inclusive como supressor da osteoclastogênese, o peptídeo LL-37 foi escolhido para ser utilizado como comparativo neste trabalho.

O tópico DM relacionado a respostas imunes começou a ser estudado pelo nosso grupo em 2014 e como parte da dissertação de mestrado apresentamos os efeitos de diferentes concentrações de glicose (5, 8, 12 e 24 mM) associadas aos estímulos de LPS e IFN- $\gamma$  em células RAW 264.7 sobre a produção de mediadores imunes (134). Seguindo nessa linha, avaliou-se nessas mesmas condições, entretanto apenas com as concentrações de 12 e 24 mM de D-glicose, uma vez que as concentrações de 5 e 8 mM (similar à normoglicemia) não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo controle, os efeitos de diferentes peptídeos imunomoduladores, e entre eles, o peptídeo IDR-1018 foi o selecionado para a continuação dos estudos, por promover melhor reposta em produção de citocinas e portanto, optou-se por continuar os estudos envolvendo o peptídeo IDR-1018, mas dessa vez, abordando o DM e o aspecto ósseo e cicatricial.

Atualmente não há estudos envolvendo peptídeos antimicrobianos ou HDPs relacionados à condição óssea associada ao DM. Assim como, ainda não há literatura sobre o papel que o peptídeo IDR-1018 pode desempenhar no processo de manutenção da homeostase óssea, e para isso, em uma condição com altas concentrações de D-glicose, o potencial dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 foram testados nos processos de osteoclastogênese e mineralização *in vitro*.

Primeiro, os peptídeos IDR-1018 e LL-37 não foram citotóxicos para os macrófagos derivados de PBMCs humanos. Resultados semelhantes foram observados por Alencar-Silva et al. (135) utilizando 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 em células derivadas de pele humana, como fibroblastos primários, queratinócitos e melanócitos. Da mesma forma, Marin-Luevano et al. (136) demonstrou por meio da avaliação da atividade respiratória residual com o ensaio WST-1 que o peptídeo IDR-

1018 não alterou a viabilidade das células endoteliais, porém diminuiu a viabilidade dos queratinócitos em aproximadamente 20% somente quando o peptídeo foi testado em concentrações acima de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Da mesma forma, Supanchart et al. (137) também descreveu a manutenção da viabilidade de PBMCs estimuladas com 8  $\mu\text{M}$  ( $\sim 35,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do peptídeo LL-37.

Uma vez que os peptídeos não foram tóxicos para os macrófagos derivados de PBMCs humanos, os efeitos dos peptídeos na produção de NO foram verificados devido ao seu potencial de toxicidade e sua importância na modulação dos efeitos inflamatórios e, conseqüentemente, no processo de osteoclastogênese. O NO é um mediador pró-inflamatório essencial na diferenciação dos osteoclastos, onde em baixas concentrações promove diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos e em altas concentrações inibe o processo de osteoclastogênese (120). Esta inibição de diferenciação dos osteoclastos ocorre pois o NO pode inibir diretamente a atividade da NF- $\kappa$ B por S-nitrosilação da subunidade p50 (138). Dessa forma, nossos achados relacionados à produção de NO corroboram com o descrito na literatura, uma vez que os peptídeos IDR-1018 e LL-37, ambos em 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram capazes de aumentar a produção NO, mesmo em altas concentrações de D-glicose, podendo contribuir positivamente para a inibição do processo de diferenciação de osteoclastos.

Além da hiperglicemia prejudicada, sabe-se que os pacientes DM2 também possuem grandes buracos na rede óssea trabecular, diminuição do recrutamento de osteoblastos e aumento da osteoclastogênese (139). Este último ponto também foi observado neste estudo, uma vez que a presença de altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) na cultura de macrófagos derivados de PBMCs promoveu a diferenciação de osteoclastos, o que pode ser explicado pelo papel das AGEs. Sabe-se que o microambiente de alta glicose gera a produção de AGEs, o que, por sua vez, causa glicosilação não enzimática e se liga ao seu receptor (RAGE). Uma vez que os AGEs se ligam ao RAGE, a via de sinalização NF- $\kappa$ B é ativada, resultando em uma expressão de osteoclastogênese mediada por RANKL (140). Corroborando aos nossos achados, Wu et al. (141) relatou um aumento no número de osteoclastos em mandíbulas de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em sacarose, nos tempos experimentais de 7, 14 e 28 dias. Entretanto, em contraste, Xu et al. (142) relatou que a alta concentração de D-glicose (33,6 mM) inibiu a osteoclastogênese *in vitro* de monócitos isolados da medula óssea de camundongos C57BL/6J, a partir da verificação da diminuição da atividade da enzima TRAP.

Já em relação aos peptídeos, observou-se que o tratamento dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 à cultura de células estimuladas com altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) foram positivos para a inibição da osteoclastogênese *in vitro*. Este é o primeiro estudo que avalia o potencial anti-osteoclastogênese para o peptídeo IDR-1018. Além do IDR-1018, o peptídeo LL-37 também demonstrou o mesmo potencial de inibição da osteoclastogênese. Dados semelhantes foram descritos por Supanchart et al. (137) que demonstrou que o LL-37 inibe a formação de osteoclastos diminuindo a coloração de TRAP e F-actina de forma dose-dependente, sugerindo um bloqueio na expressão TRAP e fusão de osteoclastos. Além disso, o peptídeo LL-37 também é capaz de diferenciar monócitos de amostras de sangue em monócitos derivados de células formadoras de ossos e acelerar a reparação óssea (143).

Dessa forma, na tentativa de tentar compreender melhor os fatores que poderiam estar associados à redução da osteoclastogênese *in vitro* promovida pelos peptídeos, foram avaliadas a produção de algumas citocinas envolvidas nesse processo. As citocinas desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase óssea, e é bem estabelecido na literatura que as citocinas influenciam na formação e função dos osteoclastos (119,120). Citocinas pró-inflamatórias podem ter um papel na fragilidade óssea diabética, onde o aumento dos níveis de citocinas pode ativar a osteoclastogênese e suprimir a mineralização óssea (7). A citocina TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que estimula a reabsorção óssea induzindo a expressão RANK e RANKL, e conseqüentemente a proliferação de células precursoras de osteoclastos, além de atuar como citocina anti-apoptótica nos osteoclastos já desenvolvidos (121,122). Sob um estado de hiperglicemia crônica, há um aumento da expressão ROS e TNF- $\alpha$ , aumentando a expressão de esclerostina, proteína responsável pela inibição da formação óssea via inibição da via de sinalização Wnt- $\beta$ -catenina. A regulação dos níveis TNF- $\alpha$  e ROS pode ser uma estratégia para complicações ósseas em pacientes diabéticos (144). Nossos dados demonstraram que o peptídeo IDR-1018 diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  mesmo em PBMCs estimulados com RANKL, ou seja, em uma condição inflamatória. Da mesma forma, Wieczorek et al. (130) relatou que o peptídeo IDR-1018 diminuiu uma resposta pró-inflamatória de produção de TNF- $\alpha$  em PBMCs estimulados por LPS, assim como Freitas et al. (145) demonstrou que o peptídeo IDR-1018 diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos estimulados por

antígenos *heat killed* de *C. albicans* e IFN- $\gamma$ . A respeito do peptídeo LL-37, Yu et al. (146) relatou que ele poderia retornar aos níveis basais de TNF- $\alpha$  em condições inflamatórias e constatou que a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  também foi reduzida.

Assim como o TNF- $\alpha$ , o IL-6 também desempenha um papel importante no processo de osteoclastogênese. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua através do receptor de IL-6 (IL-6R), e sua inibição resulta em bloqueio da formação de osteoclastos (147). A IL-6 é um potente indutor de osteoclastogênese independente do RANKL e está centralmente envolvida na patogênese de perda óssea por inflamação crônica e aguda (120,148). Em pacientes idosos e diabéticos, a presença de hiperglicemia e AGEs ativam MAPKs, ERK 1/2, P38 e STAT3 sinalizando através do aumento da secreção IL-6 por osteócitos (144). Levando em conta os resultados obtidos aqui, os peptídeos IDR-1018 e o LL-37 foram capazes de diminuir a produção de IL-6 em condições de estímulo de sRANKL e 24 mM de D-glicose. Da mesma forma, Mayer et al. (149) também descreveu um efeito anti-inflamatório pelo peptídeo IDR-1018 com completa ausência da produção de IL-6 em PBMCs de fibrose cística estimulados com flagelina e LPS de *P. aeruginosa*. Mas, em contraste, os monócitos estimulados pelo peptídeo LL-37 aumentaram a produção de IL-6 e as MSCs estimuladas por LL-37, após 48h, liberaram um perfil com moléculas mais inflamatórias e entre elas, a IL-6 (143,150).

Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias também desempenham um papel no processo de osteoclastogênese e, portanto, a IL-10 foi selecionada para avaliação neste trabalho. A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória e um potente supressor de osteoclastogênese inibindo a expressão NFATc1 e sua translocação nuclear. Além disso, a IL-10 também promove o aumento de OPG e a diminuição de RANKL e M-CSF (120,151,152). Em nossos achados, o peptídeo LL-37 manteve a produção de IL-10 em nível basal e o peptídeo IDR-1018 promoveu um aumento de produção da IL-10 em macrófagos derivados de PBMCs estimulados por 12 mM de D-glicose e uma diminuição de IL-10 nos grupos estimulados com sRANKL e altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM). Uma possível explicação para a diminuição da produção de IL-10 em condições de estímulo por sRANKL e altas concentrações de D-glicose é a presença do estímulo de M-CSF na cultura celular, fator responsável por promover um fenótipo de macrófago do tipo M2 aprimorado e, conseqüentemente, não há aumento na produção de IL-10. No entanto, a resposta ainda é considerada benéfica, uma vez que esse tipo de macrófago promove a reparação e a remodelação

de tecidos e elimina as células apoptóticas (153). Por outro lado, Mayer et al. (149) descreveu que o peptídeo IDR-1018 poderia aumentar a produção de IL-10 em PBMCs derivadas de pacientes com fibrose cística estimuladas com LPS de *P. aeruginosa*. Este aumento da produção IL-10 deveu-se provavelmente ao fenótipo de macrófago do tipo M1 obtido devido ao estímulo utilizado. Em relação ao peptídeo LL-37, Lima et al. (154) relatou que a produção de IL-10 não foi afetada pela presença do tratamento do peptídeo LL-37 em cultura de células RAW 264.7 estimuladas por antígenos *heat killed* de *C. albicans* com e sem IFN- $\gamma$ , em concordância com os resultados obtidos neste estudo.

Dado os efeitos dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 em condições osteoclastogênicas, também foi avaliado o potencial de mineralização dos peptídeos em cultura de células semelhantes a osteoblastos (SaOs-2). SaOs-2 é uma linhagem de células derivadas de osteosarcoma amplamente utilizada como modelo osteoblástico para diferenciação de células ósseas (155,156). As células tumorais são conhecidas por sua alta taxa de proliferação, e as células proliferativas apresentam maior absorção de glicose (157). Da mesma forma que a glicose promove a proliferação celular, o peptídeo IDR-1018 também foi descrito como um indutor da proliferação celular (135). Outro fator que deve ser levado em conta é que o  $\beta$ -glicerofosfato, estímulo utilizado para o condicionamento osteogênico, é uma das formas possíveis de fosfato inorgânico ( $P_i$ ) e é comumente adicionado aos meios de cultura celular para estimular a proliferação *in vitro* e o processo de mineralização (158). Assim, a viabilidade celular foi menor nas culturas estimuladas com as altas concentrações de D-glicose (12 e 24 mM) e pelo peptídeo IDR-1018, provavelmente pelo aumento da proliferação celular provocado por esses estímulos.

Os principais pontos relacionados à fragilidade óssea em pacientes diabéticos são a glicosilação não enzimática do colágeno, a diminuição da remodelação óssea e o estado pró-inflamatório causado pela presença de hiperglicemia (7). Franke et al. (159) evidenciou que o acúmulo de AGEs na matriz óssea tem o potencial de suprimir propriedades osteogênicas e promover propriedades osteoclastogênicas dos osteoblastos *in vivo*. Desta forma, aqui investigamos o potencial dos peptídeos IDR-1018 e LL-37 sobre a quantidade de  $P_i$ , a atividade da enzima ALP e os depósitos de cálcio a partir da coloração de vermelho de alizarina no cultivo de células SaOs-2 em meio osteogênico, uma vez que esses componentes estão envolvidos na mineralização óssea (123).

