

AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO PEPTÍDEO IDR-1018 COMO MODULADOR NA PRODUÇÃO DE TNF- α E IL-6, EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE

Tarsila M. Figueiredo^{1,2*}, Ana Paula C. Cantuária^{1,3}, Mirna S. Freire¹, Stella M. F. Lima^{1,5}, Jeaser A. Almeida⁴, Octávio L. Franco¹, Taia M. B. Rezende/ Orientadora^{1,3,5}

1. Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, UCB
2. Curso de Odontologia, Universidade de Brasília, UnB
3. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB
4. Curso de Educação Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS
5. Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, UCB

Resumo:

O diabetes mellitus, associado a infecções, promove o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo gerar dano celular. O peptídeo sintético IDR-1018 pode modular seletivamente essa produção, inclusive na presença de interferon (IFN)- γ . Este estudo *in vitro* analisou a menor concentração do peptídeo IDR-1018 capaz de modular a produção do fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-6, em culturas de monócitos RAW 264.7, estimuladas com D-glicose (5,5, 8, 12 e 24 mM), na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS) (3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e recombinante (r)IFN- γ (10U/poço), após 24h. O peptídeo foi testado nas concentrações de 4, 8, 16, 32, 64 e 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a avaliação da viabilidade celular, foi realizado o ensaio de MTT e a produção de citocinas foi verificada por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Os resultados confirmam um potencial imunomodulador do IDR-1018, em que a concentração de 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi a mais adequada para o cenário proposto.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; peptídeos de defesa do hospedeiro; citocinas.

Apoio financeiro: CNPq (concessão nº. 470477/2012-1), CAPES e FAPDF.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UnB

Introdução:

O diabetes mellitus (DM) consiste em uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina, resistência periférica dos tecidos à mesma, ou até mesmo de ambos. Consequentemente, há o uso inadequado de carboidratos para a obtenção de glicose,

gerando uma hiperglicemia sistêmica e crônica (1).

A hiperglicemia crônica pode causar impactos sobre o sistema imune, promovendo inibição do sistema complemento, diminuição da opsonização, da atividade bactericida e quimiotática de leucócitos, da atividade das células polimorfonucleares e menor resposta ao estímulo de citocinas (2). Contudo, em associação a infecções, por exemplo, na presença de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, pode ocorrer uma exacerbação na produção de citocinas pró-inflamatórias (3, 4). Dessa forma, os quadros de hiperglicemia crônica podem levar à lesão de células e tecidos, resultando em complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética, aterosclerose e microangiopatia. Além disso, devido à má circulação sanguínea, a recuperação de lesões teciduais se torna lenta (5).

Assim sendo, o peptídeo regulador da defesa inata (IDR)-1018 é derivado do peptídeo bactericida e é uma versão sintética de peptídeos de defesa do hospedeiro naturais (HDP, do inglês *host defense peptide*). O peptídeo IDR-1018 age sem comprometer as células imunes necessárias para a efetiva resolução de infecções. Já quanto à capacidade imunomoduladora, os IDRs têm sido descritos como capazes de promover quimiotaxia, estimular a produção de quimiocinas e citocinas, regular a função e a diferenciação de células imunes, como macrófagos e células dendríticas, além de induzir a angiogênese e a cicatrização de feridas (6). Além disso, também já foi descrito como sendo capaz de reduzir, seletivamente, a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina (IL)-6, inclusive na presença do

recombinante interferon (γ IFN-r) (7).

Desse modo, este estudo visou analisar *in vitro* a menor concentração do peptídeo IDR-1018 capaz de modular a produção das citocinas TNF- α e IL-6 em cultura de células RAW 264.7, na presença de diferentes concentrações de D-glicose, estimulados ou não com LPS e/ou γ IFN-r.

Metodologia:

A cultura de monócitos RAW 264.7 foi mantida em estufa contendo 5% de CO₂, a 37 °C e 95% de umidade e submetidas a diversos estímulos por um período de 24 horas, tais como: D-glicose (5,5 mM, 8 mM, 12 mM e 24 mM; Sigma-Aldrich, EUA), LPS de *Escherichia coli* 0111: B4 (3 μ g.mL⁻¹; Sigma-Aldrich, EUA), IFN- γ (10U por poço; Peprotech, EUA) e peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128 μ g.mL⁻¹).

