

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA SIMÕES PAZELLI

**EFEITO DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA
rLOPAP EM CONDRÓCITOS HUMANOS NO MODELO
INFLAMATÓRIO COM INTERLEUCINA-1 β**

SÃO PAULO
OUTUBRO - 2018

GABRIELA SIMÕES PAZELLI

**EFEITO DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA
rLOPAP EM CONDRÓCITOS HUMANOS NO MODELO
INFLAMATÓRIO COM INTERLEUCINA-1 β**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biomédicas – Ênfase em Biotecnologia em Saúde ministrado pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, Ph.D.

Co-orientadora: Miryam Paola Alvarez-Flores, Ph.D.

SÃO PAULO

OUTUBRO - 2018

A Paola,
que com a maior paciência e dedicação,
me ensinou o que é fazer ciência,
de verdade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Renata e José Carlos Pazelli, e minhas irmãs, Laura e Helena Pazelli, por todo suporte, paciência, por sempre se preocuparem comigo à distância por 24 horas, por aguentarem cada reclamação, lágrima, crise e desespero! Por me apoiarem em cada decisão, mesmo as erradas para que eu amadureça do meu jeito. Agradeço por cada visita que me fizeram e pelas noites com vinho. Posso não falar com muita frequência, mas sei que se não fosse por todo suporte que tenho de vocês, eu não estaria onde cheguei, não estaria nem perto daqui.

Agradeço a USP, que não apenas foi essencial para minha formação, foi o lugar que me fez crescer muito. O crescimento pessoal que eu tive aqui não teria acontecido em nenhum outro lugar, eu aprendi muito sobre ciência, relacionamentos, caráter, moral, ética. Aprendi a lutar pelos meus direitos e defender meus ideais. Aprendi que viver não cabe no Lattes e que ser professor é um dom e não um diploma, e ser pesquisador é ter paixão e não um laboratório.

A minha orientadora Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, por ter me recebido tão bem no laboratório e ter me proporcionado essa experiência tão incrível que me fez crescer muito profissionalmente; além de ter me apresentado a melhor orientadora que eu poderia ter, a quem eu dedico este trabalho, Miryam Paola Alvarez-Flores. Logo, obrigada Paola! Obrigada por ter me recebido tão bem quanto a Ana, por ter me ensinado tudo que eu aprendi no laboratório com a maior paciência, carinho e

compreensão do mundo, inclusive este trabalho não existiria se não fosse por você! Obrigada por ter me orientado não apenas dentro do laboratório, por ser um exemplo para mim, por ser essa mulher incrível com um humor contagiante e coração bondoso. A experiência de ser sua aluna foi incrível, seu lugar no meu coraçãozinho estará guardado para sempre e espero um dia poder ser uma Paola na vida de alguém.

Um agradecimento especial ao Dr. Carlos de Ocesano Pereira que ajudou (e muito) na realização deste trabalho, e também me ensinou muito durante esse período com muita paciência e disposição. Além dos outros colegas que tornaram a rotina do laboratório mais divertida, Helena Francelin, Jaqueline Mayara de Araújo, Douglas Oliveira, Ana Paula de Rocha e Joseph Cutteridge.

Agradeço também a FAPESP e a GSK pelo apoio financeiro a este trabalho.

Aos amigos que mostraram que a distância não existe quando estamos com saudades: Karen Cintra, Robson Quero, Larissa Finazzi, Matheus Nagalli e Renan Augusto Grillo. Desejo muito sucesso na vida de vocês, muitas chamadas de vídeo para melhorar os nossos dias e vários encontros para matar a saudade!

À minha amiga de todo dia desde o primeiro dia na graduação, Isadora Cortez! Obrigada pela companhia em cada refeição do bandejão e cada real emprestado para comer no bandejão, pelos cafés nas cantinas, pelas noite estudando juntas e tardes na biblioteca, e por ter sido muito mais professora que alguns professores. Obrigada também por cada vinho compartilhado, as noites de pizza e lanche. Obrigada por todo apoio emocional e psicológico ao longo desses 4 intermináveis anos, por

cada lágrima e sorriso compartilhado. Do fundo do meu coração, eu espero que você seja muito feliz nas suas escolhas e que tenha muito sucesso no seu caminho porque você merece, e muito!

E claro, a quem esteve do meu lado tanto quanto minha família ao longo desses anos, Thiago Chuba. Eu não tenho palavras para descrever o quanto você significa para mim, não apenas nesse período da graduação. Pela toda boa vontade de me ajudar desde quando saiu meu nome na lista de chamada, pelos dias estudando, pelo intensivão de biomecânica, pelos resumos, pela companhia nas festas. Por permitir a minha entrada na sua vida, compartilha-la comigo e me mostrar o que é ser parceiro de verdade. Eu não consigo imaginar como esses anos teriam sido sem você e nem gostaria que fosse diferente, obrigada por dar sentido para todo esse caminho!

RESUMO

A osteoartrite é uma doença degenerativa das articulações caracterizada pela degradação da matriz extracelular (MEC) e condrócitos presentes na cartilagem. Nos pacientes há o aumento de mediadores inflamatórios no fluido sinovial, como interleucinas e óxido nítrico, os quais induzem a apoptose condrócitos. Os tratamentos existentes são paliativos e não revertem o estado da doença. Logo, estudos sobre novos alvos moleculares são necessários para tratar a doença. Estudos utilizando o extrato bruto das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* (conhecida por causar síndrome hemorrágica) permitiram a identificação de proteínas pró-coagulantes como o Lopap – um agente direto nas células endoteliais e remodelamento tecidual. Estudos estruturais determinaram os principais motivos estruturais do Lopap, permitindo a síntese de peptídeos derivados dessa proteína com atividade similar através do remodelamento residual, tornando-os candidatos ao estudo de novos tratamentos, mais específicos e eficientes para a OA. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito anti-inflamatório e citoprotetor dos peptídeos derivados de Lopap em um modelo de inflamação induzida por IL-1 β em condrócitos humanos através da análise de citocinas e expressão de proteínas presentes na inflamação. Para isso, utilizaram-se células primárias de condrócitos humanos (Lonza). O modelo de inflamação foi induzido por tratamento com IL-1 β . Nestas condições, os peptídeos foram adicionados e o efeito citoprotetor foi avaliado pelos métodos de MTT e liberação de LDH. A expressão de metaloprotease-1 (MMP-1) e translocação de NF- κ B foi analisada por *High-Content Screening* (HCS). As citocinas presentes nos sobrenadantes foram analisadas por Multiplex. Várias concentrações de 4 peptídeos foram avaliadas para determinar as melhores concentrações que induzem aumento de viabilidade na presença ou ausência de IL-1 β . Nestes estudos observou-se que os peptídeos são capazes de aumentar a viabilidade celular e a translocação NF- κ B. Além disso, reduzem a expressão de TNF- α e outras citocinas, demonstrando que os peptídeos são capazes de reduzir a liberação dessas citocinas, reduzindo assim o efeito inflamatório.

Palavras-chave

Condrocitos; Inflamação; Osteoartrite; *Lonomia obliqua*; Lopap; Peptídeos derivados.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease characterized by the degradation of the extracellular matrix (ECM) and chondrocytes present in the cartilage. In these patients, there is an increase in inflammatory mediators in the synovial fluid, such as interleukins and nitric oxide, which induce chondrocyte apoptosis. The existing treatments are palliative, and do not reverse the disease state. Thus, further studies on new molecular targets are still needed to treat the disease. Studies using the raw bristle extract of the *Lonomia obliqua* caterpillar (known to cause the hemorrhagic syndrome) allowed for the identification of constituent pro-coagulant proteins, such as Lopap – a direct agent in endothelial cells and tissue remodeling. Structural studies determined the main structural motifs of Lopap, allowing the synthesis of peptides derived from this protein with similar activity through residual remodeling, making them candidates for the study of new, more specific and efficient treatments for OA. The purpose of this study is to evaluate the anti-inflammatory and cytoprotective effect of peptides derived from Lopap in a model of inflammation induced by IL-1 β in human chondrocytes through cytokine analysis and protein expression of inflammatory markers. Therefore, primary human chondrocyte cells (Lonza) were used. The inflammation model was induced by treatment with IL-1 β . Under these conditions, the peptides were added and the cytoprotective effect assessed by the MTT and LDH release methods. Expression of metalloprotease-1 (MMP-1) and NF- κ B translocation were analyzed by the High-Content Screening (HCS). Cytokines present in the supernatants were assayed using Multiplex. Several concentrations of 4 peptides were evaluated to determine the best concentrations that induced increased viability in the presence or absence of IL-1 β . In this study was observed that peptides can increase the cell viability and the NF- κ B translocation. In addition, reduces the expression of TNF- α and other cytokines, demonstrating that these peptides can reduce the release of these cytokines hence decrease the global inflammatory effect.

Keywords

Chondrocytes; Inflammation; Osteoarthritis; *Lonomia obliqua*; Lopap; Derived peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos em diferentes concentrações.....	33
Figura 2. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos em diferentes concentrações na presença de IL-1 β (10 ng/mL)	34
Figura 3. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos nas concentrações mais eficientes	35
Figura 4. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos nas concentrações mais eficientes na presença de IL-1 β (1 ng/mL)	36
Figura 5. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com rLopap.....	37
Figura 6. Liberação de LDH dos condrócitos no tratamento com peptídeos em diferentes concentrações.....	38
Figura 7. Liberação de LDH dos condrócitos no tratamento com IL-1 β (10 ng/mL) e peptídeos em diferentes concentrações.....	38
Figura 8. Média do número de células no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β	39
Figura 9. Translocação nuclear de NF- κ B (p65) no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β por 30 min.....	41
Figura 10. Translocação nuclear de NF- κ B (p65) no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β por 2.5 horas.....	41
Figura 11. Translocação de NF- κ B em condrócitos tratados com 1 ng/mL de IL-1 β por 30 minutos na presença de 1% SFB.....	42
Figura 12. Média do número de células por sítio com o tratamento com os peptídeos e IL-1 β (1 ng/mL) nos diferentes tempos.....	43
Figura 13. Translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF- κ B (p65) no tratamento em diferentes tempos com os peptídeos.....	44

Figura 14. Translocação de NF- κ B (p65) em diferentes concentrações de SFB na presença e ausência de IL-1 β	45
Figura 15. Translocação de NF- κ B (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1 β no tempo 0 hora.....	46
Figura 16. Translocação de NF- κ B (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1 β no tempo 2 horas.....	47
Figura 17. Translocação de NF- κ B (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1 β no tempo 6 horas.....	48
Figura 18. Expressão de metaloprotease-1 no tratamento em 24 horas com os peptídeos.....	49
Figura 19. Expressão de metaloprotease-1 no tratamento em 24 horas com os peptídeos na presença de IL-1 β (1 ng/mL)	50
Figura 20. Média do número de células por sítio no tratamento com peptídeos na presença e ausência de IL-1 β	51
Figura 21. Expressão de MMP-1 em diferentes concentrações de SFB na presença e ausência de IL-1 β	52
Figura 22. Figura 22. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com P4 e P4cTer na presença de IL-1 β	53
Figura 23. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com E8 e E8cTer na presença de IL-1 β	54
Figura 24. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com ácido hialurônico e cTer na presença de IL-1 β	55
Figura 25. Efeito do Lopap em diferentes concentrações sem IL-1 β em 24 horas.....	56
Figura 26. Expressão de MMP-1 em diferentes concentrações de suplementação com SFB e Lopap.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Moléculas estudadas.....	20
Quadro 2 - Moléculas utilizadas no tratamento para estudo de viabilidade.....	24
Quadro 3 - Peptídeos utilizados no tratamento dos condrócitos.....	27
Quadro 4 - Analitos avaliados pela tecnologia de multiplex.....	58
Quadro 5 - Valores obtidos de cada analito em pg/mL a partir do tratamento com os peptídeos na presença de IL-1 β (1 ng/mL)	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