Dessa forma, o início das análises relacionadas à mineralização se deu pela quantificação de fosfato. O  $P_i$  é um componente essencial para formação de hidroxiapatita na matriz extracelular óssea, e sua concentração intracelular livre (solúvel) é aproximadamente igual à concentração extracelular (160). Estudos demonstraram que  $P_i$  induz genes responsáveis pela proliferação celular, metabolismo energético e mineralização de células semelhantes ao osteoblasto (158). Strzelecka-Kiliszek et al. (161) reportou aumento da produção mineral em culturas estimuladas por meio em condições osteogênicas. Enquanto isso, nossos achados revelam que o peptídeo IDR-1018 manteve a quantificação do fosfato e o peptídeo LL-37 apresentou pequena redução.

Seguindo no processo de mineralização, a enzima ALP promove o aumento do  $P_i$  e facilita a mineralização, desempenhando também um papel essencial no processo de mineralização. A ALP é uma metaloenzima composta de várias isoenzimas e é um dos primeiros genes ativados no mecanismo de calcificação. A expressão de ALP e, conseqüentemente, a diferenciação de osteoblastos são regulados principalmente pelas vias BMP/Runx2/Osterix e pela cascata de sinalização Wnt, que se comunicam entre si (162). Para o processo de mineralização, a razão entre  $P_i$  e pirofosfato inorgânico ( $PP_i$ ) é fundamental, e o papel da ALP é hidrolisar o  $PP_i$ , que é um inibidor da formação de hidroxiapatita (163). A ALP é um marcador de mineralização e os resultados obtidos podem ser explicados pelo fenotipo osteoblástico maduro das células SaOs-2 (156), onde o peptídeo IDR-1018 apresentou um aumento da atividade da ALP.

Da mesma forma, Mao et al. (164) e Liu et al. (165) também descreveram o aumento da atividade da ALP em osteoblastos humanos estimulados com um composto isolado da *Uraria crinita* comestível e em células-tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas em meio osteogênico e estimuladas com wedelolactone, um composto isolado da *Herba Ecliptae*, respectivamente. Em relação ao peptídeo LL-37, nossos resultados não demonstraram qualquer alteração na atividade da ALP, ou seja, resultado similar ao obtido no grupo controle estimulado com meio osteogênico. No entanto, Cheng et al. (166) relatou que o peptídeo LL-37, em uma concentração de apenas  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , aumenta significativamente a atividade da ALP em células tronco originadas da papila apical, que são células essenciais para a formação de tecidos semelhantes à dentina/osso.

Por fim, os peptídeos IDR-1018 e LL-37 apresentaram efeitos positivos na formação de matriz mineralizada e, até o momento, não há dados disponíveis sobre o efeito do IDR-1018 no processo de mineralização óssea, sendo este então o primeiro trabalho a abordar os efeitos desse peptídeo voltado ao aspecto ósseo. Em relação às altas concentrações de D-glicose, a concentração de 12 mM de D-glicose promoveu uma formação de depósito de cálcio mais significativa pelas células SaOs-2 do que a concentração de 24 mM de D-glicose. Apesar disso, Pahwa et al. (167) descreveu que as concentrações de 11,1, 16,6 e 27,7 mM de glicose foram capazes de aumentar a diferenciação celular de osteoblastos, mas que apenas a concentração de 27,7 mM diminuiu a proliferação dos osteoblastos. Sobre diferentes concentrações testadas do peptídeo IDR-1018, quando foram testadas em associadas à glicose, apenas a concentração de 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do peptídeo aumentou os depósitos de cálcio. Nesse sentido, e também considerando a atividade da ALP, o ensaio de coloração de vermelho de alizarina também confirma a função osteogênica tanto do peptídeo IDR-1018, quanto do peptídeo LL-37. Dados semelhantes foram demonstrados por Cheng et al. (166) e Yu et al. (146) que relataram que as células do estroma da medula óssea tratadas com o peptídeo LL-37 tinham uma área maior de nódulos corados por vermelho de alizarina e que a expressão de ALP foi aumentada por células tratadas com LL-37, respectivamente.

Atualmente, os principais fármacos utilizados para a condição de fragilidade óssea são os da classe de bisfosfonatos, como o alendronato de sódio, e os anticorpos monoclonais romosozumab e denosumabe (28). Embora não existam estudos suficientes sobre a eficácia desses medicamentos em pacientes diabéticos, na ausência de terapia específica para esse grupo, esses fármacos acabam sendo utilizados para esse fim (168). Os bisfosfonatos são análogos sintéticos de pirofosfato inorgânico, inibindo a reabsorção óssea e aumentando a DMO. O romosozumabe, por outro lado, é um anticorpo anti-esclerostina, um dos principais inibidores da formação óssea, e o denosumabe é um anticorpo anti-RANKL (28,169). No entanto, o custo do tratamento (comparando o custo por mg) envolvendo esses dois medicamentos são muito caros. Utilizando uma cotação do dólar a R\$ 5, os bisfosfonatos são os mais acessíveis, custando R\$ 0,48/mg, em comparação aos anticorpos monoclonais, que podem ser até 222x mais caros, onde o romosozumab chega a custar R\$ 100/mg e o denosumabe R\$ 15,65/mg. O uso de HDPs como IDR-1018 e LL-37 nesta condição clínica, poderia reduzir o custo do tratamento em até 11x em comparação com

anticorpos monoclonais, custando R\$10/mg, apresentando-se como uma alternativa mais acessível.

Além do aspecto ósseo e também devido à descompensação glicêmica, a micro e macrovasculatura podem estar comprometidas, levando a consequências como por exemplo, a neuropatia diabética (170,171). Levando isso em conta, a ocorrência de traumas, acompanhados de neuropatia periférica, possui alto potencial de causar ferimentos crônicos (172). As feridas diabéticas crônicas compreendem feridas que na maioria das vezes não progridem após a fase inflamatória e não cicatrizam dentro de 12 semanas. Durante esse período, o processo de cura pode ser interrompido e paralisado em diferentes fases, possivelmente influenciado pela hiperglicemia crônica, inflamação, disfunção micro e macrovascular, hipóxia, neuropatia autônoma e sensorial (173). As feridas crônicas geralmente apresentam altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, infecções persistentes, biofilmes microbianos resistentes a medicamentos e células senescentes que não respondem aos estímulos de reparo (174,175).

O manejo de feridas diabéticas inclui o desbridamento tecidual para remover a epiderme hiperqueratinosa, o tecido dérmico necrosado, debris celulares estranhos e bactérias; controle de infecções; equilíbrio da umidade para oferecer proteção contra infecções secundárias, remover exsudatos de feridas e promover a regeneração tecidual; e as bordas das feridas devem estar livres de enfraquecimento, ou seja, aderidas ao leito, uma vez que a migração de células na cicatrização ocorre das bordas para o centro (9,175). Atualmente, os tratamentos disponíveis para feridas diabéticas envolvem composições tópicas de colágeno bovino e fibroblastos e queratinócitos vivos, substituto dérmico derivado de fibroblastos humanos criopreservados, PDGF, queratinócitos cultivados na rede de colágeno povoada por fibroblastos, fator de crescimento de fibroblasto básico bovino recombinante e fármaco de proteína tópica. A lista de ensaios clínicos envolve gel real, curativo impregnado de mel, terapia de ondas de choque extracorpórea, gel de plasma autólogo rico em plaquetas e terapia de ferida de pressão negativa (61). Dessa forma, para as abordagens de terapias futuras, o uso do peptídeo IDR-1018 combinado com fatores de crescimento recombinantes ou mesmo com plasma autólogo rico em plaquetas poderia potencializar a cicatrização de feridas em pacientes diabéticos.

Os HDPs são um grupo de moléculas conservadas e evolutivas que apresentam propriedades antimicrobianas e imunomodulatórias, e também atuam na

cicatrização de feridas (176–179). Em relação às feridas diabéticas, houve estudo envolvendo os peptídeos  $\beta$ -defensina-3 e MSI-78, no entanto, esses peptídeos falharam na fase 3 do estudo de ensaio clínico após não demonstrarem qualquer superioridade ao cuidado padrão da ferida com ofloxacina (180). Contudo, há descrição de testes com a combinação em formulação de biogel dos peptídeos antimicrobianos pexiganan e nisin para o controle de crescimentos planctônicos e de biofilmes de co-cultura de *S. aureus* e *P. aeruginosa* isoladas de pacientes diabéticos com úlceras nos membros inferiores. A combinação resultou em uma completa erradicação da cepa *S. aureus* no modelo de co-cultura, sugerindo assim um potencial de terapia complementar para o tratamento de úlceras diabéticas infectadas (181).

Nesse sentido, levando em consideração o aspecto cicatricial sem o aspecto infeccioso das feridas diabéticas, o peptídeo IDR-1018 é amplamente descrito com o potencial imunomodulatório e também é descrito como uma molécula com efeitos pró-angiogênicos e que promove a proliferação celular (135,136). Dessa forma, aqui foi avaliado brevemente o potencial regenerativo e migratório do peptídeo IDR-1018 em um ambiente com altas concentrações de glicose, como já descrito anteriormente. Primeiro, foi possível observar um aumento da viabilidade celular após 24h de exposição das células hFIB à altos níveis de D-glicose. A glicose é um carboidrato essencial para a manutenção da biologia celular e geração de energia metabólica. Esse nutriente participa de vias bioquímicas, sinalização intracelular e regulação de processos de osmolaridade, tornando-se um composto ligado a mudanças em diversas funções celulares, incluindo atividade proliferativa (182). Por outro lado, a glicose também pode interferir negativamente na taxa de migração, proliferação celular, apoptose e senescência celular devido à hiperglicemia temporária estabelecida por processos traumáticos, mas todos os efeitos podem ser dependentes do tipo de órgão/célula. Um estudo que utilizou fibroblastos gengivais humanos estimulados com altas concentrações de glicose (50 e 75 mM) por 72h demonstrou que a alta concentração de glicose provocou variação na morfologia celular, aumento no número e função de mitocôndrias e na taxa de apoptose (183,184). Nesse sentido, a alta concentração de glicose pode possuir um potencial citotóxico, mas não observamos esse efeito negativo quando avaliada a viabilidade celular, uma vez que estudos indicam que, em comparação com outros tipos celulares, os fibroblastos são mais resistentes a altos níveis de glicose (185). Da forma semelhante, um estudo demonstrou não haver diferença significativa na viabilidade das células MC3T3-E1

expostas a 15, 30 ou 50 mmol/L de glicose em comparação com o grupo controle sem glicose, também testado em 24h (186).

Em relação ao peptídeo IDR-1018, os resultados obtidos demonstraram que a maior concentração testada do peptídeo apresentou ligeira diminuição na viabilidade celular das células hFIB, em comparação a menor concentração testada do peptídeo. O que, no entanto, quando comparado ao grupo controle, não houve diferença. Uma redução de viabilidade celular semelhante pode ser observada em PBMCs estimuladas com uma maior concentração de peptídeo IDR-1018 ( $>50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (187). No entanto, em outro estudo, houve uma redução de apenas 22% na viabilidade celular de cultura de queratinócitos humanos (HaCat), quando expostos a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do peptídeo IDR-1018 e nenhuma alteração foi observada na viabilidade celular fibroblastos humanos, quando testadas concentrações de até  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (94). Contudo, quando o peptídeo IDR-1018 foi exposto ao ambiente de alta concentração de glicose, a viabilidade celular foi totalmente recuperada, evidenciando o potencial proliferativo tanto do peptídeo quanto da glicose (94).

Considerando os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, onde pode-se observar um aumento da atividade enzimática mitocondrial, a hipótese de aumento da proliferação celular pela presença do estímulo de glicose foi levantada. Assim, para avaliar essa hipótese, foi realizada uma análise de proliferação celular nos tempos de 0 a 120h, com intervalos de 24h entre uma análise e outra, para verificar o potencial migratório do peptídeo IDR-1018 em ambiente de alta concentração de glicose, no ensaio de migração. Embora relatos na literatura de que altas concentrações de glicose podem possuir potencial citotóxico para as células, a glicose é também uma excelente fonte de carbono, favorecendo a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (182). Assim como a glicose, o SBF também possui componentes como hormônios, vitaminas e fatores de crescimento que favorecem a proliferação e manutenção celular (188). Desta forma, o experimento de proliferação celular foi realizado para destacar o efeito natural do estímulo da glicose e a ausência de SBF na migração celular.