A viabilidade celular foi analisada após 24h de incubação das placas de 96 poços, por meio do ensaio colorimétrico de MTT (Sigma-Aldrich, EUA), o qual avalia a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial. Assim, as células vivas reduzem o reagente de MTT a sal de formazan (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (8). A leitura de absorbância foi realizada a um comprimento de onda de 595 nm. 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 de Tris pH 7,4, 1 mM de EDTA e 0,1% de Triton X-100) (9).

A produção das citocinas TNF- α e IL-6 foi verificada a partir do sobrenadante das culturas incubadas, após 24h (10). As produções dessas citocinas foram determinadas pelo método de *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA), utilizando os respectivos *murine ELISA development kit* (Peprotech, EUA) de cada citocina, de acordo com as instruções do fabricante (6).

Todos os experimentos foram realizados em réplicas técnicas e biológicas. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e posterior análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) foi utilizada, seguida do pós-teste de Bonferroni. A análise estatística foi realizada no *software GraphPadPrism 5* (Instat Califórnia, EUA), considerando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão:

As células RAW mantiveram sua viabilidade celular após 24h de incubação, mesmo quando as culturas foram estimuladas com diferentes concentrações de D-glicose, LPS e γ IFN-r.

A produção de TNF- α não se alterou na presença do estímulo infeccioso, mantendo o nível de produção basal. Na presença de LPS e γ IFN-r, estabeleceu-se uma condição imunológica/ inflamatória. Nesse contexto, notou-se produção elevada de IL-6 em todos os grupos estimulados, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$). Em relação à produção de TNF- α , houve um ligeiro aumento de forma semelhante em todos os grupos, em comparação com o grupo controle, e apenas o grupo contendo 24 mM de D-glicose demonstrou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Nos grupos contendo o peptídeo IDR-1018, a produção de TNF- α foi diminuída pelo peptídeo em grande parte dos grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 1).

Quanto a produção de IL-6 na presença de LPS, pode-se observar que nos grupos estimulados com 12 mM e 24mM de D-glicose, houve um aumento na produção da citocina em relação ao grupo controle e aos grupos estimulados com 5,5 e 8 mM de D-glicose ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$). A presença do peptídeo IDR-1018 promoveu uma elevação na produção de IL-6, nas concentrações de 64 e 128 μ g.mL⁻¹, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 2).

Conclusões:

A hiperglicemia crônica presente no DM pode afetar diversos aspectos do sistema imune e, principalmente, componentes da imunidade inata, como defesas celulares, microcirculação, sistema complemento e produção de citocinas (10). Estudos sugerem que a exposição a altas concentrações de glicose promove um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos humanos (11, 12). Contudo, no presente trabalho, apenas as altas concentrações de glicose não foram capazes de induzir um aumento na produção de TNF- α e IL-6, mesmo com a viabilidade celular se mantendo por volta de 100% em todos os grupos experimentais.

O presente trabalho analisou o potencial biotecnológico imunomodulador do peptídeo IDR-1018. Tendo como base os resultados de

viabilidade celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias, observou-se que a concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a menor concentração capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios. De fato, o peptídeo IDR-1018 é descrito como o mais potente inibidor de citocinas pró-inflamatórias dentre os peptídeos da imunidade inata. Foi observado que o IDR-1018 diminuiu a produção de TNF- α por células da imunidade inata na presença de estímulos infecciosos, como o LPS (3). Assim, este estudo demonstrou um possível potencial imunomodulador do peptídeo IDR-1018, o qual promove uma tendência a homeostase imunológica, por meio da modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, em diferentes concentrações de D-glicose e estímulos infecciosos/ inflamatórios.