µL - microlitros

AR - artrite reumatoide

cDNA – DNA complementar

CO₂ – dióxido de carbono

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

GAG – glicosaminoglicano

G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HA - ácido hialurônico

HCS - *High-Content Screening*

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

IL-1β - interleucina-1β

iNOS - indutor de óxido nítrico sintase

IP-10 - proteína induzível por IFN -γ

Lopap - Lonomia obliqua Prothrombin Activator Protease

MCP-3 - proteína quimiotática de monócitos 3

MEC - matriz extracelular

ml – mililitros

MIP-1α - proteína inflamatória de macrófagos 1α

MMP - metaloprotease

ng - nanogramas

NO - óxido nítrico

OA - osteoartrite

PBS - tampão fosfato salino

PFA - paraformaldeído

PGE2 – prostaglandina E2

rpm - rotações por minuto

SFB - soro fetal bovino

TNF - Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OSTEOARTRITE	16
1.2 <i>LONOMIA OBLIQUA</i>	17
1.2.1 <i>LONOMIA OBLIQUA PROTHROMBIN ACTIVATOR PROTEIN (LOPAP)</i>	18
1.2.2 PEPTÍDEOS DERIVADOS	19
1.3 HIPÓTESE	20
1.4 OBJETIVOS	20
2 MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 CULTURA CELULAR DE CONDRÓCITOS	22
2.2 PLAQUEAMENTO DE CONDRÓCITOS	22
2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT	23
2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - LDH	25
2.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR <i>HIGH-CONTENT SCREENING</i>	25
2.5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO PRÓ-INFLAMATÓRIO DE CONDRÓCITOS	26
2.5.2 TRATAMENTO DOS CONDRÓCITOS COM AS MOLÉCULAS	26
2.5.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA O HCS E ANÁLISE DOS DADOS	28
2.6 IMUNOENSAIO POR TECNOLOGIA MULTIPLEX	30
2.6.1 Tratamentos das células e obtenção de amostra	30
2.6.2 Preparo dos reagentes	31
2.6.3 Imunoensaio	32
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3 RESULTADOS	33

3.1 VIABILIDADE CELULAR	33
3.1.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT	33
3.1.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE LDH	37
3.2 MODIFICAÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AOS TRATAMENTOS	39
3.2.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS PARA O TRATAMENTO PARA O ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA <i>HIGH-CONTENT SCREENING</i>	39
3.2.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS PEPTÍDEOS NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DO NF-κB	42
3.2.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS PEPTÍDEOS NA EXPRESSÃO DE MMP-1	49
3.3 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA PRESENÇA DE CITOCINAS AVALIADO POR IMUNOENSAIO UTILIZANDO A TECNOLOGIA MULTIPLEX	58
4 DISCUSSÃO	60
4.1 EFEITO DOS PEPTÍDEOS E DO LOPAP NA VIABILIDADE CELULAR DE CONDROCITOS	60
4.2 CONDIÇÕES IDEAIS PARA O TRATAMENTO PARA O ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA <i>HIGH-CONTENT SCREENING</i>	61
4.3 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DO NF-κB E EXPRESSÃO DE MMP-1	62
4.4 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA PRESENÇA DE CITOCINAS	63
5 CONCLUSÕES	66
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
6 ANEXOS	68
6.1 ANEXO 1 – Tampões e Soluções para o HCS	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa das articulações relacionada ao processo de envelhecimento, cujo estado tardio se caracteriza por uma extensa degradação da matriz extracelular (MEC) da cartilagem e consequente perda de condrócitos. A interação entre a MEC e os condrócitos exerce uma função reguladora que garante a sobrevivência celular, essa interação quando desregulada é capaz de causar dor nos pacientes. De acordo com as pesquisas de Pang-Hu Zhou e colaboradores em 2008, a evolução da OA resulta no desenvolvimento de fibrilação, fissuras, ulcerações da matriz da cartilagem e, portanto, perda da espessura total da articulação (ZHOU *et al.*, 2008). Já é conhecido que a perda da MEC ao longo da progressão da OA leva ao aumento da síntese de metaloproteases (MMPs), agrecanases, e a redução da síntese de glicosaminoglicanos (GAGs).

Em pacientes com OA, há um aumento da presença de mediadores no fluido sinovial, como interleucinas, óxido nítrico (NO), o domínio G1 do agrecan e o Fas ligante (FasL), os quais induzem a apoptose dos condrócitos (ZHOU *et al.*, 2008; KAPOOR *et al.*, 2011; AKKIRAJU & NOHE 2015). A interleucina-1 β (IL-1 β) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) são responsáveis pelo controle da degeneração da matriz de cartilagem, pois reduzem a síntese dos principais componentes da MEC, como colágeno do tipo II, além de estimularem a liberação de enzimas proteolíticas pelos condrócitos, como MMPs, responsáveis pela destruição da cartilagem (KAPOOR *et al.*, 2011). O aumento dos níveis IL-1 β ou dos receptores de IL-1 β nos condrócitos pode ser a causa do processo de apoptose dos condrócitos; ademais, a degradação do agrecan ligado ao ácido hialurônico (HA) leva ao acúmulo local do seu domínio G1 no fluido sinovial e na cartilagem, o resultado dessa interação também é capaz de induzir a apoptose dos condrócitos (ZHOU *et al.*, 2008).

A presença de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , eleva a produção de NO por meio do aumento da expressão do gene indutor de óxido nítrico sintase (iNOS) (AKHTAR *et al.*, 2011) e também estimula a liberação de prostaglandina E2 (PGE2),

esses levam a produção e ativação de MMPs (KAPOOR *et al.*, 2011), impulsionando a degradação da cartilagem.

Medicamentos biológicos como infliximab, etanercept e adalimumab inibem a ação do TNF, portanto demonstram excelente eficácia na prevenção do dano estrutural associado à artrite reumatoide (AR), porém ainda existem poucos estudos sobre o efeito desses medicamentos na OA (KAPOOR *et al.*, 2011). O ácido hialurônico é um componente natural da MEC e reduz os efeitos causados pela IL-1 β , por isso é amplamente utilizado no tratamento da OA, por meio de injeção intra-articular (ZHOU *et al.*, 2008). No entanto, os pacientes experimentam alívio temporário, sua curta duração e sua eficácia é discutível (AKKIRAJU & NOHE 2015).

Assim, ainda são necessários mais estudos sobre novos alvos-moleculares para o tratamento da doença.

1.2 LONOMIA OBLIQUA

O contato humano com as lagartas do gênero *Lonomia obliqua*, encontradas majoritariamente no sul do Brasil, podem levar a acidentes como o erucismo, cujos sintomas incluem síndrome hemorrágica causada por uma intensa atividade fibrinolítica e quantidade anormal de plaquetas (KELLEN *et al.*, 1995; CHUDZINSKI-TAVASSI & ALVAREZ-FLORES, 2005; ALVAREZ FLORES *et al.*, 2010). Alguns casos fatais também apresentam complicações renais e hemorragia cerebral (DONATO *et al.*, 1998). Desde o início do acidente há reação inflamatória somada a coagulação intravascular disseminada e fibrinólise secundária, o que pode levar as manifestações hemorrágicas. O plasma dos pacientes envenenados tem a via de coagulação e componentes fibrinolíticos alterados, entre esses, a depleção de fibrinogênio e diminuição do plasminogênio (ZANNIN *et al.*, 2003).

Estudos realizados *in vitro*, utilizando o extrato bruto das cerdas da lagarta *L. obliqua*, provou que há indução da formação de coágulos desencadeado pela cascata de coagulação pela ativação da protrombina e do fator X (FRITZEN *et al.*, 2005). A partir dessa comprovação, identificou-se proteínas pró-coagulantes nas cerdas da *L. obliqua* responsáveis por essa ação, entre elas, a *Lonomia obliqua Prothrombin*

Activator Protease (Lopap), uma lipocalina atuante diretamente nas células endoteliais, sendo sua função o aumento da liberação de moléculas responsáveis pela remodelagem tecidual (REIS *et al.*, 2001). O Lopap foi produzido na forma recombinante (rLopap) em sistema bacteriano (REIS *et al.*, 2001).

Estudos realizados *in vivo* com camundongos evidenciaram uma resposta inflamatória induzida por meio do contato com o extrato bruto da *L. obliqua*, os camundongos que tiveram contato com o extrato apresentaram um aumento do influxo de leucócitos na cavidade subcutânea (RAMOS *et al.*, 2004). As vias de sinalização relacionadas à inflamação interagem com a cascata de coagulação por meio de moléculas como trombina, fator Xa e interação de uroquinase com receptores específicos que levam a respostas inflamatórias caracterizadas pela migração de leucócitos e quimiotaxia, assim como adesão ao endotélio (FRITZEN *et al.*, 2005). Portanto, os estudos sobre os mecanismos de sinalização e ação dessas proteínas presentes na *L. obliqua* tornam-se interessantes como ferramentas para o estudo de doenças que envolvam processos inflamatórios como a OA (ALTMAN *et al.*, 2015; DASA *et al.*, 2016).

1.2.1 LONOMIA OBLIQUA PROTHROMBIN ACTIVATOR PROTEIN (LOPAP)

O Lopap é uma proteína tetramérica cuja massa molecular é de 69 kDa e sua ação consiste na ativação da protrombina, independente de cofatores do complexo protrombinase, cuja atividade é aumentada na presença de cálcio (REIS *et al.*, 2001). É a primeira lipocalina descrita que possui atividade proteolítica (REIS *et al.*, 2006).

Estudos em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs) demonstraram que essa proteína promove a sobrevivência celular por meio do aumento de secreção de NO e prostaciclina (PGI₂), os quais induzem a vasodilatação e inibição da ativação de plaquetas e expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, porém não altera a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . Outra ação interessante da proteína em HUVECs é o aumento significante da viabilidade celular e inibição da apoptose (FRITZEN *et al.*, 2005; CHUDZINSKI-TAVASSI & ALVAREZ-FLORES, 2005; CHUDZINSKI-TAVASSI, *et al.*, 2013).

Para produção da sua forma recombinante, rLopap, estudos envolvendo análise de sequência, clonagem, expressão em *E. coli* e estudo estrutural da proteína foram realizados. Estudos sobre sua forma recombinante demonstraram que possui características similares a forma nativa, incluindo a atividade de ativação da protrombina, e um tamanho de 21 kDa (REIS *et al.*, 2006). Características dos domínios conservados das lipocalina são mantidas na sequência completa do rLopap, confirmando sua homologia com as proteínas da família das lipocalinas (REIS *et al.*, 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI, *et al.*, 2013).

1.2.2 PEPTÍDEOS DERIVADOS

Tem sido proposto que os motivos conservados de lipocalinas são responsáveis pela estrutura da proteína e as propriedades funcionais do Lopap (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2012). A partir de estudos de estrutura tridimensional, modelagem molecular e química, métodos de química computacional e quimiometria definiu-se os principais motivos estruturais da proteína Lopap possibilitando a síntese dos peptídeos derivados dessa proteína (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010). O estudo mais detalhado da ação da proteína em processos inflamatórios como a OA, assim como seus peptídeos recombinantes, possibilitará o desenvolvimento de novos tratamentos mais específicos e eficientes através do descobrimento de novos alvos moleculares para a OA.

Considerando estudos do Centro de Excelência para Descoberta de Novos Alvos Moleculares (CENTD) ainda não publicados, a síntese dos peptídeos foi direcionada para as entidades químicas mais promissoras. Esses peptídeos são passíveis de proteção de propriedade intelectual, logo, suas sequências não serão detalhadas neste trabalho.

A sequência peptídica denominada "cTer" corresponde a um peptídeo derivado da molécula Amblyomin-X (BATISTA *et al.*, 2010) com características de CPP (*Cell Penetrationg Peptides*), conhecidos na literatura como moléculas que transportam uma ampla variedade de conjugados biologicamente ativos ("cargo") para dentro das células (GUIDOTTI *et al.*, 2017). Dessa forma, os CPPs são uma forma inovadora de

uma droga atingir alvos intracelulares, reduzindo as concentrações utilizadas que poderiam ser tóxicas em maiores quantidades. A patente desta sequência e o seu uso como CPP está sendo elaborada, e não será descrita no presente trabalho.

O presente trabalho estuda os efeitos de 4 peptídeos derivados do Lopap, sendo 2 peptídeos conjugados com a sequência “cTer”, e sua proteína recombinante (Quadro 1) em modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β , possibilitando o desenvolvimento de novos tratamentos. Entre os peptídeos testados neste trabalho está o peptídeo P4, o qual já foi patenteado nos Estados Unidos (VENTURA *et al.*, 2014).

Nome/código	Massa (kDa)	Nº de aminoácidos
rLopap	21	10
E8	824,98	8
P4	1326	10
E8cTer	6875.54	62
P4cTer	7361.03	65

Quadro 1. Moléculas estudadas. Foram selecionadas 5 moléculas a serem estudadas no presente trabalho, a tabela apresenta seus códigos e respectivas massas e número de aminoácidos.

1.3 HIPÓTESE

Baseado em estudos sobre a proteína Lopap, espera-se verificar que essa molécula ou seus peptídeos derivados possuam efeito anti-inflamatório e citoprotetor em modelo celular inflamatório.

1.4 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho consiste na avaliação do efeito anti-inflamatório e citoprotetor dos peptídeos derivados da proteína rLopap em um modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β .