Processos rotineiros de cicatrização de feridas cutâneas envolvem proliferação e migração de fibroblastos, dentre outros processos (189). A migração celular é um processo crucial para angiogênese e re-epitelização de feridas, onde a ativação da migração celular envolve fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e angiogenina (190). O ensaio de migração demonstrou que o ambiente de altas concentrações de glicose (12 e 24 mM) estimulou a migração das células hFIB,

principalmente após 48h da promoção da ferida na monocamada celular, como esperado, e possivelmente devido ao efeito proliferativo da glicose. Em um estudo foi verificado que células de fibroblastos primários de prepúcio humano de neonatos estimuladas com 30 mM de glicose apresentaram proliferação celular. Entretanto, neste mesmo estudo foi observado que a migração de celular foi adiada devido à maior produção e efeito de ROS à sinalização JNK (189). Outros aspectos a serem considerados é que além de possivelmente inibir a migração celular, a alta concentração de glicose pode prejudicar a polaridade celular, inibir a maturação da adesão e desestabilizar a protrusão celular. Todas essas condições estão relacionadas à atividade da proteína Rac1 e ao aumento do estresse oxidativo (191).

Por outro lado, as células hFIB estimuladas apenas com o peptídeo IDR-1018 apresentam uma leve migração em todas as 3 concentrações testadas e resultados similares foram apresentados por Alencar-Silva et al. (135). O peptídeo IDR-1018 é descrito como um promotor de regeneração e cicatrização da pele com re-epitelização acelerada, além de promotor de migração celular de células como hFIB, melanócitos da linhagem MeWo e queratinócitos imortalizados da linhagem de células HaCat, mas os resultados mais pronunciados mostram que os queratinócitos têm uma melhor resposta ao estímulo do peptídeo IDR-1018 (94,135). Embora o peptídeo IDR-1018 possa promover a cicatrização de feridas em várias condições *in vitro* e *in vivo*, inclusive sob infecção, a reparação de feridas no dorso de camundongos diabéticos não teve eficácia e esse resultado pode estar relacionado à resposta imune provocada pelo DM, uma vez que o peptídeo IDR-1018 atua modulando respostas imunes, é provável que o sistema imune comprometido do modelo animal diabético bloqueie uma ou mais vias de sinalização pelas quais o peptídeo exerce seus efeitos (94,102,136).

Por fim, a partir dos resultados obtidos aqui e da literatura disponível, entende-se que o peptídeo IDR-1018 é um promissor potencial adjuvante em terapias relacionadas ao DM, podendo contribuir para os tratamentos relacionados à fragilidade óssea e feridas diabéticas.

## 7 CONCLUSÃO

Os peptídeos IDR-1018 e LL-37 são potenciais candidatos ao tratamento de fragilidade óssea diabética, pois demonstraram ter o potencial de inibir a osteoclastogênese *in vitro* e permitir a mineralização *in vitro*, com potencial de diferenciação de osteoblastos. Já em relação à cicatrização de feridas diabéticas, embora tenha relatos na literatura de que o peptídeo IDR-1018 possui potencial de cicatrização, essa característica foi diminuída quando testado em ambiente *in vitro* com altas concentrações de glicose. Para ambos os testes, tanto direcionados ao aspecto ósseo, quanto para feridas diabéticas, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para complementar os dados obtidos aqui.

## REFERÊNCIAS

1. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins Patologia estrutural e funcional. 6 ed. Guanabara Koogan; 2000. 1251.
2. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;6(6):850–67.
3. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
4. Smeltzer SC, Bare BG. Histórico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus. 9 ed. Guanabara Koogan; 2002.
5. Suddarth B. Tratado de enfermagem médico cirúrgica. Volume 1. 2011;548–98.
6. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ de. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46(1):16–26.
7. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz A v., Ferrari SL. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017.
8. Rodic T, Wölfel EM, Milovanovic P, Fiedler IAK, Cvetkovic D, Jähn K, et al. Bone quality analysis of jaw bones in individuals with type 2 diabetes mellitus—post mortem anatomical and microstructural evaluation. *Clinical Oral Investigations*. 2021;
9. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. Vol. 31, *Advances in Therapy*. Springer Healthcare; 2014. p. 817–36.
10. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WRP, Elliott M, Hilpert K, et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemistry and Biology*. 2010;17(9):970–80.
11. 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.
12. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. 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.
13. 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.
14. Daoud a K, Tayyar M a, Fouda IM, Harfeil NA. Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. *Journal of immunotoxicology*. 2009;6(1):36–41.
15. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ de. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46(1):16–26.
16. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: A data-driven cluster analysis of six variables. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2018;

17. Mendes AB, Fittipaldi JA, Neves RC, Chacra AR, Moreira Jr. ED. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brazil. *Acta Diabetol.* 2010;47(2):137–45.
18. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 9th ed. Brussels, Belgium: Available at: <https://www.diabetesatlas.org>; 2019.
19. Organização Mundial da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. OMS lança novo pacto global para acelerar ações de combate à diabetes. <https://www.paho.org/pt/noticias/15-4-2021-oms-lanca-novo-pacto-global-para-acelerar-acoes-combate-diabetes>. 2021.
20. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). Vol. 37, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2021.
21. Lima-Martínez MM, Carrera Boada C, Madera-Silva MD, Marín W, Contreras M. COVID-19 and diabetes: A bidirectional relationship. Vol. 33, *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2021.
22. Araújo LMB, Britto MM dos S, Porto da Cruz TR. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2000;44(6):509–18.
23. 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.
24. Pakkir Maideen NM, Manavalan G, Balasubramanian K. Drug interactions of meglitinide antidiabetics involving CYP enzymes and OATP1B1 transporter. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2018.
25. Petersons CJ. Second steps in managing type 2 diabetes. *Australian Prescriber*. 2018;
26. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, et al. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in Endocrinology*. 2017.
27. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido Ósseo: Aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev de Odonto da UNESP*. 2006;35(2):191–8.
28. Cipriani C, Colangelo L, Santori R, Renella M, Mastrantonio M, Minisola S, et al. The Interplay Between Bone and Glucose Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*. 2020.
29. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. Vol. 40, *Journal of Periodontal Research*. 2005. p. 287–93.
30. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research*. 2018;6(1):1–11.
31. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6(1):121–45.
32. Weitzmann MN, Ofotokun I. Physiological and pathophysiological bone turnover — role of the immune system. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016;12(9):518–32.
33. Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2016;22:95–106.
34. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine*. 2007;13(7):791–801.

35. Daoud a K, Tayyar M a, Fouda IM, Harfeil NA. Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. *Journal of immunotoxicology*. 2009;6(1):36–41.
36. William J. Boyle, W. Scott Simonet, David L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(May):337–42.
37. Nakamichi Y, Horibe K, Takahashi N, Udagawa N. Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology*. 2014;102(2):137–46.
38. Van'T Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology [Internet]*. 2001 Jul 1;103(3):255–61. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01261.x>
39. Young JD. *Methods in Nitric Oxide Research. Physiological Measurement*. 1997;18(1).
40. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993;364(6438).
41. van 'T Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(11).
42. Ralston SH, Ho L -P, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1995;10(7).
43. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(7).
44. Percival MD, Ouellet M, Campagnolo C, Claveau D, Li C. Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: Evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry*. 1999;38(41).
45. Guo Y, Xie C, Li X, Yang J, Yu T, Zhang R, et al. Succinate and its G-protein-coupled receptor stimulates osteoclastogenesis. *Nature Communications*. 2017;8(May):1–12.
46. Li J, Zeng Z, Zhao Y, Jing D, Tang C, Ding Y, et al. Effects of low-intensity pulsed electromagnetic fields on bone microarchitecture, mechanical strength and bone turnover in type 2 diabetic db/db mice. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–13.
47. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *American Journal of Pathology*. 1989;
48. Leoni G, Neumann P-A, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunology*. 2015;
49. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999;
50. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007;
51. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991.
52. Wener Sabina RG. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological reviews*. 2003;

53. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002.
54. Arnold F, West DC. Angiogenesis in Wound Healing. *Pharmac Ther*. 1991;
55. Richardson RJ. Parallels between vertebrate cardiac and cutaneous wound healing and regeneration. *npj Regenerative Medicine*. 2018;3(1):21.
56. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018;81(2):94–101.
57. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*. 2005.
58. Gabbiani G. GRANULATION TISSUE AS A CONTRACTILE ORGAN: A STUDY OF STRUCTURE AND FUNCTION. *Journal of Experimental Medicine*. 1972;
59. Karukonda SRK, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing - Part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. *International Journal of Dermatology*. 2000.
60. Kim BS, Pallua N, Bernhagen J, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. *Experimental and Molecular Medicine*. 2015;47(February).
61. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. Vol. 112, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019.
62. Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *Journal of Clinical Investigation*. 1981;
63. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting Antibiotic Resistance. Vol. 55, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2016. p. 6600–26.
64. 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.
65. 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(October):1–23.
66. Beaumont PE, Li HN, Davidson DJ. LL-37: An immunomodulatory antimicrobial host defence peptide. In: *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. 2013. p. 97–121.
67. Silva ON, Mulder KCL, Barbosa AEAD, Otero-Gonzalez AJ, Lopez-Abarrategui C, Rezende TMB, et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: From natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*. 2011.
68. Gupta S, Bhatia G, Sharma A, Saxena S. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2018;
69. Silva ON, Porto WF, Ribeiro SM, Batista I, Franco OL. Host-defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases. *Drug Discovery Today*. 2018.
70. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. Vol. 9, *Nature Chemical Biology*. 2013. p. 761–8.

71. Van Dijk A, Van Eldik M, Veldhuizen EJA, Tjeerdsma-Van Bokhoven HLM, De Zoete MR, Bikker FJ, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides. *PLoS ONE*. 2016;11(2).
72. van Harten R, van Woudenberg E, van Dijk A, Haagsman H. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines*. 2018;
73. Gupta K, Subramanian H, Ali H. Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS. *Innate Immunity*. 2016;22(1):21–30.
74. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Józwick A, Horbańczuk J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular biology reports*. 2012.
75. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Vol. 30, *Trends in Immunology*. 2009. p. 131–41.
76. Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, et al. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. Vol. 64, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016. p. 33–46.
77. Machado LR, Ottolini B. An evolutionary history of defensins: A role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
78. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Vol. 30, *Trends in Immunology*. 2009. p. 131–41.
79. van Dijk A, Hedegaard CJ, Haagsman HP, Heegaard PMH. The potential for immunoglobulins and host defense peptides (HDPs) to reduce the use of antibiotics in animal production. *Veterinary research*. 2018 Jul 31;49(1):68.
80. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial peptides in human sepsis. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
81. Machado LR, Ottolini B. An evolutionary history of defensins: A role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
82. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 2002;169(7):3883–91.
83. Beaumont PE, Li HN, Davidson DJ. LL-37: An immunomodulatory antimicrobial host defence peptide. In: *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. 2013. p. 97–121.
84. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;
85. Piktel E, Niemirowicz K, Wnorowska U, Wątek M, Wollny T, Głuszek K, et al. The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. Vol. 64, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016. p. 33–46.
86. Torres-Juarez F, Cardenas-Vargas A, Montoya-Rosales A, González-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.
87. 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).
88. Torres-Juarez F, Cardenas-Vargas A, Montoya-Rosales A, González-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.
89. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. The human cathelicidin LL-37 - A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2016;
  90. Gonzalez-Curiel I, Trujillo V, Montoya-Rosales A, Rincon K, Rivas-Calderon B, De Haro-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).
  91. Yin J, Yu FSX. LL-37 via EGFR transactivation to promote high glucose-attenuated epithelial wound healing in organ-cultured corneas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2010;51(4):1891–7.
  92. Supanchart C, Thawanaphong S, Makeudom A, Bolscher JG, Nazmi K, Kornak U, et al. The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *Journal of Dental Research*. 2012;91(11):1071–7.
  93. Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, et al. Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology*. 2013;
  94. 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).
  95. Madera L, Hancock REW. Anti-infective peptide IDR-1002 augments monocyte chemotaxis towards CCR5 chemokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;464(3):800–6.
  96. 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. *Nature Biotechnology*. 2007;25(4):465–72.
  97. 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.
  98. 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).
  99. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WRP, Elliott M, Hilpert K, et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemistry and Biology*. 2010;17(9):970–80.
  100. 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.
  101. 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).
  102. Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook M, González-Curiel I, León-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).
  103. García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human