Referências bibliográficas:

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease: Elsevier Health Sciences; 2014.
2. Mansour SC, Hancock RE. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science*. 2015;21(5):323-9.
3. Pena OM, Afacan N, Pistollic J, Chen C, Madera L, Falsafi R, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PloS one*. 2013;8(1):e52449.
4. Steinstraesser L, Hirsch T, Schulte M, Kueckelhaus M, Jacobsen F, Mersch EA, et al. Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PloS one*. 2012;7(8):e39373.
5. Gary Sibbald R, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2008;24(S1):S25-S30.
6. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, et al. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*. 2006;74(6):3170-9.
7. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock RE. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(1):159-70.
8. Van de Loosdrecht A, Beelen R, Ossenkuppele G, Broekhoven M, Langenhuijsen M. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of immunological methods*. 1994;174(1-2):311-20.
9. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283-93.
10. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. *The American journal of the medical sciences*. 2016;351(2):201-11.
11. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes*. 2003;52(5):1256-64.
12. Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor α gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and-independent pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(23):17728-

Gráficos:

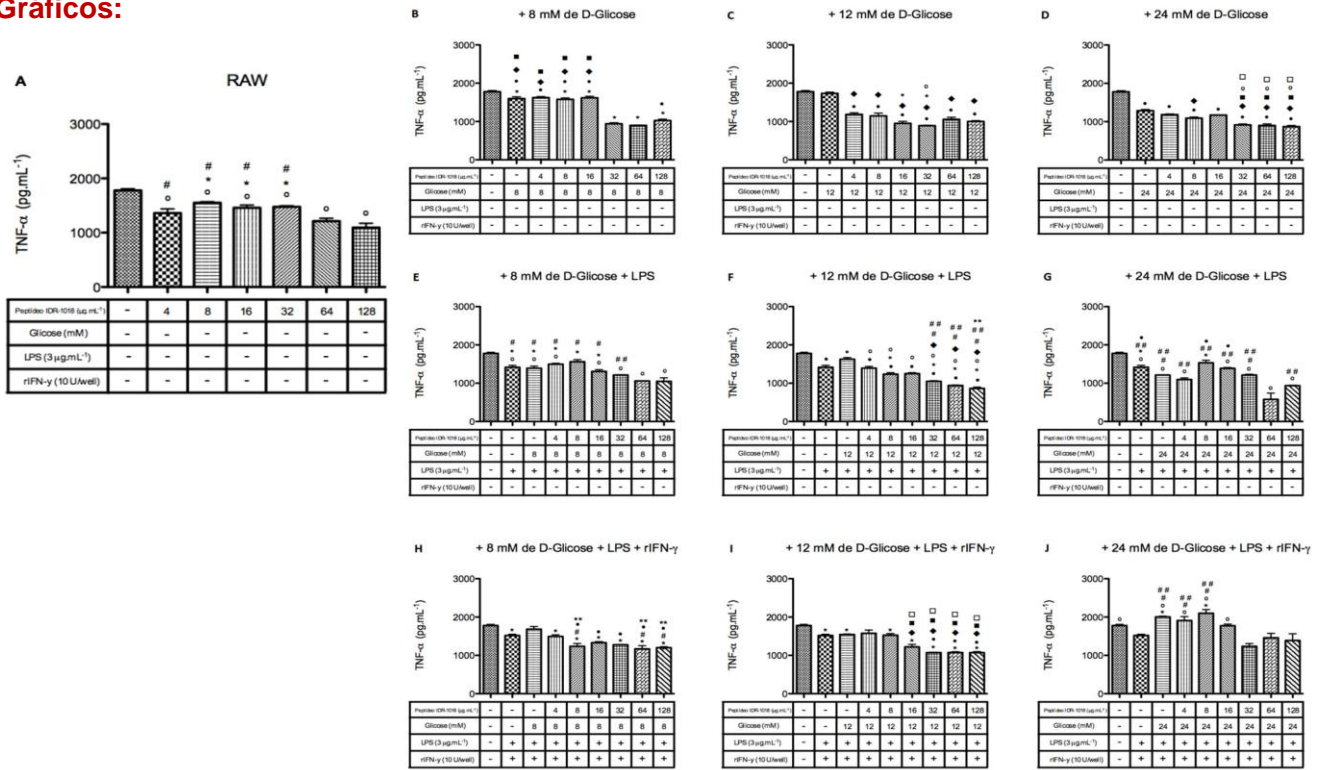


Figura 1. Produção da citocina TNF-α pelas células RAW 264.7 na presença do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128 μg.mL⁻¹) (A), após o acréscimo das diferentes concentrações de D-glicose (B, C, D), LPS (E, F, G) e IFN-γ (H, I, J). A diferença estatística foi calculada pelos testes *One-Way ANOVA* e *Post hoc* de Bonferroni. □ : p<0,05. ■ : p<0,001. * : p<0,05. ** : p<0,01. # : p<0,05. ○ : p<0,05. ● : p<0,01. ◆ : p<0,05.