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito dos peptídeos sobre a viabilidade celular em modelo inflamatório de condrócitos humanos por meio da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial;
- Avaliar o efeito dos peptídeos sobre a viabilidade celular em modelo inflamatório de condrócitos humanos baseado na liberação da lactato desidrogenase;
- Identificar possíveis as vias de atuação dos peptídeos nos condrócitos; por meio da dosagem de citocinas em sobrenadantes tratados com os peptídeos, e pelo padrão de expressão (MMP-1) ou de translocação (NF-κB) de marcadores de OA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTURA CELULAR DE CONDRÓCITOS

Os condrócitos primários humanos utilizados neste estúdio foram adquiridos da empresa Lonza: *Normal Human Articular Primary chondrocytes* (NHAC-Kn, #CC-2550, Lote 8F3336). A cultura celular dos condrócitos foi realizada em garrafas (Sarstedt T175 e T75). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Sigma), incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e utilizadas culturas na 6^a passagem. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até a cultura ter atingido 80% de confluência.

2.2 PLAQUEAMENTO DE CONDRÓCITOS

Para os ensaios de MTT, LDH e HCS foi necessário realizar o plaqueamento das células para tratá-las. Após atingir a confluência desejada, a garrafa contendo as células aderentes teve o meio retirado, e foi lavada 2 vezes com 10 mL de PBS. Em seguida adicionou-se 2 mL de uma solução de tripsina/EDTA (0,05%, Gibco, #25300-054), deixando-a na estufa de 3 a 5 min a 37°C e 5% de CO₂, até as células estarem completamente descoladas da garrafa. Em seguida adicionou-se 2 mL de SFB (Sigma) para neutralizar a ação da tripsina e todo o conteúdo da garrafa foi coletado em um tubo falcon, repetindo-se a lavagem com PBS para coletar as possíveis células que ainda ficaram soltas na garrafa. Com todo o conteúdo coletado, o mesmo foi centrifugado a 1000 rpm, a 15°C por 10 minutos. O sobrenadante foi então retirado e foram adicionados 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB para ressuspender as células.

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer. O azul de tripan foi utilizado para corar as células para a contagem (10 µL de células, 10 µL de corante e 80 µL de PBS). Após a contagem, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços. Para o HCS foram utilizadas as placas da marca Greiner (Microplate Advanced TC) e

para os ensaios de MTT e LDH foram utilizadas as placas da marca Thermo Scientific (Nunclon Delta MicroWell) contendo 200 µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB em quantidade de 8×10^3 células por poço.

2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico rápido baseado no sal de tetrazólio (MTT) (Sigma, #M2128). O MTT avalia por meio da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial a viabilidade celular, através da capacidade de metabolizar o reagente amarelo - MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio) em cristais de formazan de cor violeta (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi realizado em placas estéreis de 96 poços, seguindo a cultura e o plaqueamento de células conforme descrito anteriormente, com amostras em triplicatas. Após o plaqueamento, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ *overnight*. As demais etapas estão posteriormente descritas. Os tratamentos realizados foram de 24 horas com as células incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂, seguindo 3 diferentes modelos descritos:

Peptídeos: padronização inicial

Após o processo de plaqueamento das células nas condições descritas acima, foram preparados os meios DMEM suplementado com 10% de SFB e meios DMEM com e sem IL-1β (10 ng/mL). Na presença ou ausência de IL-1β, os peptídeos testados foram P4, P4cTer, E8, E8cTer nas concentrações 100, 200, 500, 1000 e 2000 nM, e ácido hialurônico nas concentrações 10, 20 e 40 ng/mL. Tanto os peptídeos quanto o ácido hialurônico estão diluídos em H₂O. Assim, foram preparados os veículos correspondentes. O volume correspondente à concentração de 500 nM dos peptídeos corresponde a 5% do volume total da solução do tratamento, logo, foi preparado um veículo contendo meio DMEM na ausência de SFB, na presença ou ausência de IL-1β (10 ng/mL) e H₂O com volume correspondente a 5% do volume.

Peptídeos na presença de 1% SFB

Após o estabelecimento do modelo de condrócitos, os peptídeos derivados foram avaliados nas seguintes condições: meio DMEM com 1% de SFB, na presença ou ausência de IL-1 β (1 ng/mL) ou dos peptídeos conforme descrito no quadro 2. O ácido hialurônico foi utilizado na concentração de 40 μ g/mL em ambas as condições.

Código/Nome	P4 e P4cTer	E8 e E8cTer	cTer
Concentração sem IL-1 β (nM)	200 e 500	100 e 500	2000
Concentração com IL-1 β (nM)	1000 e 2000	500 e 1000	2000

Quadro 2. Moléculas utilizadas no tratamento para estudo de viabilidade. Foram selecionadas 5 moléculas para o tratamento a fim de analisar seu efeito na viabilidade celular, a tabela apresenta as concentrações utilizadas de cada uma.

Lopap

Equitativamente conforme descrito no tratamento anterior, foram preparados os meios DMEM sem e com IL-1 β (10 ng/mL), ambas as condições também contendo rLopap nas concentrações 10, 50, 150 e 250 nM.

Após o tempo de tratamento com os peptídeos ou com o Lopap, o sobrenadante foi coletado em outra placa de 96 poços da marca Thermo Scientific (*Nunclon Delta MicroWell*) e centrifugado a 1000 rpm, 15°C por 10 minutos para posterior análise de citocinas ou ensaio de LDH. Enquanto, as células aderidas foram incubadas com 100 μ L de reagente *MTT Ultrapure* (USB), a 0,5 mg/mL em PBS 1x, por 3 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Finalizado o tempo de 3 horas, o reagente foi removido e 100 μ L de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi realizada utilizando o espectrofotômetro *SpectraMax M5e Multi-Mode Microplate Reader* da Molecular Devices em comprimento de onda de 540 nm, sendo utilizado para análise o software *SoftMax Pro 6.4 - Microplate Data Acquisition and Analysis Software*. Os resultados estão apresentados como porcentagem da viabilidade (média \pm erro padrão da média (EPM), em relação ao controle suplementado com 10% de SFB.

2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - LDH

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH, Kit Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity assay, Promega, #G1780) utilizando os sobrenadantes coletados e de acordo com as especificações do fabricante. Para dosagem de LDH total, alguns poços (contendo sobrenadante e célula) foram escolhidos para adição de 10 µL de *Lysis Solution* por 30 min a 37ºC e posteriormente coletado. Segundo o protocolo do fabricante, após a centrifugação, 50 µL dos sobrenadantes foram coletados em uma placa de 96 poços e adicionou-se 50 µL do Substrato Mix (reagente CytoTox) em todos os poços; a placa foi coberta com papel alumínio para protege-la da luz e foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Então, foram adicionados 50 µL da *Stop Solution* em cada poço da placa e, depois realizada a leitura a 492 nm no espectrofotômetro *SpectraMax M5e Multi-Mode Microplate Reader* da Molecular Devices. O software *SoftMax Pro 6.4 - Microplate Data Acquisition and Analysis Software* foi utilizado para análise. Os resultados estão apresentados como porcentagem da viabilidade (média ± erro padrão da média (EPM), em relação ao controle contendo a liberação total do LDH.

2.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR *HIGH-CONTENT SCREENING*

O *High Content Screening* (HCS) é uma tecnologia inovadora baseada em microscopia de fluorescência, o qual resolução é possível quantificar multiparâmetros celulares simultaneamente por meio de imagens em alta (BUCHSER *et al.*, 2014). Além de parâmetros morfológicos, através desta estratégia também é possível analisar a expressão intracelular e a sub-localização celular de proteínas de interesse. Todo este processo ocorre de forma automatizada em uma plataforma de aquisição e análise de dados em larga escala, utilizando placas de múltiplos poços (96, 384 ou 1536 poços). Portanto, para identificar possíveis modificações celulares associadas aos tratamentos realizados no presente projeto, utilizou-se a tecnologia de HCS. Resumidamente, este ensaio segue as seguintes etapas: cultura celular, plaqueamento e tratamento das células, fixação e permeabilização, bloqueio,

marcação com os anticorpos, aquisição e análise. Todas estas etapas foram previamente padronizadas no laboratório CENTD.

O cultivo das células foi realizado seguindo o tópico 2.1 – Cultura Celular de Condrócitos e o plaqueamento seguindo o tópico 2.2 – Plaqueamento de Condrócitos. Após o plaqueamento, as células foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ *overnight*. As demais etapas estão descritas abaixo.

As imagens em alta resolução foram obtidas no equipamento “The ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System” (Molecular Devices, USA), utilizando o software *MetaXpress 6 High Content Image Acquisition and Analysis Software* (Molecular Devices, USA).

2.5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO PRÓ-INFLAMATÓRIO DE CONDRÓCITOS

Para realizar a análise das proteínas de interesse, tanto as secretáveis quanto intra-celulares, foi necessário realizar uma padronização prévia do modelo pró-inflamatório de condrócitos. Inicialmente foi realizado um experimento com diferentes concentrações de SFB e de IL-1β para estabelecer qual a melhor condição para realizar os experimentos. A padronização foi feita através da análise de translocação do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65) após a sua ativação com IL-1β.

Após 24 horas do plaqueamento das células, foram preparados meios de cultura DMEM com 0, 1, 2,5 e 5% de SFB, contendo ou não várias concentrações de IL-1β: 0, 0,1, 0,5 e 1 ng/mL. Outros controles foram preparados com meio DMEM contendo 10% de SFB na presença ou ausência de IL-1β. Foi realizada uma pré-incubação por 30 e 150 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e a placa fixada e permeabilizada seguindo os protocolos descritos posteriormente.

2.5.2 TRATAMENTO DOS CONDRÓCITOS COM AS MOLÉCULAS

Análise da translocação do fator de transcrição NF-κB (p65)

Após o processo de plaqueamento das células nas condições descritas acima, foram preparados os meios DMEM suplementado com 1% de SFB contendo os peptídeos P4 e P4cTer na concentração de 2 μM, E8 e E8cTer na concentração de 1

μM e ácido hialurônico na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. O tratamento foi realizado em 2, 6 e 24 horas antes da adição de IL-1 β e simultaneamente a adição, sendo esse o tempo 0. No tempo 0, foi adicionado aos poços controles IL-1 β (1 ng/mL) por 30 min. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1000 rpm, a 15°C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. Após a coleta as células foram fixadas e permeabilizadas conforme descrito subsequentemente.

Análise de expressão da Metaloprotease-1 (MMP-1)

Similarmente ao que foi descrito anteriormente para a translocação do NF- κ B, as células receberam os mesmos tratamentos (Quadro 3), porém por 24 h. Em seguida, elas foram marcadas com um anticorpo contra MMP-1 e analisadas conforme descrito posteriormente.

Peptídeo	P4 e P4cTer	E8 e E8cTer	cTer
Concentração sem IL-1 β (nM)	200 e 500	100 e 500	2000
Concentração com IL-1 β (nM)	1000 e 2000	500 e 1000	2000

Quadro 3. Peptídeos utilizados no tratamento dos condróцитos. Foram selecionadas 5 moléculas para o tratamento das células a fim de analisar seu efeito frente a expressão das MMP-1 (após 24 h).

Em paralelo, uma outra placa foi preparada para testar o efeito citoprotetor do rLopap. Para isso, foram preparadas as soluções de meio DMEM suplementado com 1% de SFB contendo rLopap nas concentrações de 10, 50, 100, 200 e 1000 nM, na ausência de IL-1 β , além dos controles: meio DMEM suplementado com 10 e 1% de SFB na presença de IL-1 β .

Para ambas as placas, previamente aos tratamentos de 24 h, o meio de cultivo contendo 10% SFB foi removido e substituído por meio contendo 1% SFB nas condições de tratamentos descritas anteriormente. Após 24 horas, a placa foi centrifugada a 1000 rpm, a 15°C por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Posteriormente, as células das placas foram marcadas conforme descrito nas etapas abaixo.

2.5.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA O HCS E ANÁLISE DOS DADOS

Os procedimentos relacionados a preparação das placas para marcação estão descritos nas etapas abaixo, assim como as estratégias adotadas para análise dos dados obtidos.

Fixação

Após a coleta do sobrenadante, as células foram fixadas com 100 µL de *Fixation Buffer* por poço (FB) (ANEXO 1) durante 1h a temperatura ambiente sob agitação branda.

Permeabilização

Após a etapa de fixação, o FB foi cuidadosamente removido e adicionado 100 µL por poço do *Permeabilization Buffer* (PB) (ANEXO 1), por 5 min sob leve agitação a temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes por 5 minutos com 200 µL por poço da solução WB2 (PHEM-GLYCINE) (ANEXO 1) a temperatura ambiente sob agitação branda.

Bloqueio

Após as lavagens, adicionou-se 100 µL por poço do tampão de bloqueio (BSA 1% (ANEXO 1) por 30 min a 4ºC.