- osteoblastic cells. *Bone* [Internet]. 2012;50(1):276–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.032>
104. 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;
  105. Murphy JB, Kies MW. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1960;
  106. Ulmer AJ, Scholz W, Ernst M, Brandt E, Flad HD. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. *Immunobiology* [Internet]. 1984;166(3):238–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6329947>
  107. Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, Zamurovic N, Gamse R. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med* [Internet]. 2004;2(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025786>
  108. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep* [Internet]. 2014;3(September):570. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228983>
  109. Bradley EW, Oursler MJ. Osteoclast culture and resorption assays. *Methods in Molecular Biology*. 2008;
  110. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983;65(1–2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
  111. 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. *Anal Biochem* [Internet]. 1982;126(1):131–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105>
  112. Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature* [Internet]. 1962;195:297. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13899683>
  113. Lima SMDF, Sousa MGDC, Freire MDS, Almeida JA de, Cantuária APDC, Silva TAME, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in Vitro. *Journal of Endodontics*. 2015;
  114. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* [Internet]. 1987;47(18):4961–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3040234>
  115. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* [Internet]. 2004;329(1):77–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136169>
  116. CellSeq. Fibroblastos derivados de Pele Humana.
  117. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;

118. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. Vol. 12, *Nature Reviews Endocrinology*. 2016. p. 566–92.
119. Lee SK, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2006;18(4):411–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763463>
120. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. Vol. 18, *Immune Network*. Korean Association of Immunologists; 2018.
121. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998 Jan;160(1):403–9.
122. Lacativa PGS, Farias MLF de. Osteoporosis and inflammation. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010 Mar;54(2):123–32.
123. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018 Dec;8(12).
124. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020 Sep;754:144855.
125. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* [Internet]. 2019 Nov 1;157. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
126. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2008 Jan;31 Suppl 1:S55-60.
127. Hein GE. Glycation endproducts in osteoporosis — Is there a pathophysiologic importance? *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2006;371(1):32–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106001653>
128. Heilmeyer U, Patsch JM. Diabetes and bone. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*. 2016;
129. Hygum K, Starup-Linde J, Langdahl BL. Diabetes and bone. Osteoporosis and sarcopenia [Internet]. 2019/05/15. 2019 Jun;5(2):29–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31346556>
130. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WRP, Elliott M, Hilpert K, et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemistry and Biology*. 2010;17(9):970–80.
131. 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* [Internet]. 2010;184(5):2539–50. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0901813>
132. Yang G, Huang T, Wang Y, Wang H, Li Y, Yu K, et al. Sustained Release of Antimicrobial Peptide from Self-Assembling Hydrogel Enhanced Osteogenesis. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2018;29(15).
133. REN L, ZHANG Z, DENG C, ZHANG N, LI D. Antibacterial and pro-osteogenic effects of  $\beta$ -Defensin-2-loaded mesoporous bioglass. *Dental Materials Journal*. 2021;40(2):464–71.
134. Cantuária APC, Figueiredo TM, Freire MS, Lima SMF, Almeida JA, Franco OL, et al. The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide

- and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells. *Cytokine* [Internet]. 2018;(November):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.008>
135. Alencar-Silva T, Zonari A, Foyt D, Gang M, Pogue R, Saldanha-Araujo F, et al. IDR-1018 induces cell proliferation, migration, and reparative gene expression in 2D culture and 3D human skin equivalents. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019 Nov 1;13(11):2018–30.
  136. Marin-Luevano P, Trujillo V, Rodriguez-Carlos A, González-Curiel I, Enciso-Moreno JA, Hancock REW, et al. Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment. *Peptides*. 2018 Mar 1;101:135–44.
  137. Supanchart C, Thawanaphong S, Makeudom A, Bolscher JG, Nazmi K, Kornak U, et al. The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *Journal of Dental Research*. 2012 Nov;91(11):1071–7.
  138. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. Vol. 4, *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2005.
  139. Pritchard JM, Giangregorio LM, Atkinson SA, Beattie KA, Inglis D, Ioannidis G, et al. Association of larger holes in the trabecular bone at the distal radius in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus compared to controls. *Arthritis Care & Research* [Internet]. 2012 Jan 1;64(1):83–91. Available from: <https://doi.org/10.1002/acr.20602>
  140. Rathinavelu S, Guidry-Elizondo C, Banu J. Molecular Modulation of Osteoblasts and Osteoclasts in Type 2 Diabetes. Vol. 2018, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2018.
  141. Wu X, Zhang Y, Xing Y, Zhao B, Zhou C, Wen Y, et al. High-fat and high-glucose microenvironment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019;14(1).
  142. Xu F, Ye Y, Dong Y, Guo F, Chen A, Huang S. Inhibitory effects of high glucose/insulin environment on osteoclast formation and resorption in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*. 2013;33(2):244–9.
  143. Yang B, Good D, Mosaiab T, Liu W, Ni G, Kaur J, et al. Significance of LL-37 on Immunomodulation and Disease Outcome. Vol. 2020, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2020.
  144. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen W-R, Qi J, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2020 Jul 21;21(14):5169. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32708317>
  145. Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, Cantuária APC, Júnior NGO, Santos TS, et al. An immunomodulatory peptide confers protection in an experimental candidemia murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(8).
  146. Yu X, Quan J, Long W, Chen H, Wang R, Guo J, et al. LL-37 inhibits LPS-induced inflammation and stimulates the osteogenic differentiation of BMSCs via P2X7 receptor and MAPK signaling pathway. *Experimental Cell Research*. 2018 Nov 15;372(2):178–87.
  147. Axmann R, Böhm C, Krönke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo.

- Arthritis & Rheumatism [Internet]. 2009 Sep 1;60(9):2747–56. Available from: <https://doi.org/10.1002/art.24781>
148. de Benedetti F, Rucci N, del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6–transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis & Rheumatism* [Internet]. 2006 Nov 1;54(11):3551–63. Available from: <https://doi.org/10.1002/art.22175>
  149. Mayer ML, Blohmke CJ, Falsafi R, Fjell CD, Madera L, Turvey SE, et al. Rescue of Dysfunctional Autophagy Attenuates Hyperinflammatory Responses from Cystic Fibrosis Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2013 Feb 1;190(3):1227. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/190/3/1227.abstract>
  150. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, et al. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2009/02/20. 2009 Mar 10;106(10):3806–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234121>
  151. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *European Journal of Oral Sciences* [Internet]. 2006 Feb 1;114(1):42–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00283.x>
  152. Evans KE, Fox SW. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC cell biology* [Internet]. 2007 Jan 19;8:4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239241>
  153. 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).
  154. Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, Cantuária APC, Dutra FRP, Magalhães BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, in vitro: An endodontic perspective. *Peptides*. 2017;95.
  155. Asai Y, Hirokawa Y, Niwa KI, Ogawa T. Osteoclast differentiation by human osteoblastic cell line SaOS-2 primed with bacterial lipid A. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2003 Aug 18;38(1):71–9.
  156. PAUTKE C, SCHIEKER M, TISCHER T, KOLK A, NETH P, MUTSCHLER W, et al. Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. *Anticancer Research* [Internet]. 2004 Nov 1;24(6):3743. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/24/6/3743.abstract>
  157. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecologic oncology* [Internet]. 2015/06/30. 2015 Sep;138(3):668–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26135947>
  158. Chande S, Bergwitz C. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* [Internet]. 2018;14(November). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0076-3>

159. Franke S, Ruster C, Pester J, Hofmann G, Oelzner P, Wolf G. Advanced glycation end products affect growth and function of osteoblasts. *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. 2011;29(4):650–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906430>
160. Herman H, Dallemagne MJ. The main mineral constituent of bone and teeth. *Archives of Oral Biology* [Internet]. 1961;5(2):137–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996961900073>
161. Strzelecka-Kiliszek A, Bozycki L, Mebarek S, Buchet R, Pikula S. Characteristics of minerals in vesicles produced by human osteoblasts hFOB 1.19 and osteosarcoma Saos-2 cells stimulated for mineralization. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017 Jun 1;171:100–7.
162. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology* [Internet]. 2016;12(4):203–21. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>
163. Bottini M, Mebarek S, Anderson KL, Strzelecka-Kiliszek A, Bozycki L, Simão AMS, et al. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [Internet]. 2018;1862(3):532–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416517303562>
164. Mao YW, Lin RD, Hung HC, Lee MH. Stimulation of osteogenic activity in human osteoblast cells by edible *Uraria crinita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(24):5581–8.
165. Liu YQ, Hong ZL, Zhan L bin, Chu HY, Zhang XZ, Li GH. Wedelolactone enhances osteoblastogenesis by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway but suppresses osteoclastogenesis by NF- $\kappa$ B/c-fos/NFATc1 pathway. *Scientific Reports* [Internet]. 2016;6(March):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32260>
166. Cheng Q, Zeng K, Kang Q, Qian W, Zhang W, Gan Q, et al. The Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes Migration and Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla through the Akt/Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway. *Journal of Endodontics*. 2020 Jul 1;46(7):964–72.
167. Pahwa H, Khan MT, Sharan K. Hyperglycemia impairs osteoblast cell migration and chemotaxis due to a decrease in mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020 Jun 1;469(1–2):109–18.
168. Yamamoto M, Sugimoto T. Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength. *Current osteoporosis reports*. 2016 Dec;14(6):320–6.
169. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2015.
170. Shen Y, Zhou J, Shi L, Nauman E, Katzmarzyk PT, Price-Haywood EG, et al. Association between visit-to-visit HbA1c variability and the risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* [Internet]. 2021 Jan 1;23(1):125–35. Available from: <https://doi.org/10.1111/dom.14201>
171. Zhao Y, Xiang P, Coll B, López JAG, Wong ND. Diabetes associated residual atherosclerotic cardiovascular risk in statin-treated patients with prior atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Diabetes and its Complications* [Internet]. 2021;35(3):107767. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872720305481>

172. Dinh TL, Veves A. A Review of the Mechanisms Implicated in the Pathogenesis of the Diabetic Foot. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* [Internet]. 2005 Sep 1;4(3):154–9. Available from: <https://doi.org/10.1177/1534734605280130>
173. Pradhan L, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert reviews in molecular medicine* [Internet]. 2009 Jan 13;11:e2–e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19138453>
174. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*. 2015;4(9).
175. Bowers S, Franco E. Chronic wounds: Evaluation and management. *American Family Physician*. 2020;101(3).
176. Mangoni ML, Mcdermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: Biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology*. 2016;25(3).
177. Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Reassessing the host defense peptide landscape. Vol. 7, *Frontiers in Chemistry*. 2019.
178. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019.
179. Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal*. 2009;2.
180. Ting DSJ, Beuerman RW, Dua HS, Lakshminarayanan R, Mohammed I. Strategies in Translating the Therapeutic Potentials of Host Defense Peptides. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. 2020.
181. Gomes D, Santos R, Soares RS, Reis S, Carvalho S, Rego P, et al. Pexiganan in combination with nisin to control polymicrobial diabetic foot infections. *Antibiotics*. 2020;9(3).
182. Zhu J, Thompson CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nature reviews Molecular cell biology* [Internet]. 2019 Jul;20(7):436–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30976106>
183. Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, Pawaputanon Na Mahasarakham C, Kido D, Takeda K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PloS one* [Internet]. 2018 Aug 9;13(8):e0201855–e0201855. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30092096>
184. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-Induced Replicative Senescence in Mesenchymal Stem Cells. *Rejuvenation Research* [Internet]. 2006 Mar 1;9(1):31–5. Available from: <https://doi.org/10.1089/rej.2006.9.31>
185. Kido D, Mizutani K, Takeda K, Mikami R, Matsuura T, Iwasaki K, et al. Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress. *PLoS ONE*. 2017;12(12).
186. Yang J, Ma C, Zhang M. High glucose inhibits osteogenic differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells by regulating P2X7. *Molecular medicine reports* [Internet]. 2019/10/31. 2019 Dec;20(6):5084–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31702818>
187. Haney EF, Wu B (Catherine), Lee K, Hilchie AL, Hancock REW. Aggregation and Its Influence on the Immunomodulatory Activity of Synthetic Innate Defense Regulator Peptides. *Cell Chemical Biology* [Internet]. 2017 Aug

- 17;24(8):969-980.e4. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.07.010>
188. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1).
  189. Xuan YH, Huang B bin, Tian HS, Chi LS, Duan YM, Wang X, et al. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PLoS ONE*. 2014;9(9).
  190. Lamalice L, le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. Vol. 100, *Circulation Research*. 2007.
  191. Lamers ML, Almeida MES, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS ONE*. 2011;6(8).