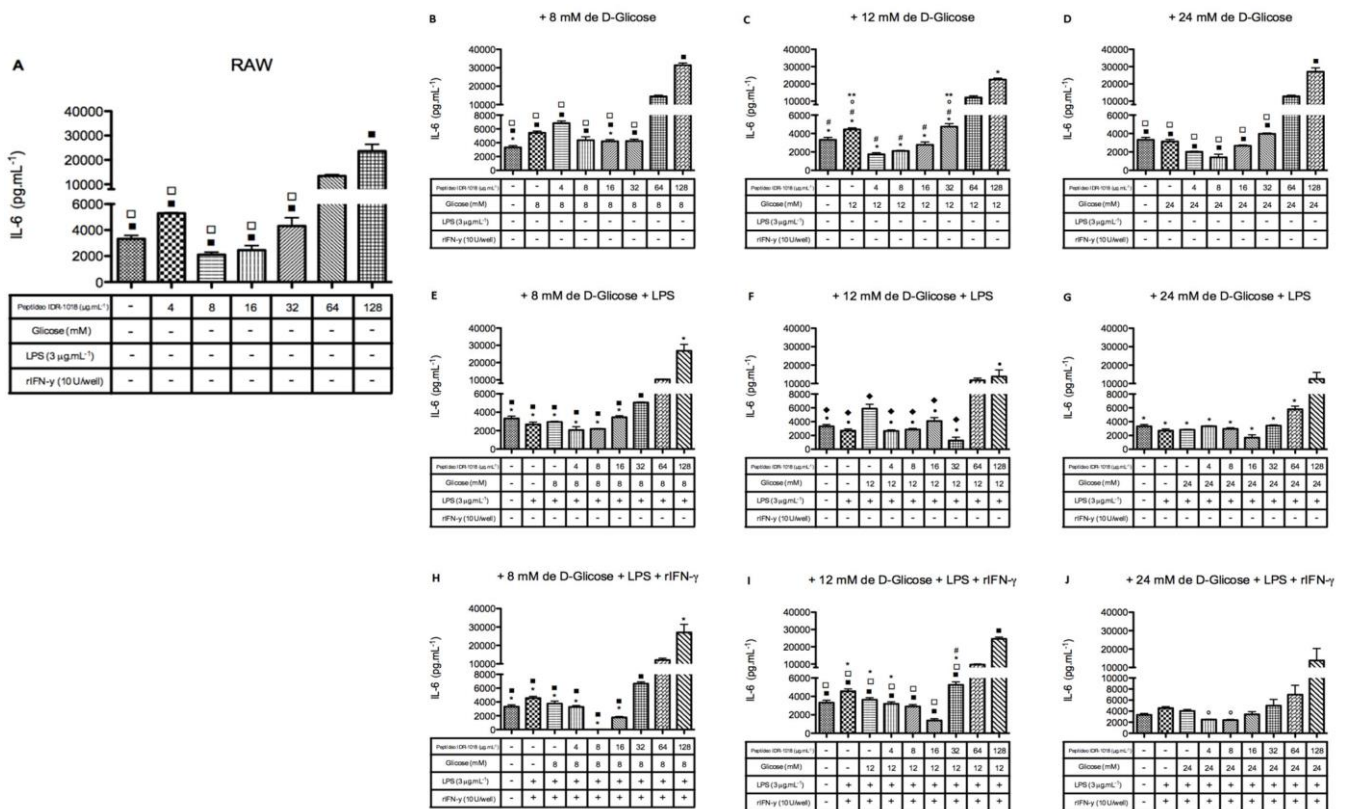


Figura 2. Produção da citocina IL-6 pelas células RAW 264.7 na presença do peptídeo IDR-1018 (4, 8, 16, 32, 64 e 128 μg.mL⁻¹) (A), após o acréscimo das diferentes concentrações de D-glicose (B, C, D), LPS (E, F, G) e IFN-γ (H, I, J). A diferença estatística foi calculada pelos testes *One-Way ANOVA* e *Post hoc* de Bonferroni. □ : p<0,05. ■ : p<0,001. * : p<0,05. ** : p<0,01. # : p<0,05. ○ : p<0,05. ● : p<0,01. ◆ : p<0,05.