Marcação

Após a etapa de bloqueio, a solução foi removida e substituída pela solução contendo os anticorpos primários:

- Phospho-NF-κB-p65 (SER536) (93h1) Rabbit MAB, Cell Signaling Technology #3033S, diluição 1:500.
- MMP-1 (SB12E), Mouse IgG2B, Santa Cruz #58377), diluição 1:500.

Esta etapa foi realizada *overnight* a temperatura de 4ºC. Em seguida, a solução contendo os anticorpos primários foi removida, lavada 3 vezes por 5 minutos com 200 µL por poço com o tampão WB1, e substituída pela solução contendo os anticorpos secundários acoplados aos fluoróforos específicos. Simultaneamente a marcação

com os anticorpos secundários, o DNA nuclear foi corado com Hoechst 33342 (5 µM – Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) por 1 h a temperatura ambiente. Anticorpos secundários:

- Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, ThermoFisher #A21244, diluição 1:1000.
- Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, ThermoFisher #A21236, diluição 1:1000.

Depois disso, a placa foi lavada 3 vezes com o tampão WB1 por 5 min a temperatura ambiente, e mantidas com 200 µL de PBS. Posteriormente, as imagens foram adquiridas e analisadas no *MetaXpress High-Content Image Acquisition & Analysis Software* (Molecular Devices). Em alguns casos, o citoesqueleto das células também foi corado com Alexa Fluor 488® Phalloidin (F-actin), Molecular Probes #A12379, diluição 1:500. A aquisição das imagens e quantificação da intensidade de fluorescência foram conduzidas automaticamente através do software MetaXpress, usando a objetiva de 20X. Para cada condição de tratamento e filtro do equipamento, foram adquiridas 16 imagens por poço em triplicata. Em todos os casos, também foi realizada a contagem do número de células por poço.

Estratégia de análise da translocação do NF-κB (p65)

A análise foi realizada através da customização do módulo “*Translocation Enhanced*” no software MetaXpress (Molecular Devices). Foi quantificada a intensidade fluorescência na área nuclear e na área citoplasmática (*Inner/Outer Intensity Ratio*). O percentual de translocação (%), que representa os valores plotados nos gráficos, foi calculado através da razão entre a média da intensidade de fluorescência da região nuclear pela intensidade de fluorescência da região citoplasmática (*Nuc/Cyt Ratio*) (coeficiente de relação ≥ 0.6).

Estratégia de análise da expressão da Metaloprotease-1 (MMP-1)

A expressão de MMP-1 foi determinada e quantificada através de mudanças da intensidade do sinal de fluorescência (MFI – *Median Fluorescent Intensity*) usando o módulo “*Multi Wavelength Cell Scoring*”. Os valores plotados nos gráficos

correspondem a média da intensidade de fluorescência obtida a partir da média dos 16 sítios analisados por poço, cuja mediana foi normalizada pelo número de células adquiridas.

2.6 IMUNOENSAIO POR TECNOLOGIA MULTIPLEX

A tecnologia multiplex permite o estudo quantitativo de várias citocinas simultaneamente utilizando pequeno volume de amostra e em um único poço. Luminex xMAP é uma tecnologia multiplex, rápida, baseada em conjunto de microesferas, também conhecidas como *beads*, de poliestireno ou paramagnéticas codificadas com 500 diferentes intensidades de vermelho, permitindo a realização de até 500 bioensaios, e revestidos com um anticorpo específico para identificar o analitos de interesse (CHOWDHURY *et al.*, 2009). Dentro do equipamento de análise, as microesferas são excitadas por uma fonte de luz, os quais identificam as propriedades espectrais das mesmas por meio de óptica e processamento digital de sinais, e assim reconhece o analito associado.

O ensaio foi realizado seguindo o protocolo do fabricante e o kit utilizado para este ensaio foi o *Milliplex Map Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (#HCYTOMAG-60K, lote 2852810, Millipore). Cada microesfera é identificada e o resultado quantificado com base no sinal obtido da fluorescência. O software utilizado para aquisição foi o Luminex xPONENT e para análise o MILLIPLEX Analyst 5.1.

A realização do ensaio é dividida nas etapas: obtenção de amostra; preparação dos reagentes para o ensaio e imunoensaio.

2.6.1 Tratamentos das células e obtenção de amostra

Para obtenção das amostras foi realizado o tratamento dos condrócitos em placas estéreis de 96 poços conforme descrito no tópico 2.2. Foram preparados e adicionados os meios DMEM contendo os peptídeos P4 e P4cTer na concentração de 2 µM, E8 e E8cTer na concentração de 1 µM e ácido hialurônico na concentração de

40 µg/mL, todos incluindo IL-1 β (1 ng/mL); além dos controles contendo apenas DMEM e DMEM com IL-1 β (1 ng/mL). O tratamento nessas condições foi de 24 horas com as células incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de tratamento, a placa foi centrifugada a 1000 rpm, a 15°C por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado em outra placa de 96 poços. Essa placa contendo o sobrenadante, foi centrifugada novamente nas mesmas condições e 20 µL desse sobrenadante foi coletado em outra placa.

2.6.2 Preparo dos reagentes

Preparo das beads

As garrafas contendo as *beads* foram sonicadas por 30 segundos e vortexadas por 1 minuto. Foram adicionados 60 µL de cada solução contendo as *beads* na “*Mixing Bottle*” e completado com o “*Bead Diluent*” até o volume final de 3 mL, sendo esse também vortexado.

Os analitos avaliados neste ensaio foram: EGF, FGF-2, TGF- α , G-CSF, GM-CSF, IFN- α 2, IFN- γ IL-10, MCP-3, IL-12P70, CD40L, IL-17A, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α e TNF- β .

Preparo dos controles de qualidade

Os controles de qualidade 1 e 2 foram reconstituídos com 250 µL de água deionizada e então, vortexados.

Preparo do tampão de lavagem

O “10X Wash Buffer” foi vortexado e 60 mL do mesmo foi diluído em 540 mL de água deionizada.

Preparo padrão de citocinas humanas

A padronização das citocinas foi realizada a partir da reconstituição do “*Human Cytokine Standard*” em 250 µL de água deionizada e vortexado por 10 segundos. Em seguida, 200 µL do “*Assay Buffer*” foi adicionado em cada tubo de padronização denominados 2.000, 400, 80, 16 e 3,2 pg/mL. Uma diluição seriada foi feita a partir da

adição de 50 µL do tubo 10.000 pg/mL no tubo 2.000, o qual foi vortexado e adicionado 50 µL do mesmo no tubo 400 pg/mL, assim por diante em ordem decrescente dos tubos. O padrão 0 pg/mL é o “Assay Buffer”.

2.6.3 Imunoensaio

Foram adicionados 25 µL de cada padrão de citocinas e controles nos poços selecionados e 25 µL do “Assay Buffer” nos poços contendo as amostras. O “Mixing Bottle” contendo as *beads* foi vortexado novamente e adicionados 25 µL em cada poço. A placa foi selada e deixada protegida da luz sob agitação branda *overnight*.

A seguinte etapa consiste em 2 lavagens, e para tanto utilizou-se uma placa magnética (EMD Millipore, 40-285). Cada lavagem consistiu em encaixar a placa contendo as amostras na placa magnética por 1 min para decantação completa das *beads*, e então a remoção do sobrenadante; a placa contendo as amostras foi removida da placa magnética, adicionados 200 µL do tampão de lavagem em cada poço e agitada por 30 segundos. Após esse processo a placa foi novamente encaixada na placa magnética para decantação das *beads*.

Finalizado o processo de lavagem, a placa contendo as amostras foi inserida no equipamento para a leitura. A configuração do software foi realizada seguindo o protocolo do fabricante.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) seguido de comparações múltiplas de Tukey e/ou *test t* de Student no programa *GraphPad Prism* 6 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 VIABILIDADE CELULAR

3.1.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

No primeiro teste de viabilidade celular por MTT, no qual a concentração de IL-1 β foi de 10 ng/mL e o meio de cultura não possuía suplementação de SFB, os peptídeos demonstraram efeito no aumento da viabilidade em comparação aos seus controles, tanto na ausência (Figura 1) ou na presença de IL-1 β (Figura 2). A viabilidade celular obtida no veículo se manteve muito próxima ao respectivo controle, indicando que a solução em que os peptídeos estão diluídos, no caso, H₂O, não causa nenhuma alteração nas células.

Ainda, no tratamento sem interleucina, o efeito citoprotetor de algumas concentrações dos peptídeos P4, P4cTer e E8 foi estatisticamente significativo comparado ao ácido hialurônico, que é um composto atualmente utilizado no tratamento de osteoartrite, e que não teve efeito avaliado pelo ensaio de MTT, indicando assim o efeito citoprotetor esperado para os peptídeos derivados do Lopap (Figura 1).

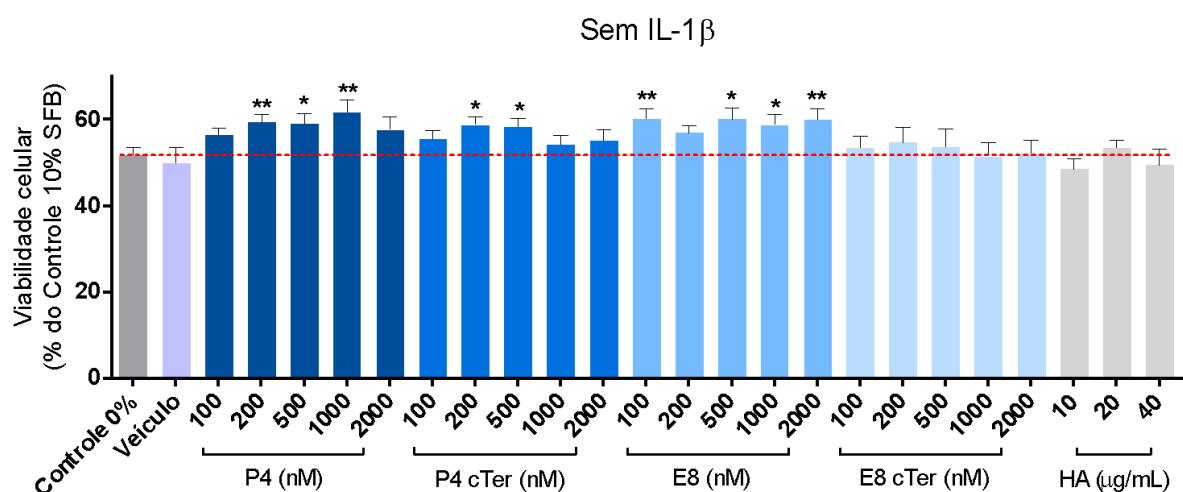


Figura 1. Viabilidade celular dos condróцитos no tratamento com peptídeos em diferentes

concentrações. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05 e ** p<0.01 quando comparados ao controle, linha vermelha pontilhada, teste t, n=9).

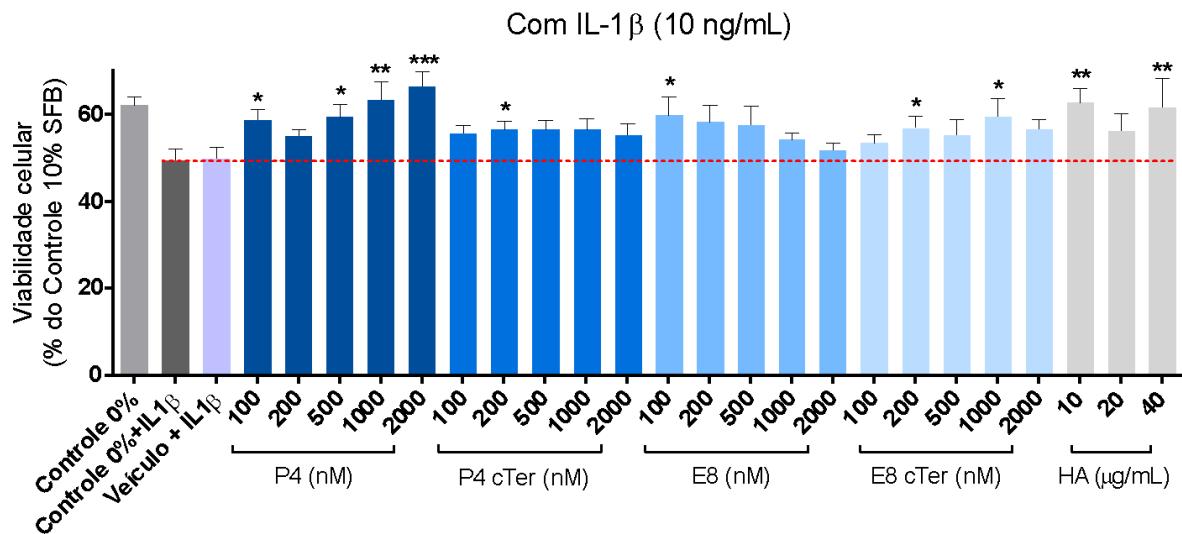


Figura 2. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos em diferentes concentrações na presença de IL-1β (10 ng/mL). Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0.001 quando comparados ao controle com IL-1β, linha vermelha pontilhada, teste t, n=9).