**ANEXO A – ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS IMUNOMODULADORES**

Figura 1 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95%.

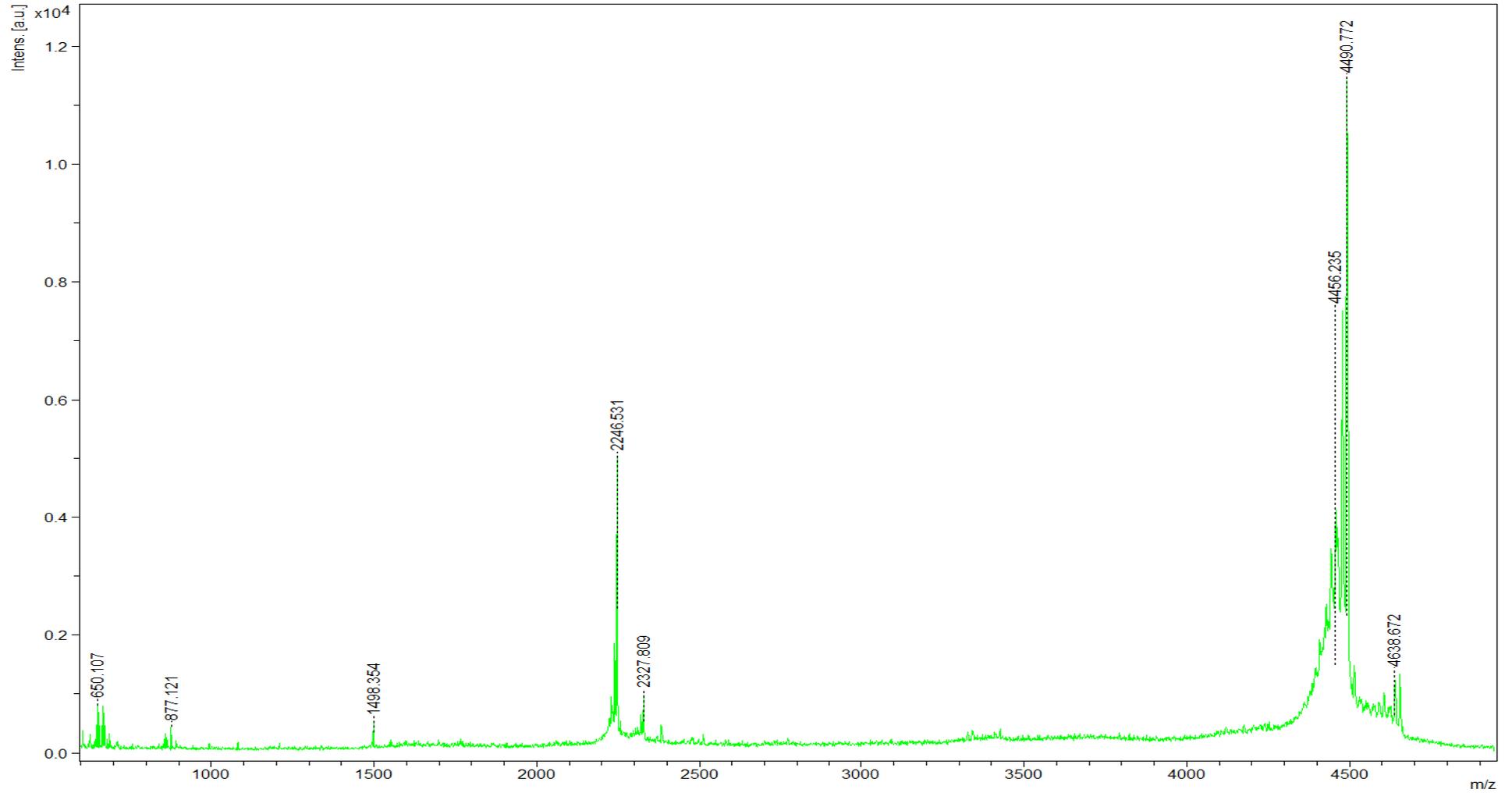
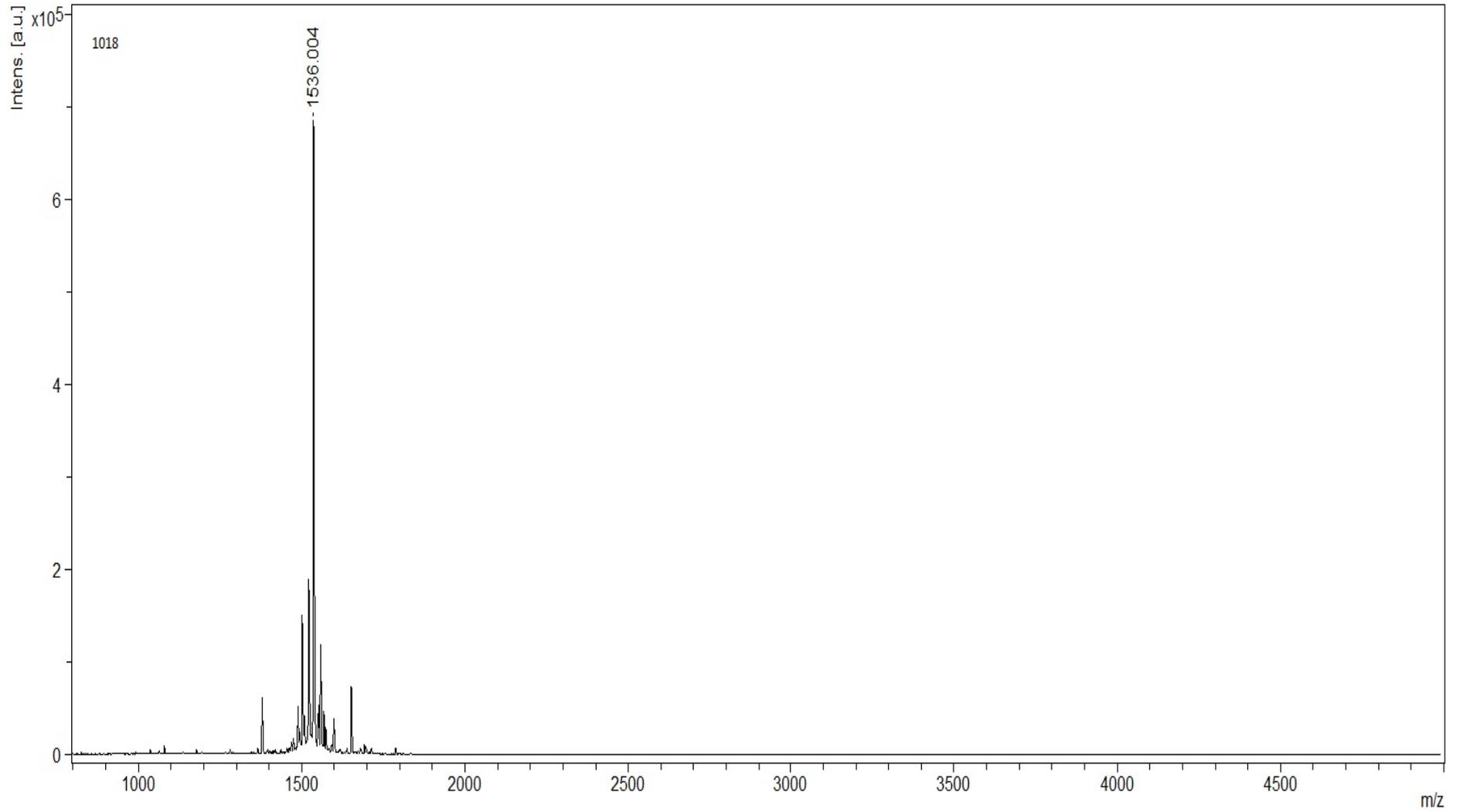


Figura 2 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%.



## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AÇÃO DOS PEPTÍDEOS IDR-1018 E LL-37 NO PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA IN VITRO

**Pesquisador:** Taia Maria Berto Rezende

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 72087317.1.0000.0029

**Instituição Proponente:** Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.209.375

## ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADO A TRABALHOS COMO PRIMEIRA AUTORA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

Artigo 1 - **Cantuária APC**, Figueiredo TM, Freire MS, Lima SMF, Almeida JA, Franco OL, et al. The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells. Cytokine [Internet]. 2018.

Cytokine 107 (2018) 18–25



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)



The effects of glucose concentrations associated with lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulus on mediators' production of RAW 264.7 cells



Ana Paula C. Cantuária<sup>a,b</sup>, Tarsila M. Figueiredo<sup>b,c</sup>, Mirna S. Freire<sup>b,d</sup>, Stella M.F. Lima<sup>b,e</sup>, Jeesser A. Almeida<sup>f,g</sup>, Octávio L. Franco<sup>b,h</sup>, Taia M.B. Rezende<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>c</sup> Curso de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>e</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>f</sup> Curso de Educação Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>h</sup> S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Diabetes mellitus  
Hyperglycemia  
RAW 264.7  
Immunology  
Cytokines  
ELISA

### ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder that results in the impairment of the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids. It can give rise to various complications, mainly caused by chronic exposure of cells to high glucose concentrations, including changes in the immune response processes. The aim of this study was to verify the chemokine and cytokines production profile in the presence of different glucose concentrations and infection/inflammatory stimuli. To this end, cell viability and the production of chemokines, cytokines and nitric oxide (NO) were analyzed in RAW 264.7 cell culture. Results demonstrated that there was no change in cell viability after 6, 24 and 72 h. Different stimuli were unable to modify the monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production. Groups stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and LPS and recombinant interferon (rIFN)- $\gamma$  down-regulated interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-10 and IL-12 and up-regulated IL-6 production. NO production maintained a pattern of increase, according to the increase in glucose concentrations, reaching its peak at 72 h. In summary, the results demonstrated that high glucose concentrations alone may be sufficient to alter the *in vitro* mediators' production of RAW 264.7 cells.

### 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is one of the most prevalent non-communicable chronic diseases and it is an important public health problem. It occurs when the pancreas does not produce enough insulin type 1 diabetes), or when the body cannot effectively use the produced insulin type 2 diabetes) [1,2]. Global reports indicate that an estimated 422 million adults were living with diabetes in 2014. In 2016, the World Health Organization (WHO) determined in Brazil the prevalence of more

than 16 million people living with diabetes [2,3].

Diabetes can cause various complications, caused by the adverse effects of chronic exposure of cells to high glucose concentrations, giving rise to the term "glucose toxicity" [4]. In normal conditions, the immune system reacts daily against invading microorganisms, maintaining homeostasis and it is essential for survival [5,6]. However, it is known that there is a change in both the innate and adaptive response in diabetic patients, due to the presence of systemic and chronic hyperglycemia [7,8].

**Abbreviations:** AGE, advanced glycation end-products;  $\alpha$ -MEM, minimum essential medium alpha medium; ANOVA, analysis of variance; DM, Diabetes Mellitus; DMSO, dimethylsulfoxide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ERK, extracellular signal regulated kinase; IL, interleukin; iNOS, nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharides; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MHC, major histocompatibility complex; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide); NF- $\kappa$ B, nuclear factor-Kappa B; NK, natural killer; NO, nitric oxide; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PWM, pokeweed mitogen; rIFN, recombinant interferon; ROS, reactive oxygen species; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TRIF, TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ; WHO, World Health Organization

\* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, SGAN 916N, Av. W5, Campus II, Modulo C, Room C-221, 70.790-160, Brasília-DF, Brazil.