Este primeiro ensaio permitiu definir as melhores concentrações dos peptídeos em induzir o efeito citoprotetor. Essas concentrações foram testadas novamente em condições diferentes, após a padronização do modelo pró-inflamatório de condrócitos, utilizando a concentração de 1 ng/mL de IL-1β e meio DMEM suplementado com 1% de SFB. Além disso, também foi testado um peptídeo com a sequência “cTer” como um controle, para verificar se esta sequência possui ou não efeito sobre a viabilidade dos condrócitos.

Nestas novas condições, no tratamento na ausência de 1 ng/mL de IL-1β, foi novamente observado um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular induzida pelos peptídeos, especialmente pelos peptídeos P4, P4cTer e E8 (Figura 3). Por outro lado, o ácido hialurônico continuou não tendo efeito na viabilidade celular. Também foi observado que a sequência cTer não possui efeito sobre a viabilidade celular quando comparado ao controle (Figura 3).

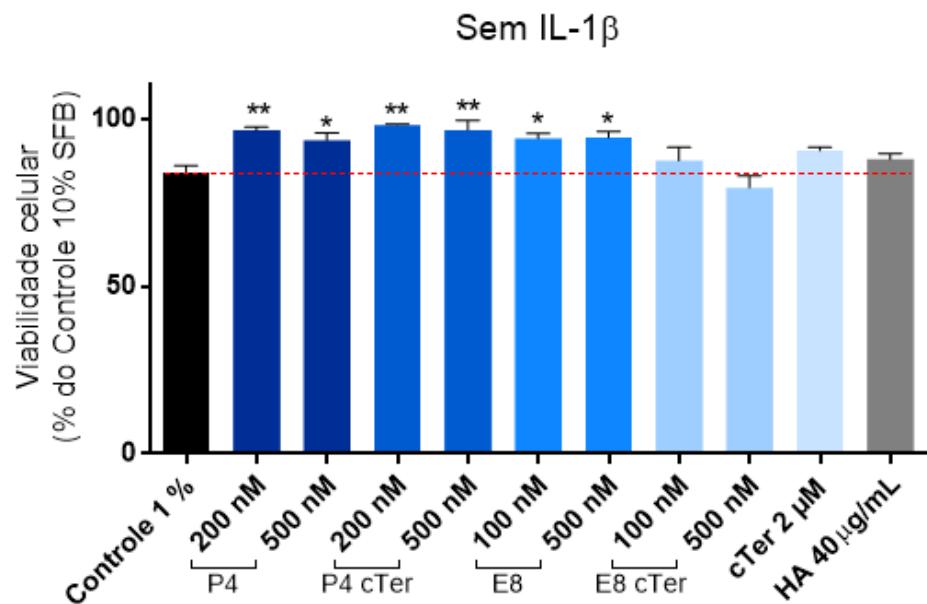


Figura 3. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos nas concentrações mais eficientes. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura, o meio DMEM de todas as condições possui suplementação de 1% de SFB. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* $p<0.05$ e ** $p<0.01$ quando comparados ao controle 1%, linha vermelha pontilhada, t test, $n=3$).

Já no tratamento na presença de IL-1 β (1ng/mL), o aumento da viabilidade celular foi observado apenas com os peptídeos P4 (1 e 2 μ M), E8 (1 μ M). Nestas condições, o ácido hialurônico continua não tendo efeito na viabilidade celular. Entretanto, o tratamento com E8cTer (500 nM e 1 μ M) levou a redução da viabilidade celular comparada ao controle com IL-1 β . Além disso, a sequência cTer (2 μ M), contrariamente ao tratamento sem IL-1 β , demonstrou efeito sobre a viabilidade, aumentando significativamente quando comparado ao controle (Figura 4).

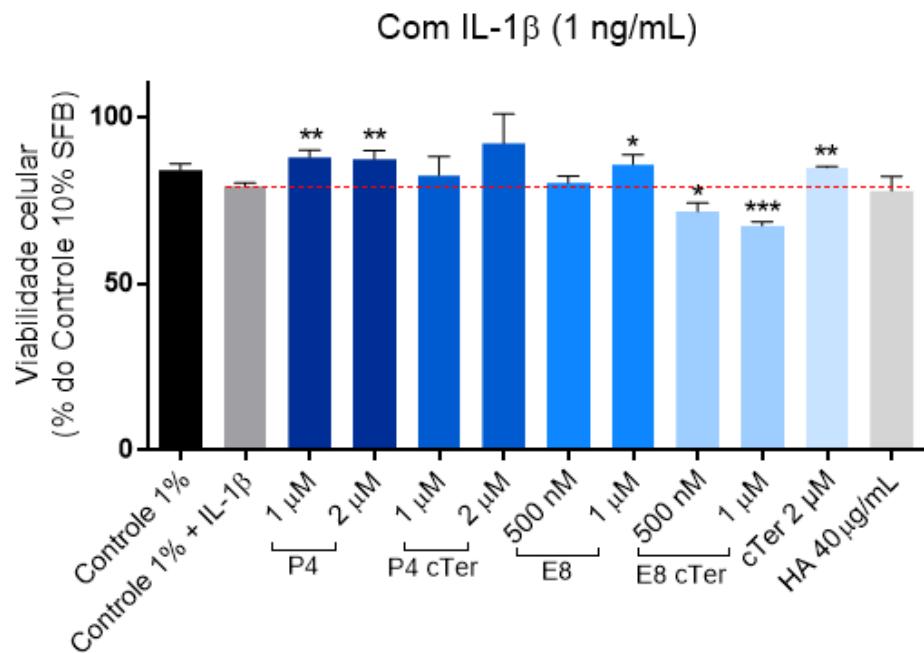


Figura 4. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com peptídeos nas concentrações mais eficientes na presença de IL-1 β (1 ng/mL). Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura, o meio DMEM de todas as condições possui suplementação de 1% de SFB. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0,001 quando comparados ao controle com IL- β , linha vermelha pontilhada, *test t*, n=3).

Em relação a proteína rLopap, foi observado um aumento estatisticamente significativo da viabilidade celular dos condrócitos tratados na ausência de IL-1 β , apenas na concentração 50 nM. Por outro lado, o tratamento de condrócitos com o rLopap na presença de IL-1 β (10 ng/mL) induziu um aumento na viabilidade celular apenas na concentração de 10 nM, em comparação ao controle com IL-1 β , porém a diferença não é estatisticamente significativa (Figura 5).

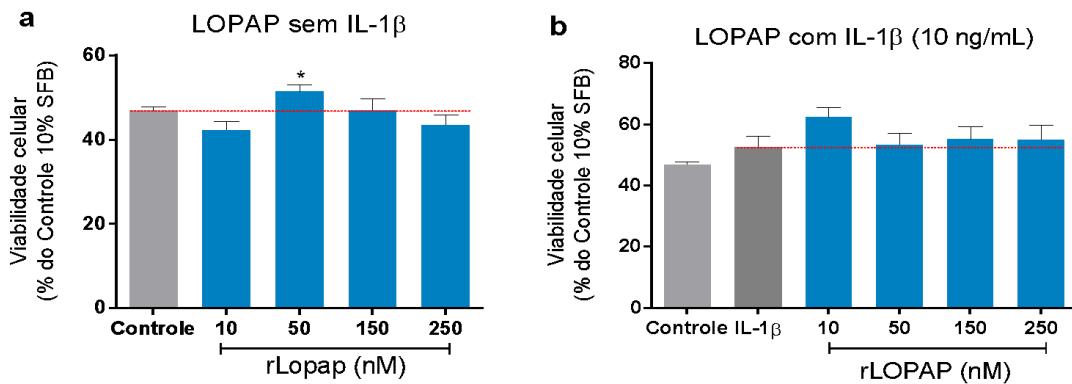


Figura 5. Viabilidade celular dos condrócitos no tratamento com rLopap. a) efeito do rLopap em 4 diferentes concentrações na viabilidade celular na ausência de IL-1 β . b) efeito do rLopap em 4 diferentes concentrações na viabilidade celular na presença de IL-1 β (10 ng/mL). Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05 quando comparados ao controle, linha vermelha pontilhada, *test t*, n=3).

3.1.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE LDH

O ensaio de liberação de LDH demonstrou que os tratamentos com os peptídeos reduzem a liberação de LDH quando comparados ao controle, contudo, essa redução não é estatisticamente significativa para todos os peptídeos e o ácido hialurônico, tanto para as condições na ausência ou presença de 10 ng/mL IL-1 β (Figura 6 e 7).

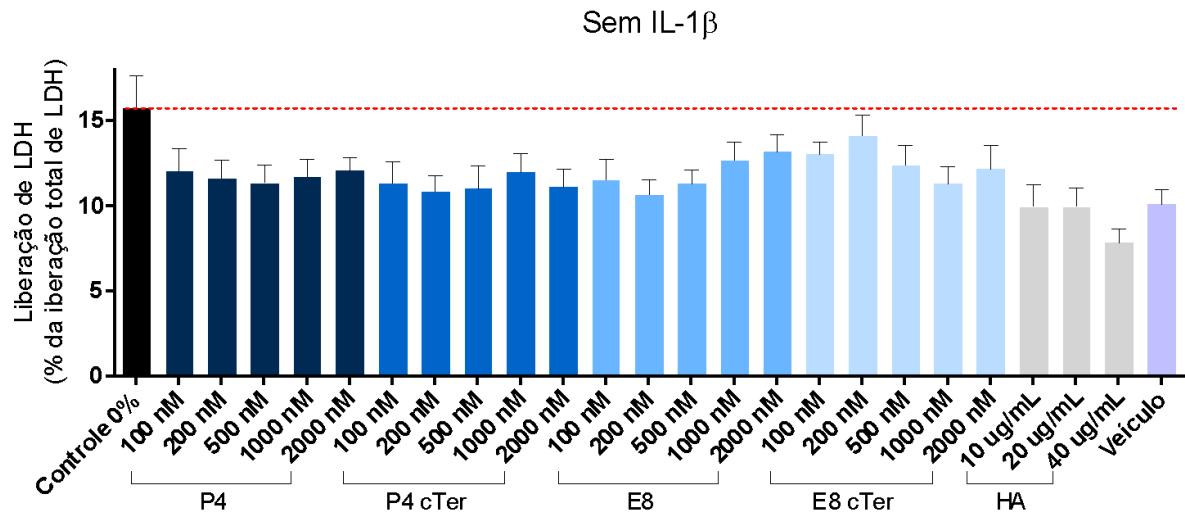


Figura 6. Liberação de LDH dos condrócitos no tratamento com peptídeos em diferentes concentrações. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (os valores obtidos não possuem valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle (linha vermelha pontilhada), *test t*, n=9).

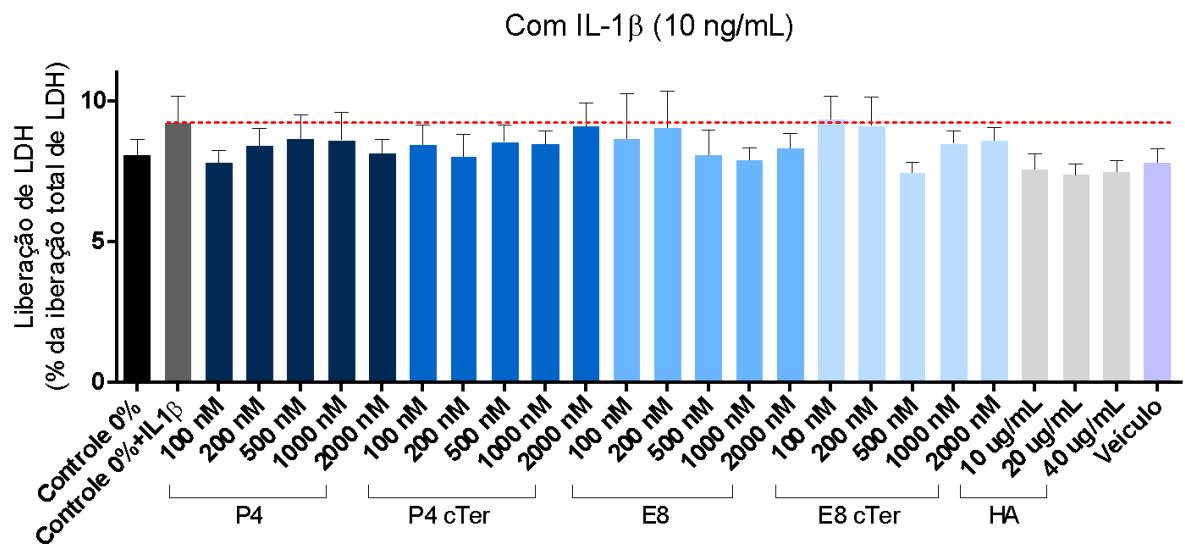


Figura 7. Liberação de LDH dos condrócitos no tratamento com IL-1 β (10 ng/mL) e peptídeos em diferentes concentrações. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (os valores obtidos não possuem valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle com IL- β (linha vermelha pontilhada), *test t*, n=9).

3.2 MODIFICAÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AOS TRATAMENTOS

3.2.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEIAS PARA O TRATAMENTO PARA O ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA HIGH-CONTENT SCREENING

A padronização das condições ideias foi determinada a partir da análise de translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF- κ B (p65), indicando qual a concentração ideal de SFB para os tratamentos, assim como a concentração ideal de IL-1 β .

A partir do resultado obtido da contagem celular, foi possível determinar que a suplementação de SFB ideal é 1%, bem como 1 ng/mL é a concentração ideal para a indução de inflamação por IL-1 β para o modelo celular utilizado (Figura 8).

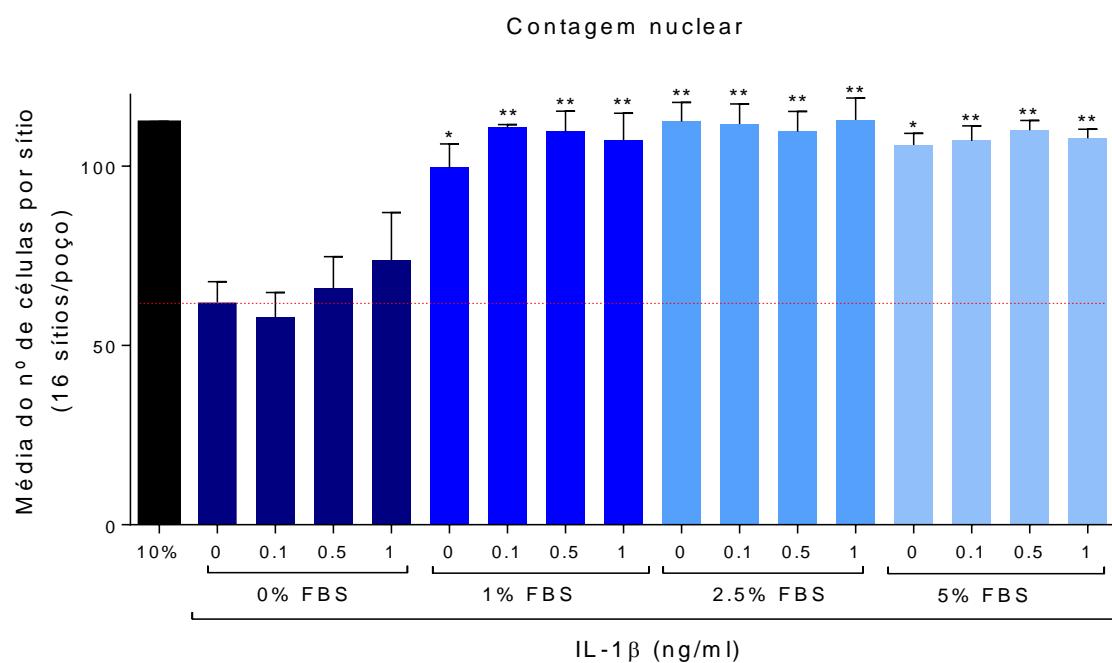


Figura 8. Média do número de células no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β . As concentrações de SFB e IL-1 β estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* $p<0.05$ e ** $p<0.01$ quando comparados ao tratamento sem IL-1 β e sem suplementação de soro, t -test, $n=3$). A linha vermelha pontilhada representa o número mínimo de células por sítio requeridas para uma ótima análise.

Foram avaliados dois tempos de tratamento para determinar qual o tempo ideal para translocação de NF-κB após a adição de IL-1β. Essa padronização do tempo é importante para que a avaliação dos efeitos do tratamento com os peptídeos em relação à translocação seja mais precisa. As células foram previamente incubadas por 2h na concentração de SFB indicado nas Figuras 9 e 10, na presença ou ausência de diversas concentrações de IL-1β. As células que ficaram por duas horas na ausência de SFB, foram tratadas com diversas concentrações de IL-1β durante 30 minutos. Assim, algumas células ficaram em contato durante 2,5 h ou 30 min com a IL-1β.

Os resultados mostraram que a translocação nuclear de NF-κB foi melhor quando a IL-1 β está em contato com os condrócitos durante 30 min em comparação com o tratamento das células que ficaram no contato da IL-1β durante 2,5 horas (Figura 9 e 10). Na Figura 9, pode se observar que após 30 minutos de tratamento com 1 ng/mL de IL-1β na ausência de SFB a translocação de NF-κB foi de aproximadamente 60%, no entanto a morfologia e o número das células foi afetada pela ausência de soro (Figura 8). Já na presença de 1% de SFB e 1 ng/mL de IL-1β houve uma translocação de aproximadamente 40%, sendo que nessas condições as células mostraram-se menos estressadas (Figura 11) e com o número de células sem modificação (Figura 8).

Portanto, as melhores condições para o estudo de translocação de NF-κB em condrócitos foi determinado por ser na presença de 1% de SFB e 30 min de incubação com 1 ng/mL de IL-1β (Figura 11).

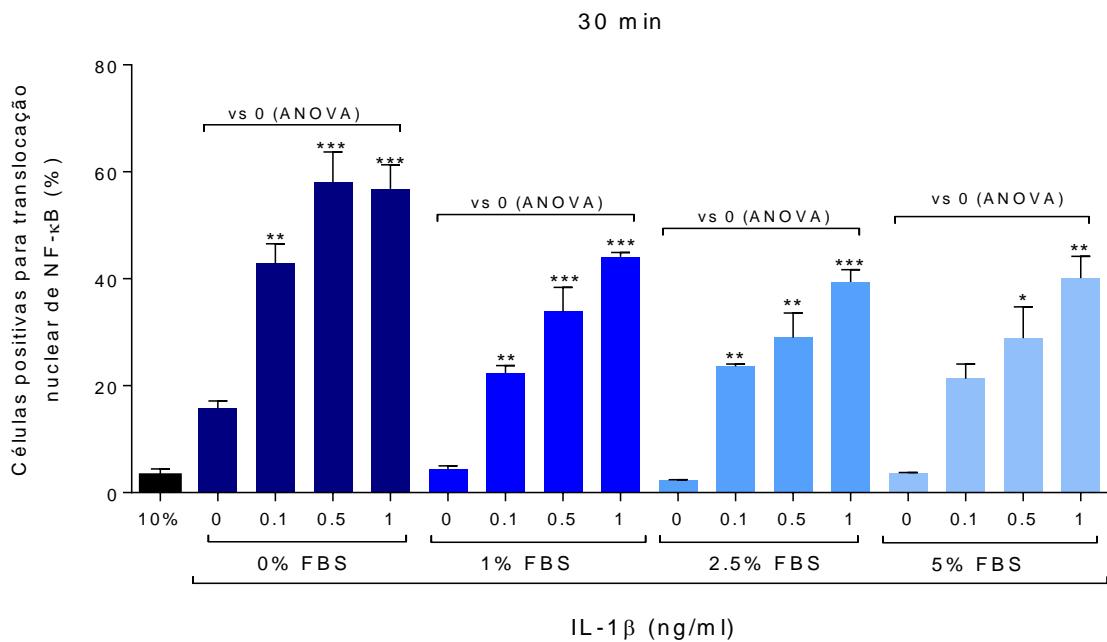


Figura 9. Translocação nuclear de NF-κB (p65) no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β por 30 min. As concentrações de SFB e IL-1 β estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0.001, ANOVA, n=3).

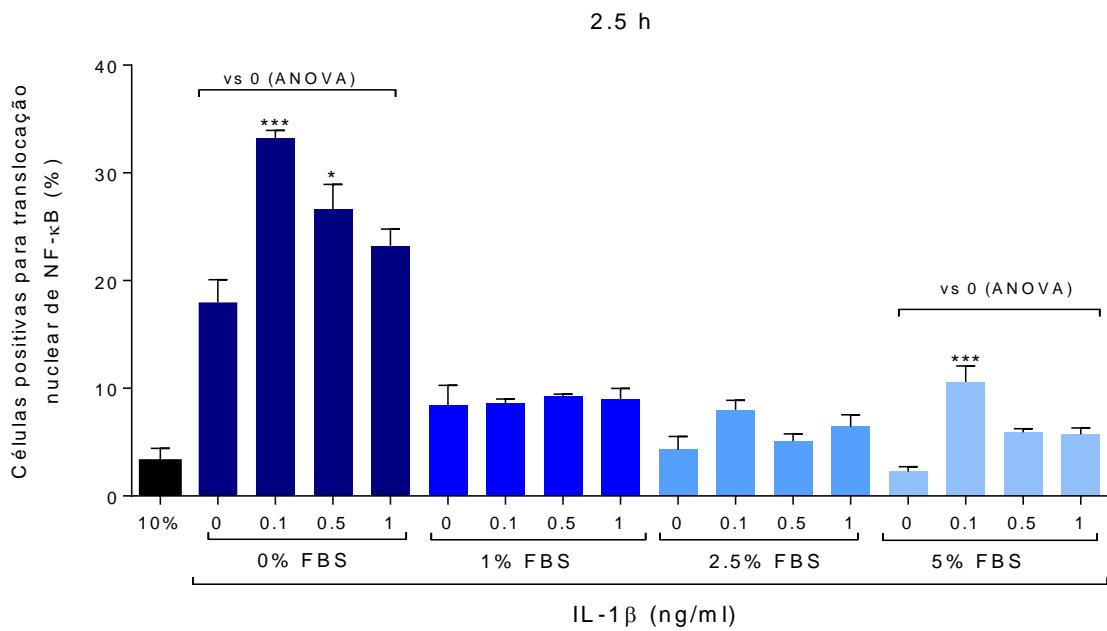


Figura 10. Translocação nuclear de NF-κB (p65) no tratamento com diferentes concentrações de SFB e IL-1 β por 2.5 horas. As concentrações de SFB e IL-1 β estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0.001, ANOVA, n=3).

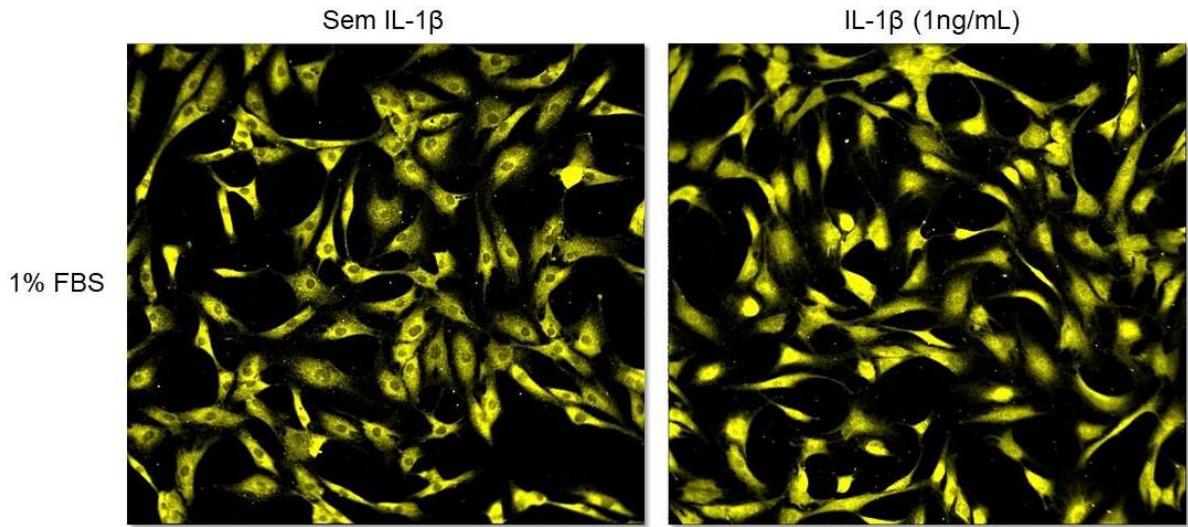


Figura 11. Translocação de NF-κB em condrócitos tratados com 1 ng/mL de IL-1β por 30 minutos na presença de 1% SFB. Na esquerda, células não estimuladas mostrando o citoplasma contendo o NF-κB. Na direita, células estimuladas com IL-1β durante 30 min na presença de 1% SFB mostram a translocação do NF-κB do citoplasma ao núcleo. Aumento de 20X.