E-mail addresses: [taiambr@gmail.com](mailto:taiambr@gmail.com), [taia@ucb.br](mailto:taia@ucb.br) (T.M.B. Rezende).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.008>

Received 10 July 2017; Received in revised form 10 November 2017; Accepted 10 November 2017

Available online 15 February 2018

1043-4666/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM PROCESSO DE SUBMISSÃO

Artigo 1 – Artigo submetido na revista *Peptide Science*

### Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

**Submitted to**

Peptide Science

**Manuscript ID**

PEP-2021-06-00026

**Title**

*In vitro* production of mediators from high D-glucose-stimulated and host defense peptides-treated RAW 264.7 cells

**Authors**

Cantuária, Ana Paula  
 Figueiredo, Tarsila  
 Freire, Mirna  
 Lima, Stella Maris  
 Amorim, Ingrid  
 Freitas, Camila  
 Almeida, Jeesser  
 Silva, Dieime  
 Morais, Paulo  
 Franco, Octavio  
 Rezende, Taia

**Date Submitted**

15-Jun-2021

***In vitro* production of mediators from high D-glucose-stimulated and host defense peptides-treated RAW 264.7 cells**

Ana Paula C. Cantuária <sup>a</sup>; Tarsila M. Figueiredo <sup>b, c</sup>; Mirna S. Freire <sup>d, e</sup>; Stella M. F. Lima <sup>b, e, f</sup>; Ingrid A. Amorim <sup>b, g</sup>; Camila G. Freitas <sup>b, h</sup>; Jeesser A. Almeida <sup>i</sup>; Dieime Custódia da Silva <sup>b, j</sup>; Paulo Cesar Morais <sup>b, j</sup>; Octávio L. Franco <sup>b, k</sup>; Taia M. B. Rezende <sup>a, b, f\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>c</sup> Curso de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>e</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário do Planalto Central [Apparecido dos Santos](#), UNICEPLAC, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>f</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>g</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário Euro-americano de Brasília, UNIEURO, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>h</sup> Instituto Federal de Brasília, IFB, Brasília, Distrito Federal, [Brazil](#).

<sup>i</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMGS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, [Brazil](#).

<sup>j</sup> Departamento de Física, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, [Brazil](#).

<sup>k</sup> S-Inova, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, [Brazil](#).

## Submission Confirmation



Thank you for your submission

**Submitted to**

ACS Applied Bio Materials

**Manuscript ID**

mt-2021-00689h

**Title**

Peptides IDR-1018 and LL-37 inhibit osteoclastogenesis and promote mineralization in an *in vitro* high glucose environment

**Authors**

Cantuária, Ana Paula  
Amorim, Ingrid  
Silva, Poliana Amanda  
Ferreira, Arthur  
Lima, Stella Maris  
Franco, Octávio  
Rezende, Taia

**Date Submitted**

15-Jun-2021

**Peptides IDR-1018 and LL-37 inhibit osteoclastogenesis and promote mineralization in an *in vitro* high glucose environment**

Ana Paula de Castro Cantuária <sup>a</sup>; Ingrid Aquino Amorim <sup>b, c</sup>; Poliana Amanda Oliveira Silva <sup>a</sup>; Arthur Corrêa Resende Ferreira <sup>b</sup>; Stella Maris de Freitas Lima <sup>b, d, e</sup>; Octávio Luiz Franco <sup>b, f</sup>; Taia Maria Berto Rezende <sup>a, b, d\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>c</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário Euro-americano de Brasília, UNIEURO, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>d</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>e</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, UNICEPLAC, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>f</sup> S-Inova, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Artigo 3 - Artigo a ser submetido na revista *Peptides*

### **The peptide IDR-1018 promotes cell migration in a high D-glucose environment**

Ana Paula de Castro Cantuária <sup>a</sup>; Arthur Corrêa Resende Ferreira <sup>b</sup>; Poliana Amanda Oliveira Silva <sup>a</sup>; Stella Maris de Freitas Lima <sup>b, c</sup>; Ingrid Aquino Amorim <sup>b</sup>; Robert E. W. Hancock <sup>d</sup>; Octávio Luiz Franco <sup>b, e</sup>;  
Taja Maria Berto Rezende <sup>a, b, c\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>c</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>d</sup> Center for Microbial Diseases and Immunity Research, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.

<sup>e</sup> S-Inova, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

## ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADO A TRABALHOS COMO COLABORADORA, DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

Artigo 1 - Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, **Cantuária APC**, Júnior NGO, Santos TS, et al. An immunomodulatory peptide confers protection in an experimental candidemia murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(8).



EXPERIMENTAL THERAPEUTICS



### An Immunomodulatory Peptide Confers Protection in an Experimental Candidemia Murine Model

Camila G. Freitas,<sup>a,c,d,e</sup> Stella M. F. Lima,<sup>a,d,e,f</sup> Mirna S. Freire,<sup>a,g,h</sup> Ana Paula C. Cantuária,<sup>a,g,i</sup> Nelson G. O. Júnior,<sup>a,g,j</sup> Tatiane S. Santos,<sup>a,k</sup> Jéssica S. Folha,<sup>a,k</sup> Suzana M. Ribeiro,<sup>a,l</sup> Simoni C. Dias,<sup>a,d,e</sup> Taia M. B. Rezende,<sup>a,d,e,f,g,i</sup> Patrícia Albuquerque,<sup>g</sup> André M. Nicola,<sup>o,g</sup> César de la Fuente-Núñez,<sup>m,n,o,p,q,r</sup> Robert E. W. Hancock,<sup>s</sup> Octávio L. Franco,<sup>a,b,d,e,g,h,i</sup> Maria Sueli S. Felipe<sup>a,b,d,e,g</sup>

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Brasília, Distrito Federal, Brazil<sup>a</sup>; S-Inova Biotech—Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil<sup>b</sup>; Instituto Federal de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil<sup>c</sup>; Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil<sup>d</sup>; Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil<sup>e</sup>; Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil<sup>f</sup>; Universidade de Brasília, Brasília, Brazil<sup>g</sup>; Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade—Rede Centro-oeste, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil<sup>h</sup>; Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil<sup>i</sup>; Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil<sup>j</sup>; Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil<sup>k</sup>; Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil<sup>l</sup>; Synthetic Biology Group, MIT Synthetic Biology Center, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>m</sup>; Research Laboratory of Electronics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>n</sup>; Department of Biological Engineering, and Department of Electrical Engineering and Computer Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>o</sup>; Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>p</sup>; Harvard Biophysics Program, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA<sup>q</sup>; The Center for Microbiome Informatics and Therapeutics, Cambridge, Massachusetts, USA<sup>r</sup>; Center for Microbial Diseases and Immunity Research, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada<sup>s</sup>

**ABSTRACT** Fungal *Candida* species are commensals present in the mammalian skin and mucous membranes. *Candida* spp. are capable of breaching the epithelial barrier of immunocompromised patients with neutrophil and cell-mediated immune dysfunctions and can also disseminate to multiple organs through the blood-stream. Here we examined the action of innate defense regulator 1018 (IDR-1018), a 12-amino-acid-residue peptide derived from bovine bactenecin (Bac2A); IDR-1018 showed weak antifungal and antibiofilm activity against a *Candida albicans* laboratory strain (ATCC 10231) and a clinical isolate (CI) (MICs of 32 and 64  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , respectively), while 8-fold lower concentrations led to dissolution of the fungal cells from preformed biofilms. IDR-1018 at 128  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  was not hemolytic when tested against murine red blood cells and also has not shown a cytotoxic effect on murine monocyte RAW 264.7 and primary murine macrophage cells at the tested concentrations. IDR-1018 modulated the cytokine profile during challenge of murine bone marrow-derived macrophages with heat-killed *C. albicans* (HKCA) antigens by increasing monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interleukin-10 (IL-10) levels, while suppressing tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12 levels. Mice treated with IDR-1018 at 10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  of body weight had an increased survival rate in the candidemia model compared with phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice, together with a diminished kidney fungal burden. Thus, IDR-1018 was able to protect against murine experimental candidemia and has the potential as an adjunctive therapy.

Received 25 November 2016 Returned for modification 29 January 2017 Accepted 21 May 2017

Accepted manuscript posted online 30 May 2017

**Citation** Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, Cantuária APC, Júnior NGO, Santos TS, Folha JS, Ribeiro SM, Dias SC, Rezende TMB, Albuquerque P, Nicola AM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW, Franco OL, Felipe MSS. 2017. An immunomodulatory peptide confers protection in an experimental candidemia murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02518-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02518-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Octávio L. Franco, [ocfranco@gmail.com](mailto:ocfranco@gmail.com).

Artigo 2 - Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, **Cantuária APC**, Dutra FRP, Magalhães BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, in vitro: An endodontic perspective. *Peptides*. 2017;95.

Peptides 95 (2017) 16–24



Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/peptides](http://www.elsevier.com/locate/peptides)



## Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, *in vitro*: An endodontic perspective



Stella Maris F. Lima<sup>a,b</sup>, Mirna S. Freire<sup>b,c</sup>, Ana Luisa O. Gomes<sup>a,b</sup>, Ana Paula C. Cantuária<sup>b,d</sup>, Flávia Rodrigues P. Dutra<sup>b</sup>, Beatriz S. Magalhães<sup>b,e</sup>, Maurício Gonçalves C. Sousa<sup>b</sup>, Ludovico Migliolo<sup>b,f</sup>, Jeesser A. Almeida<sup>g</sup>, Octávio L. Franco<sup>b,c,f</sup>, Taia Maria B. Rezende<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Campus I, QS 07 Lote 01 EPCT, 71966-700, Águas Claras, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus Avançado Asa Norte, SGAN 916 Módulo B Avenida W5, 70790-160, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>e</sup> Grupo de Engenharia Metabólica Aplicada a Bioprocessos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>f</sup> S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Av. Tamandaré, 6000, Jardim Semidário, 79117-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, Cidade Universitária, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Candida albicans*  
 Cytokines  
*Enterococcus faecalis*  
 Endodontics  
 Host defense peptide

### ABSTRACT

Endodontic treatment is mainly based on root canal disinfection and its failure may be motivated by microbial resistance. Endodontic therapy can be benefitted by host defense peptides (HDPs), which are multifunctional molecules that act against persistent infection and inflammation. This study aimed to evaluate the antimicrobial, cytotoxic and immunomodulatory activity of several HDPs, namely clavanin A, clavanin A modified (MO) and LL-37, compared to intracanal medication Ca(OH)<sub>2</sub>. HDPs and Ca(OH)<sub>2</sub> were evaluated by: (1) antimicrobial assays against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*, (2) cytotoxicity assays and (3) cytokine tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IL-12 and nitric oxide (NO) production by RAW 264.7 cells incubated with or without heat-killed (HK) *C. albicans* or *E. faecalis* combined or not with interferon- $\gamma$ . The minimum inhibitory concentration (MIC) was established only for *E. faecalis* (LL-37, 57  $\mu$ M). Considering cytotoxicity, clavanin MO was able to reduce cell viability in many groups and demonstrated lowest LC<sub>50</sub>. The Ca(OH)<sub>2</sub> up-regulated the production of MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-6 and down-regulated IL-1 $\alpha$ , IL-10 and NO. Clavanins up-regulated the TNF- $\alpha$  and NO and down-regulated IL-10 production. LL-37 demonstrated up-regulation of IL-6 and TNF- $\alpha$  production and down-regulation in IL-10 and NO production. In conclusion, LL-37 demonstrated better antibacterial potential. In addition, Ca(OH)<sub>2</sub> demonstrated a proinflammatory response, while the HDPs modulated the inflammatory response from non-interference with the active cytokines in the osteoclastogenesis process, probably promoting the health of periradicular tissues.

### 1. Introduction

Endodontic treatment or retreatment of teeth with apical periodontitis demands significant microbial reduction by biomechanical preparation of the root canal system [1]. Pulp and periradicular pathogenesis is unleashed by an infection process that triggers the inflammatory process. In this way, interferon (IFN)- $\gamma$  participates in macrophage activation in the periradicular area. Macrophage activity is

linked to microbicidal functions, cytokine secretion, immune cell recruitment and microbe phagocytosis and/or release of toxic metabolites [2]. These cells presented an important role in the pulp and periradicular immune response among other pulp cells [3,4]. Since microorganisms perpetuate the infective process, macrophages and other cell types are involved in the release of IFN- $\gamma$  and other inflammatory mediators [3].

The success rate of endodontic treatment for teeth without apical

\* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916N, Av. W5, Campus II, Modulo C, Room C-221 Brasília-DF, Brazil.

E-mail addresses: [taiaibr@gmail.com](mailto:taiaibr@gmail.com), [taia@ucb.br](mailto:taia@ucb.br) (T.M.B. Rezende).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.005>

Received 1 March 2017; Received in revised form 6 July 2017; Accepted 7 July 2017

Available online 14 July 2017

0196-9781/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Artigo 3 - Dantas EMGL, Lima SMF, **Cantuária APC**, Amorim IA, Almeida JA, Cunha TF, et al. Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(9).