3.2.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS PEPTÍDEOS NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DO NF-κB

Definidas as condições do tratamento de condrócitos com IL-1β para avaliação de translocação do NF-κB (p65), o ensaio com as moléculas de interesse foi realizado. Foram obtidos dois resultados, a contagem celular e a porcentagem de células classificadas como positivas para translocação nuclear do NF-κB.

Em relação a contagem nuclear, é possível observar que os valores são mantidos, tanto nos controles quanto nos tratamentos com as moléculas (Figura 12), mostrando que o número de células não é alterado pela presença da IL-1β ou dos peptídeos.

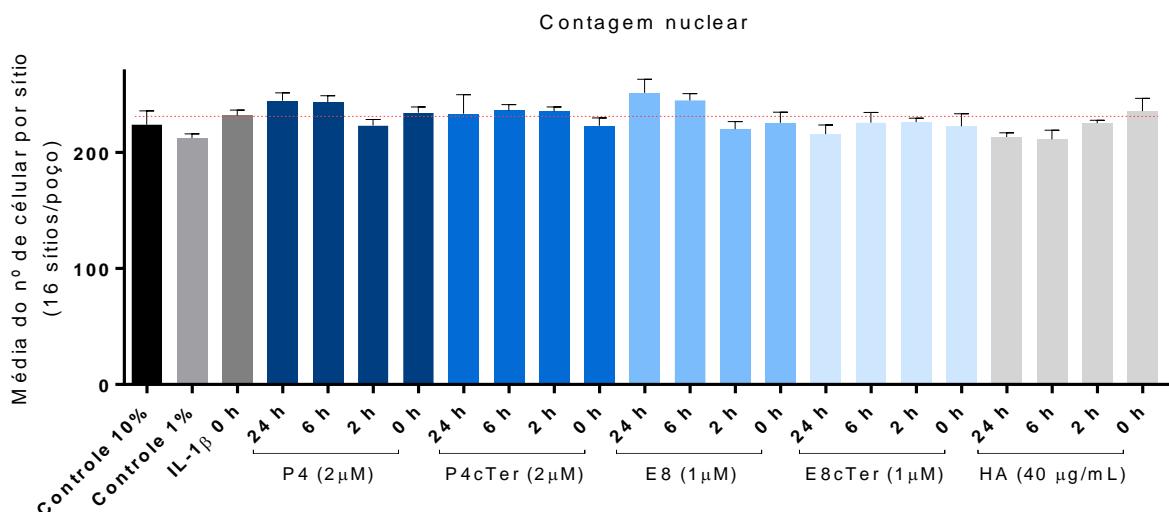


Figura 12. Média do número de células por sítio com o tratamento com os peptídeos e IL-1 β (1 ng/mL) nos diferentes tempos. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (os valores obtidos não possuem valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle 1%, linha vermelha pontilhada, *test t*, n=3).

O resultado do ensaio mostra que para todos os peptídeos a porcentagem de células consideradas positivas para translocação nuclear do NF- κ B em comparação ao controle com IL-1 β ou se mantém ou aumenta, com exceção do E8cTer que reduziu a translocação de NF- κ B após 6 horas de pré-incubação (Figura 13).

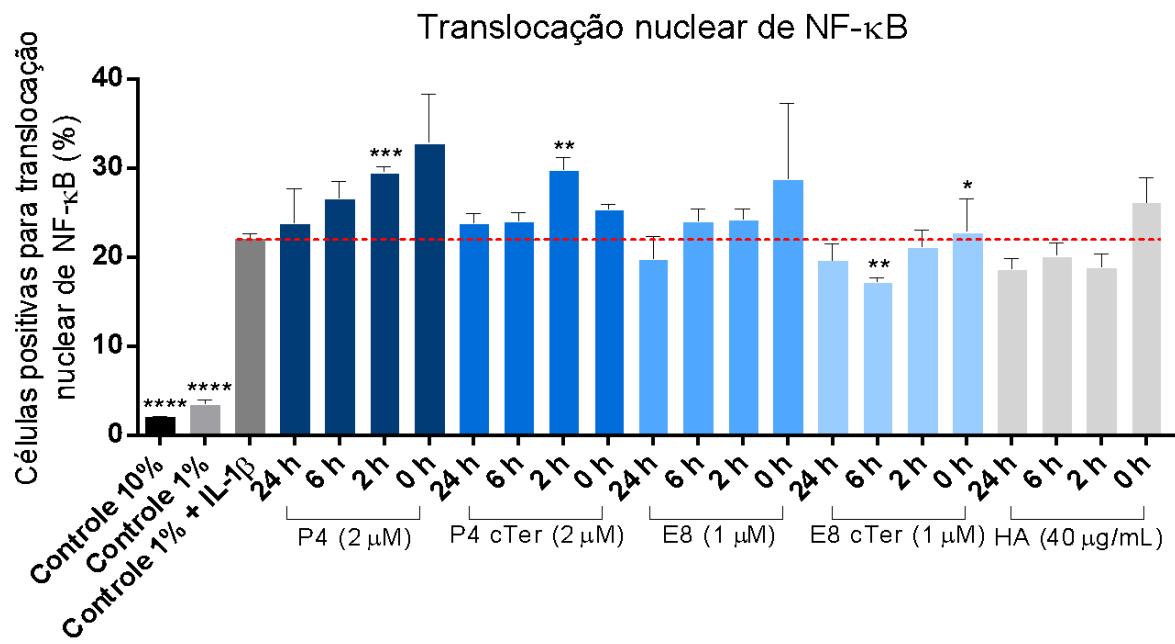


Figura 13. Translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65) no tratamento em diferentes tempos com os peptídeos. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p < 0,05; ** p < 0,001, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 quando comparados ao controle com IL-1 β , linha vermelha pontilhada, test t, n=3).

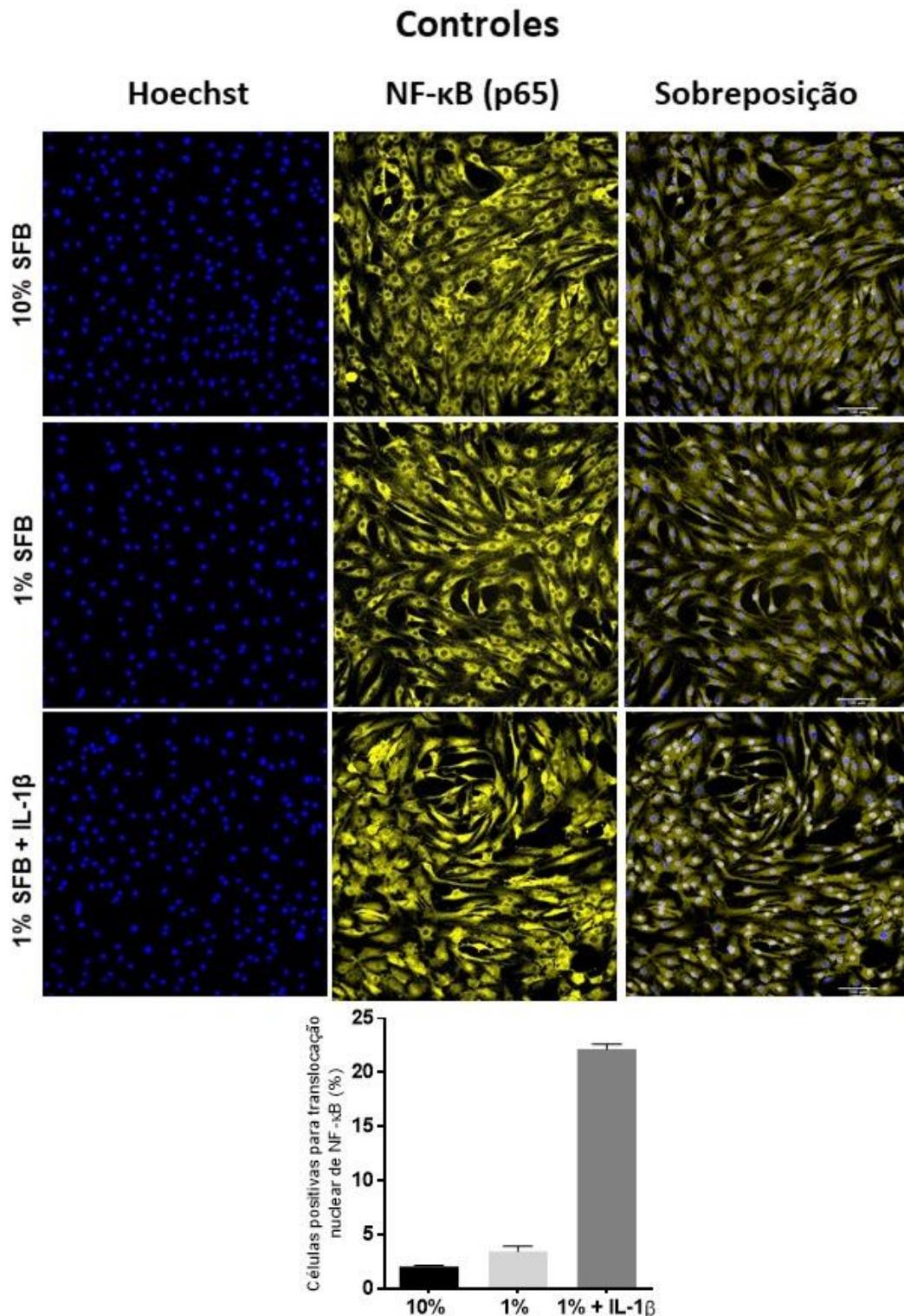


Figura 14. Translocação de NF-κB (p65) em diferentes concentrações de SFB na presença e ausência de IL-1β. Imagens dos tratamentos com suplementação de 1 e 10% de SFB em meio DMEM durante o período de 24 horas e IL-1β (1 ng/mL) por 30 minutos sobre a translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB (p65). Aumento 20X. Barra de calibração: 100 µm.

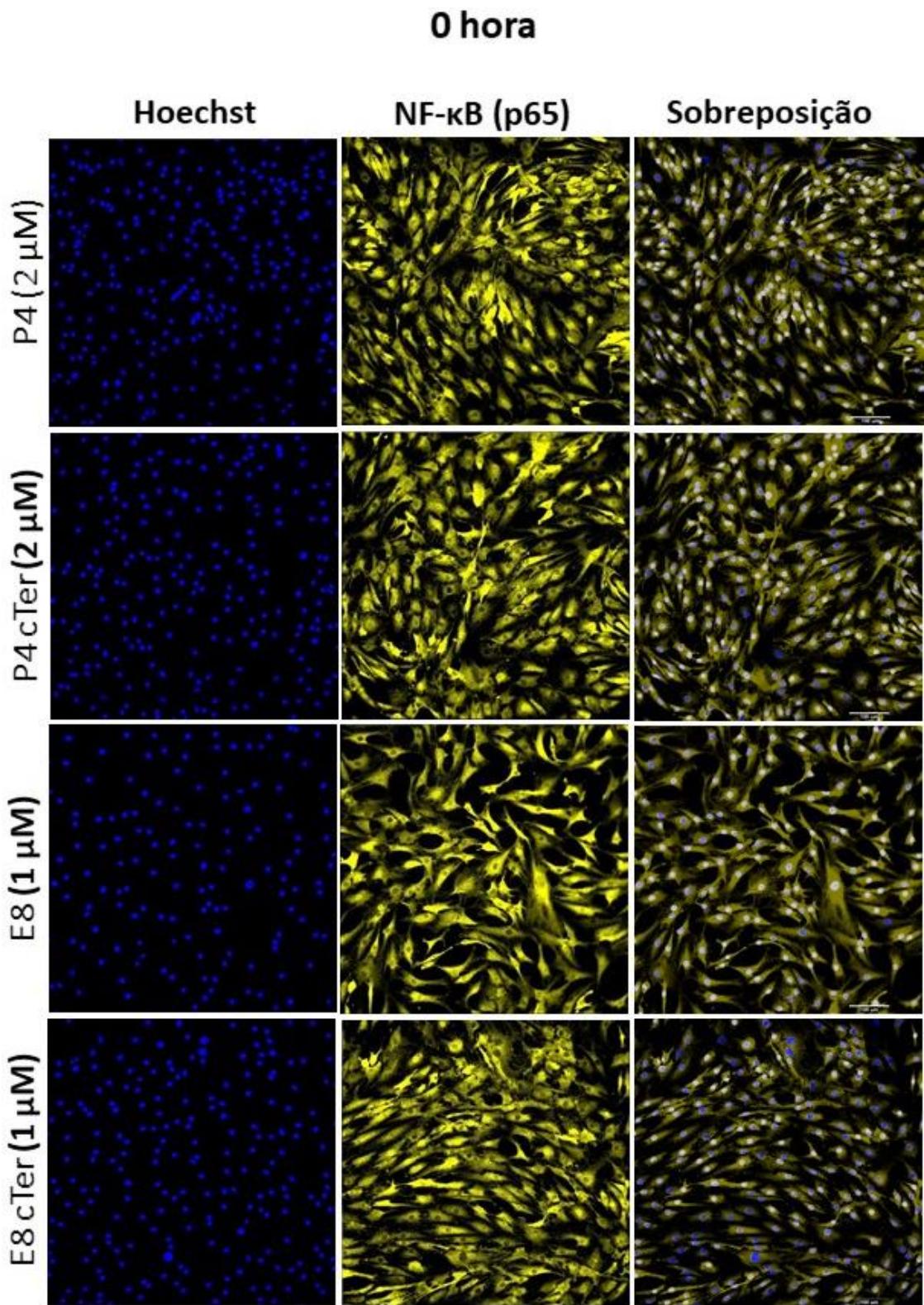


Figura 15. Translocação de NF-κB (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1β no tempo 0 hora. Imagens dos tratamentos com os peptídeos e IL-1β (1 ng/mL) por 30 minutos e o efeito sobre a translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB (p65). Aumento 20X. Barra de calibração: 100 µm.