Received: 21 November 2017 | Revised: 16 January 2019 | Accepted: 22 January 2019  
DOI: 10.1002/jcp.28265



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Physiology*

## Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*

Elaine M. G. L. Dantas<sup>1,2,3</sup> | Stella M. F. Lima<sup>2,3</sup> | Ana Paula C. Cantuária<sup>1</sup> |  
Ingrid A. Amorim<sup>3</sup> | Jeaser A. Almeida<sup>4</sup> | Tássio F. Cunha<sup>2</sup> | Octávio L. Franco<sup>3,5,6</sup> |  
Taia M. B. Rezende<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>2</sup>Curso de Odontologia, Escola de Saúde, Universidade Católica de Brasília, Campus 1, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>3</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Escola de Saúde, Universidade Católica de Brasília, Campus Avançado Asa Norte, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>5</sup>Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Federal District, Brazil

<sup>6</sup>S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

### Correspondence

Taia M. B. Rezende, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Campus Avançado Asa Norte, SGAN 916N - Av. W5 - Campus II - Modulo C, room C-221, Brasília, Federal District, 70790-160 Brazil.  
Email: taiambr@gmail.com; taia@ucb.br

### Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 409196/2018-5; Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, Grant/Award Number: 0193.001702/2017; Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Grant/Award Number: 59/300.397/2015

### Abstract

This study aims to evaluate the in vitro antimicrobial and immunomodulatory activities and cytotoxicity of chlorhexidine (CHX) and synoeca-MP peptide alone or in combination against *Pseudomonas aeruginosa*. The antimicrobial property was evaluated by the determination of minimal inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, and planktonic bacteria and biofilm inhibition. Immunomodulatory activity was determined by enzyme-linked immunosorbent assay and nitric oxide production by the Griess reaction method. According to the results, synoeca-MP combined with CHX demonstrated antimicrobial effectiveness compared with its isolated use, in addition to immunomodulatory activity (upregulating MPC-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  and downregulating nitric oxide and interleukin-10). In this context, it is expected that the substances, together, could be capable of controlling bacterial infection and dissemination, besides potentiating macrophages' immune response against the studied microorganism. Moreover, reducing the CHX concentration by the addition of synoeca-MP peptide may, in a beneficial way, minimize the undesirable effects of both, CHX and synoeca-MP in a clinical setting.

### KEYWORDS

antimicrobial peptide, biofilms, chlorhexidine, *Pseudomonas aeruginosa*, synergism

## 1 | INTRODUCTION

Healthy individuals possess an oral microbiota that can suffer alterations by several factors such as the imbalance of the periodontal immunoinflammatory and presence of periodontopathogenic bacteria (Meyle & Chapple, 2015). Periodontitis is a common infectious disease of the oral cavity developed by the presence and formation of dental-bacterial

biofilm resulting in the destruction of the tooth-supporting tissues and tooth loss (Gokhale & Padhye, 2013). Indeed, the development of periodontal diseases can also contribute to the appearance and colonization of oral tissues by opportunistic microbial species (Meyle & Chapple, 2015). Conceivably, periodontal diseases represent a risk factor for systemic diseases, because they present great bacterial diversity and periodontopathogenic deposits (Scannapieco, 1998). This instance can

Artigo 4 - Nogueira ME, Sousa Neto IV, Motta-Santos D, Cantuária APDC, Lima SMDF, Rezende TMB, et al. High-protein diet associated with resistance training reduces cardiac TNF- $\alpha$  levels and up-regulates MMP-2 activity in rats. Archives of Physiology and Biochemistry. 2020.

ARCHIVES OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY  
https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1787456



ORIGINAL ARTICLE



## High-protein diet associated with resistance training reduces cardiac TNF- $\alpha$ levels and up-regulates MMP-2 activity in rats

Murilo Esteves Nogueira<sup>a</sup>, Ivo Vieira Sousa Neto<sup>b</sup>, Daisy Motta-Santos<sup>c</sup>, Ana Paula de Castro Cantuária<sup>d,e</sup>, Stella Maris de Freitas Lima<sup>d,f</sup>, Taia Maria Berto Rezende<sup>d,e,f</sup>, Hugo Alexandre de Paula Santana<sup>g</sup>, Bernardo Assis Petriz<sup>d,h,j</sup>, Rita de Cássia Marqueti<sup>b,i</sup> and Jeesser Alves Almeida<sup>a,g</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil; <sup>b</sup>Graduate Program of Sciences and Technology of Health, University of Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>c</sup>Sports Science Postgraduate Program, Sports Department, EEEFTO, UFMG, Belo Horizonte, Brazil; <sup>d</sup>Graduate Program in Genomics Science and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil; <sup>e</sup>Post graduation of Health Sciences, University of Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>f</sup>Dental course, Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil; <sup>g</sup>Research in Exercise and Nutrition in Health and Sports Performance - PENSARE, Graduate Program in Movement Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil; <sup>h</sup>Laboratory of Molecular Exercise Physiology, University Center - UDF, Brasília, Brazil; <sup>i</sup>Graduate Program of Rehabilitation Sciences, University of Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>j</sup>Graduate Program in Health Promotion, University of Franca - UNIFRAN, Franca, Brazil

### ABSTRACT

The consumption of high-protein diets (HPD) is associated with resistance training (RT) due to effects on metabolism. However, little is known about these effects on cardiac tissue. This study aimed to investigate effects of HPD and RT on cardiac biomarkers. 18 rats were divided into normo-protein (NPD), and HPD groups: NPD-Control, NPD-RT, HPD-Control, and HPD-RT. Interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), nitric oxide (NO), activity of metalloproteinase-2 (MMP-2), and vascular factor (VEGF) were analysed. RT was effective in regulating body weight, increasing strength, and reducing food consumption ( $p < .05$ ). HPD induces higher levels of interleukin 6 ( $p = .0169$ ), and lowers NO ( $p < .0001$ ). When associated with RT, the HPD decreases levels of tumour necrosis factor alpha, while enhances NO, and MMP activity ( $p < .05$ ). The association of RT with HDP decreases inflammatory parameters and indicates an enhancement in the molecular parameters of cardiac tissue.

### ARTICLE HISTORY

Received 6 April 2020  
Accepted 19 June 2020  
Published online 3 July 2020

### KEYWORDS

Protein source;  
resistance training;  
inflammation; exercise

### Introduction

In the past decades, the consumption of high-protein diets (HPD) has become widely popular. Based on the precipitous extrapolation of results obtained from studies with active individuals, and driven by the food industry, protein-rich diets were associated with a healthy lifestyle (Foster *et al.* 2003; Mötteli *et al.* 2016; Samal and Samal 2018; Shai *et al.* 2008). Therefore, protein consumption is higher than recommended by Reference Daily Intake (RDI) for a considerable part of the population (Bauer *et al.* 2013; Deutz *et al.* 2014; Rand *et al.* 2003). Currently, the use of HPD integrates the main recommendations for body weight control, lean muscle increase, and strength levels (Busetto *et al.* 2011; Deutz *et al.* 2014; Westerterp-Plantenga *et al.* 2012). However, its impact on the cardiovascular system are still controversial (Mittendorfer *et al.* 2020).

Previously it was believed that the benefits of HPD on obesity could extend to the cardiovascular system (Gardner *et al.* 2007). Afterward, prospective studies reported an increase in cardiovascular risk associated with HPD (Bernstein *et al.* 2010; Lagiou *et al.* 2012; Virtanen *et al.* 2019). Additionally, Foo *et al.* (2009) and, more recently, Zhang

*et al.* (2020) confirmed the atherogenic effect of HPD in an animal model. However, the role of high-protein consumption in cardiac molecular outcomes is still unknown. To date, data upon the effects of HPD and resistance training (RT) on cardiac biomarkers are contrasting (Melo *et al.* 2018; Mittendorfer *et al.* 2020). On the other hand, RT reduces pro-inflammatory cytokines and modulates the activity of metalloproteinase (MMPs) in the left ventricle of rats (Alves *et al.* 2014; Barboza *et al.* 2016). Thus, MMP-2 stands out as an essential enzyme in the regulation of the extracellular matrix and play an essential role in cardiac tissue (Guzzoni *et al.* 2017; Leite *et al.* 2013). Besides, RT induces angiogenesis through the convergence of numerous signalling mechanisms, which includes the activity of MMP-2, nitric oxide and the vascular endothelial growth factor (VEGF), which signal for improved oxygenation cardiac, microvascular and metabolic integrity (Ghorbanzadeh *et al.* 2017; Milkiewicz *et al.* 2005).

Although mechanistic studies on cardiovascular responses to RT have increased in the past decade (Melo *et al.* 2018), the interaction of HPD with RT in the perspective of cardiac biomarkers is poorly understood, especially concerning the molecular mechanisms under these adaptations. Consequently, based on these existing gaps, the present

**CONTACT** Jeesser Alves Almeida jeesser.almeida@ufms.br Research in Exercise and Nutrition in Health and Sports Performance - PENSARE, Graduate Program in Movement Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Artigo 5 - Lima SMF, Freire MS, **Cantuária APC**, Martins DCM, Amorim IA, Dantas EMGL, et al. The use of host defense peptides in root canal therapy in rats. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25(6).

Clinical Oral Investigations  
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03684-9>

ORIGINAL ARTICLE



## The use of host defense peptides in root canal therapy in rats

Stella M. F. Lima<sup>1,2</sup> · Mirna S. Freire<sup>2,3,4</sup> · Ana Paula C. Cantuária<sup>2,5</sup> · Danilo C. M. Martins<sup>1,2,5</sup> · Ingrid A. Amorim<sup>2</sup> · Elaine M. G. L. Dantas<sup>1,2</sup> · Jade O. Farias<sup>1,2</sup> · Márcio B. Castro<sup>6</sup> · Jackson S. Silva<sup>7,8</sup> · Fernando A. Barriviera<sup>8</sup> · Maurício Barriviera<sup>8</sup> · Jeesser A. Almeida<sup>9</sup> · Isadora A. Uehara<sup>10</sup> · Marcelo J. B. Silva<sup>10</sup> · Ana Paula L. Oliveira<sup>11</sup> · Osmar N. Silva<sup>12</sup> · Robert E. W. Hancock<sup>13</sup> · Octávio L. Franco<sup>2,3,12</sup> · Taia M. B. Rezende<sup>1,2,5</sup> 

Received: 20 August 2019 / Accepted: 6 November 2020  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

**Objectives** In order to evaluate host defense peptides (HDPs) HHC-10 and synoeca-MP activity in in vitro osteoclastogenesis process and in vivo induced apical periodontitis, testing the effect of molecules in the inflammatory response and in apical periodontitis size/volume after root canal treatment.

**Materials and methods** In vitro osteoclastogenesis was assessed on bone marrow cell cultures extracted from mice, while in vivo endodontic treatment involved rats treated with Ca(OH)<sub>2</sub> or HDPs. In vitro osteoclasts were subjected to TRAP staining, and in vivo samples were evaluated by radiographic and tomographic exams, as well as histologic analysis.

**Results** None of the substances downregulated the in vitro osteoclastogenesis. Nevertheless, all treatments affected the average of apical periodontitis size in rats, although only teeth treated with HDPs demonstrated lower levels of the inflammatory process. These results demonstrated the in vivo potential of HDPs. Radiographic analysis suggested that HHC-10 and synoeca-MP-treated animals presented a similar lesion size than Ca(OH)<sub>2</sub>-treated animals after 7-day of endodontic treatment. However, tomography analysis demonstrated smaller lesion volume in synoeca-MP-treated animals than HHC-10 and Ca(OH)<sub>2</sub>-treated animals, after 7 days.

**Conclusions** These molecules demonstrated an auxiliary effect in endodontic treatment that might be related to its immunomodulatory ability, broad-spectrum antimicrobial activity, and possible induction of tissue repair at low concentrations. These results can encourage further investigations on the specific mechanisms of action in animal models to clarify the commercial applicability of these biomolecules for endodontic treatment.

**Clinical significance** HDPs have the potential to be adjuvant substances in endodontic therapy due to its potential to reduce inflammation in apical periodontitis.

**Keywords** Host defense peptides · Synoeca-MP · HHC-10 · Apical periodontitis · Antimicrobial peptide

✉ Taia M. B. Rezende  
 taiambr@gmail.com; taia@ucb.br

<sup>1</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N, Av. W5, Campus II, Módulo C, room C-221, Brasília, Distrito Federal 70790-160, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>4</sup> Curso de Odontologia, Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>6</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>7</sup> Curso de Odontologia, Centro Universitário do Distrito Federal, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>8</sup> Fenelon Radiologia, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>9</sup> Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>10</sup> Laboratório de Biomarcadores Tumorais e Osteoimunologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>11</sup> Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

<sup>12</sup> S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>13</sup> Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Artigo 6 - Sousa MGC, Xavier PD, Cantuária AP de C, Porcino RA, Almeida JA, Franco OL, et al. Host defense peptide IDR-1002 associated with ciprofloxacin as a new antimicrobial and immunomodulatory strategy for dental pulp revascularization therapy. *Microbial Pathogenesis*. 2021;152.

## ARTICLE IN PRESS

Microbial Pathogenesis xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)

## Host defense peptide IDR-1002 associated with ciprofloxacin as a new antimicrobial and immunomodulatory strategy for dental pulp revascularization therapy

Maurício Gonçalves C. Sousa<sup>a</sup>, Patrícia D. Xavier<sup>b</sup>, Ana Paula de C. Cantuária<sup>c</sup>,  
Rayssa A. Porcino<sup>d</sup>, Jeaser A. Almeida<sup>e</sup>, Octávio L. Franco<sup>a,d,f</sup>, Taia Maria B. Rezende<sup>a,c,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação Em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>b</sup> Curso de Farmácia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação Em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação Em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação Em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>f</sup> S-Inova Biotech, Pós-Graduação Em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>g</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Pulp revascularization  
Triple antibiotic paste  
Macrophages  
Fibroblasts  
Host defense peptides

## ABSTRACT

Regenerative therapies such as dental pulpal revascularization appear as an option for traumatized immature permanent teeth. However, the triple antibiotic paste - TAP (metronidazole, minocycline, and ciprofloxacin), used for these therapies, can generate cytotoxicity and dentin discoloration. In contrast, host defense peptides (HDPs) are promising antimicrobial and immunomodulatory biomolecules for dentistry. This study aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity (against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and the immunomodulatory potential (by the evaluation of IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  and NO, in RAW 264.7 macrophages and IL-6, TGF- $\beta$  and NO, in L929 fibroblast) of synthetic peptides (DJK-6, IDR-1018, and IDR-1002), compared to TAP in an *in vitro* infection model containing heat-killed antigens from *E. faecalis* and *S. aureus*. Furthermore, the synergistic potential of ciprofloxacin and IDR-1002 was evaluated by checkerboard. Ciprofloxacin was the best antimicrobial of TAP, besides acting in synergism with IDR-1002. TAP was pro-inflammatory ( $p < 0.05$ ), while the association of ciprofloxacin and IDR-1002 presented an anti-inflammatory profile mainly in the presence of both heat-killed antigens ( $p < 0.05$ ). Based on these results, ciprofloxacin associated with IDR-1002 may demonstrate an efficient antimicrobial and immunomodulatory action in this *in vitro* model. Further *in vivo* studies may determine the real potential of this combination.

## 1. Introduction

Dental trauma is a worldwide problem, mostly affecting children from 8 to 12 years old [1]. Most of this population has teeth forming, known as immature permanent teeth [1]. Once they are traumatized, this impact may cause major complications, such as dental pulp necrosis [2]. In the face of this, conventional endodontic treatment is not indicated in these cases. Immature permanent teeth have thin dentine walls and an open apex, which makes chemical-mechanical treatment and

root canal filling difficult [3]. On the other hand, regenerative therapies have been developed in endodontics in recent years for revascularization of the pulp tissue [4].

The pulp revascularization technique includes the root canal system access, irrigation, and subsequent use of an intracanal medication, aiming at the reduction of microbial load [5]. Thus, an aseptic environment may allow the formation of a blood clot, which may serve as a scaffold for the construction of the new pulp-like tissue [6,7]. However, one of the medications most used for this technique, known as triple

\* Corresponding author. Universidade Católica de Brasília - Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916N - Av. W5 - Campus II - Modulo C, room C-221, Brasília, DF, Brazil.  
E-mail address: [taiambr@gmail.com](mailto:taiambr@gmail.com) (T.M.B. Rezende).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104634>

Received 5 May 2020; Received in revised form 8 October 2020; Accepted 17 November 2020

Available online 23 November 2020

0882-4010/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo 7 - Amorim IA, de Freitas Lima SM, de Castro Cantuária AP, de Souza Freire M, de Almeida JA, Franco OL, et al. Host Defense Peptides Clavanins A and MO Reduce *in Vitro* Osteoclastogenesis. Brazilian Journal of Oral Sciences. 2021;20.



Volume 20  
2021  
e211512

Original Article

## Host defense peptides clavanins A and MO reduce *in vitro* osteoclastogenesis

Ingrid Aquino Amorim<sup>1,2</sup> , Stella Maris de Freitas Lima<sup>2,3</sup> , Ana Paula de Castro Cantuária<sup>1,2</sup> , Mirna de Souza Freire<sup>2,4</sup>, Jeesser Alves de Almeida<sup>5</sup> , Octávio Luiz Franco<sup>2,6</sup> , Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>2</sup> Proteomic and biochemical analysis center, Postgraduate Program in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>3</sup> Dentistry Course, Catholic University of Brasília, Brasília, Federal District, Brazil.

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Biotechnology and Biodiversity, Brasília University, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

<sup>5</sup> Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region. Faculty of Medicine. Federal University of Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Brazil.

<sup>6</sup> S-Inova Biotech, Graduate Program in Biotechnology, Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

### Corresponding author:

Name: Taia Maria Berto Rezende  
Full postal address:  
Universidade Católica de Brasília  
Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia  
SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Módulo C, room C-221  
Brasília-DF, Brazil  
Fone: + 55-61-98134-9001  
Fax: + 55-61-3347-4797  
e-mail: taiaibr@gmail.com  
Secondary e-mail: taia@ucb.br

Received: October 06, 2020

Accepted: January 21, 2021



**Aim:** Several systemic diseases, such as periodontitis and apical periodontitis, can cause extensive bone resorption. Host defense peptides may have the potential for the development of novel therapies for the bone resorption process. This study evaluated the potential of host defense peptides clavanins A, MO, and LL-37 in *in vitro* osteoclastogenesis. **Methods:** RAW 264.7 cultures were stimulated with recombinant of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in the presence of different tested concentrations of host defense peptides, besides calcium hydroxide and doxycycline. Cellular viability, nitric oxide production, and a number of differentiated osteoclast-like cells were also evaluated. **Results:** Results showed that none of the substances were cytotoxic, except for 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of doxycycline after 3 days. Host defense peptides, calcium hydroxide, and doxycycline did not interfere in nitric oxide production or downregulated it. An exception was observed in the presence of 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of doxycycline, in which nitric oxide production was up-regulated. All host defense peptides were capable of reducing osteoclast-like cell differentiation. **Conclusion:** Host defense peptides clavanins A and MO demonstrated to be potential suppressors of osteoclastogenesis *in vitro* without interfering in cellular viability and nitric oxide production. These promising results need to be further analyzed in *in vivo* models of bone resorption.

**Keywords:** Bone resorption. Antimicrobial cationic peptides. Nitric oxide. Osteogenesis.

Artigo 8 - Medeiros CS, de Sousa Neto IV, Silva KKS, **Cantuária APC**, Rezende TMB, Franco OL, de Cassia Marqueti R, Freitas-Lima LC, Araujo RC, Yildirim A, Mackenzie R, Alves Almeida J. The Effects of High-Protein Diet and Resistance Training on Glucose Control and Inflammatory Profile of Visceral Adipose Tissue in Rats. *Nutrients*. 2021; 13(6):1969.



*nutrients*



Article

## The Effects of High-Protein Diet and Resistance Training on Glucose Control and Inflammatory Profile of Visceral Adipose Tissue in Rats

Claudia Stela Medeiros <sup>1</sup>, Ivo Vieira de Sousa Neto <sup>2</sup>, Keemilyn Karla Santos Silva <sup>3</sup>, Ana Paula Castro Cantuária <sup>4,5</sup>, Taia Maria Berto Rezende <sup>4,5</sup>, Octávio Luiz Franco <sup>4,6</sup>, Rita de Cassia Marqueti <sup>2</sup>, Leandro Ceotto Freitas-Lima <sup>7</sup>, Ronaldo Carvalho Araujo <sup>7</sup>, Azize Yildirim <sup>8</sup>, Richard Mackenzie <sup>8</sup> and Jeesser Alves Almeida <sup>1,3,\*</sup>



**Citation:** Medeiros, C.S.; de Sousa Neto, I.V.; Silva, K.K.S.; Cantuária, A.P.C.; Rezende, T.M.B.; Franco, O.L.; de Cassia Marqueti, R.; Freitas-Lima, L.C.; Araujo, R.C.; Yildirim, A.; et al. The Effects of High-Protein Diet and Resistance Training on Glucose Control and Inflammatory Profile of Visceral Adipose Tissue in Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 1969. <https://doi.org/10.3390/nu13061969>

Academic Editors: Roberta Ceci and Guglielmo Duranti

Received: 23 April 2021

Accepted: 25 May 2021

Published: 8 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; claudiastela2@gmail.com
- <sup>2</sup> Laboratório de Análises Moleculares, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal 72220-275, Brazil; ivoneto04@hotmail.com (I.V.d.S.N.); marqueti@gmail.com (R.d.C.M.)
- <sup>3</sup> Research in Exercise and Nutrition in Health and Sports Performance—PENSARE, Graduate Program in Movement Sciences, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; keemilyn.karla@gmail.com
- <sup>4</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Distrito Federal 70790-160, Brazil; apcantuaria@gmail.com (A.P.C.C.); taiambr@gmail.com (T.M.B.R.); ocf Franco@gmail.com (O.L.F.)
- <sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal 70910-900, Brazil
- <sup>6</sup> S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande 79117-900, Brazil
- <sup>7</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04039-032, Brazil; lcf.lima@gmail.com (L.C.F.-L.); araujo.ronaldo@unifesp.br (R.C.A.)
- <sup>8</sup> Department of Life Science, Whitelands College, University of Roehampton, London SW15 4DJ, UK; yildiria@roehampton.ac.uk (A.Y.); richard.mackenzie@roehampton.ac.uk (R.M.)
- \* Correspondence: jeesser.almeida@ufms.br

**Abstract:** High-protein diets (HPDs) are widely accepted as a way to stimulate muscle protein synthesis when combined with resistance training (RT). However, the effects of HPDs on adipose tissue plasticity and local inflammation are yet to be determined. This study investigated the impact of HPDs on glucose control, adipocyte size, and epididymal adipose inflammatory biomarkers in resistance-trained rats. Eighteen Wistar rats were randomly assigned to four groups: normal-protein (NPD; 17% protein total dietary intake) and HPD (26.1% protein) without RT and NPD and HPD with RT. Trained groups received RT for 12 weeks with weights secured to their tails. Glucose and insulin tolerance tests, adipocyte size, and an array of cytokines were determined. While HPD without RT induced glucose intolerance, enlarged adipocytes, and increased TNF- $\alpha$ , MCP-1, and IL1- $\beta$  levels in epididymal adipose tissue ( $p < 0.05$ ), RT diminished these deleterious effects, with the HPD + RT group displaying improved blood glucose control without inflammatory cytokine increases in epididymal adipose tissue ( $p < 0.05$ ). Furthermore, RT increased glutathione expression independent of diet ( $p < 0.05$ ). RT may offer protection against adipocyte hypertrophy, pro-inflammatory states, and glucose intolerance during HPDs. The results highlight the potential protective effects of RT to mitigate the maladaptive effects of HPDs.

**Keywords:** dietary management; exercise training; metabolism; adipokines

### 1. Introduction

High-protein diets (HPD) have been increasingly popular in society owing to their association with enhanced satiety and energy expenditure, and thus they are used as

Artigo 9 - Sousa MGC, Xavier PD, **Cantuária APC**, Amorim IA, Almeida JA, Franco OL, et al. Antimicrobial and immunomodulatory *in vitro* profile of double antibiotic paste. International Endodontic Journal [Internet]. 2021 May 25;n/a(n/a).

---

**INTERNATIONAL ENDODONTIC JOURNAL**  
The official journal of the British Endodontic Society and the  
European Society of Endodontology

ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLE

## **Antimicrobial and immunomodulatory *in vitro* profile of double antibiotic paste**

MGC Sousa, PD Xavier, APC Cantuária, IA Amorim, JA Almeida, OL Franco, TMB Rezende ✉

First published: 25 May 2021 | <https://doi.org/10.1111/iej.13576>