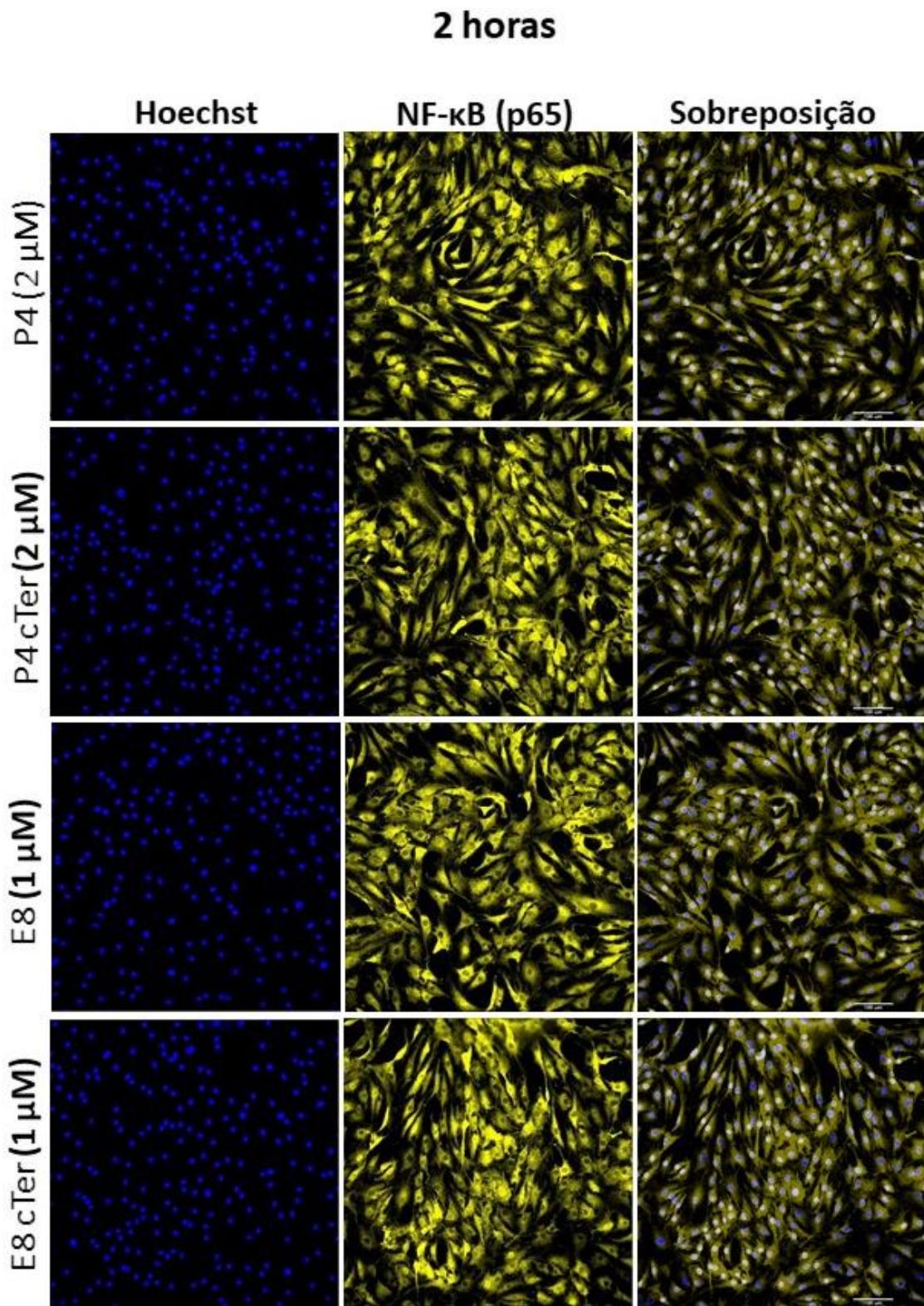


Figura 16. Translocação de NF-κB (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1β no tempo 2 horas. Imagens dos pré-tratamentos com os peptídeos no tempo 2 horas antes da aplicação de IL-1β (1 ng/mL) por 30 minutos e análise da translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB (p65).

Aumento 20X. Barra de calibração: 100 µm.

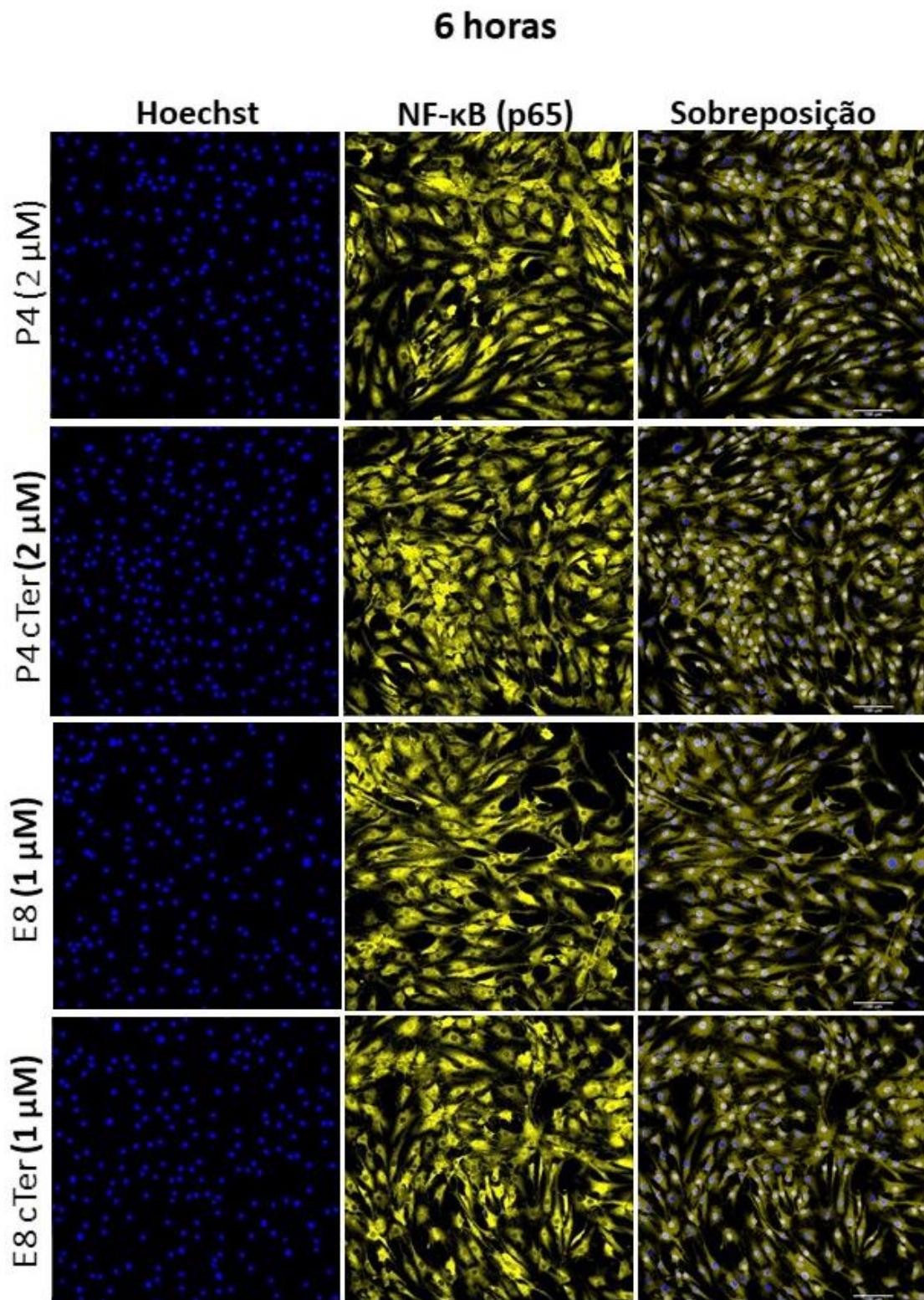


Figura 17. Translocação de NF-κB (p65) após o tratamento com os peptídeos e IL-1 β no tempo 6 horas. Imagens dos pré-tratamentos com os peptídeos no tempo 6 horas antes da aplicação e IL-1 β (1 ng/mL) por 30 minutos e análise da translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB (p65).

Aumento 20X. Barra de calibração: 100 µm.

3.2.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS PEPTÍDEOS NA EXPRESSÃO DE MMP-1

A expressão de MMP-1 foi avaliada após 24h de incubação com os peptídeos, através do nível da intensidade média de fluorescência por célula, assim como também foi obtida a contagem nuclear. Esses parâmetros foram avaliados tanto para os peptídeos quanto para a proteína rLopap. A expressão de MMP-1 por células não foi alterada pelos tratamentos com os peptídeos no período de 24 horas, tanto na ausência quanto na presença de IL-1 β (1 ng/mL) (Figura 14 e 15). No entanto, é possível observar nas imagens de fluorescência que o padrão de marcação das células não estimuladas com IL-1 β apresentam-se mais na região perinuclear. No entanto, na presença de 1ng/mL de IL-1 β , a marcação das células é mais espalhada, sugerindo que a análise quantitativa deve ser revista para considerar este efeito e não somente a intensidade de fluorescência.

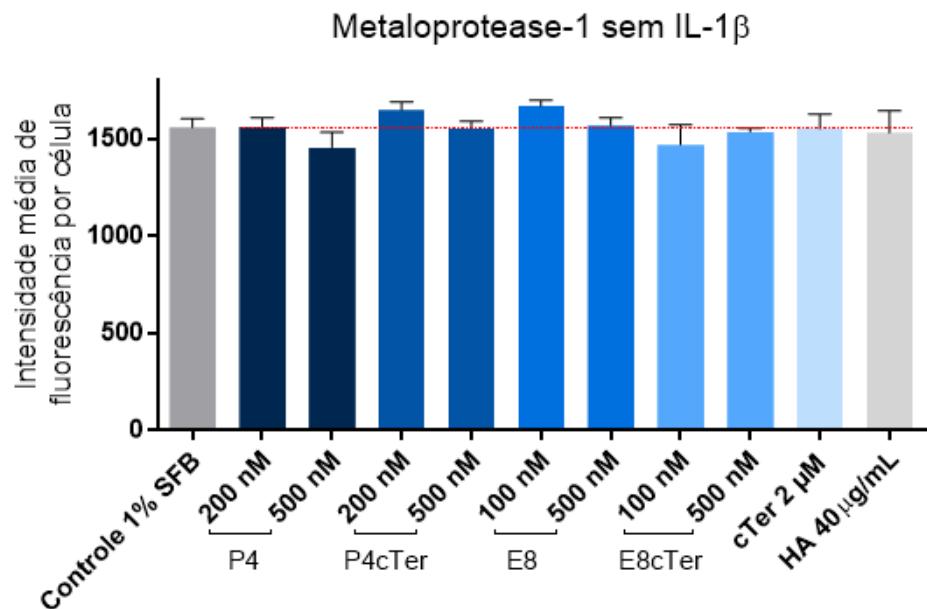


Figura 18. Expressão de metaloprotease-1 no tratamento em 24 horas com os peptídeos. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média ± EPM (os valores obtidos não possuem valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle, linha vermelha pontilhada, *test t*, n=3).

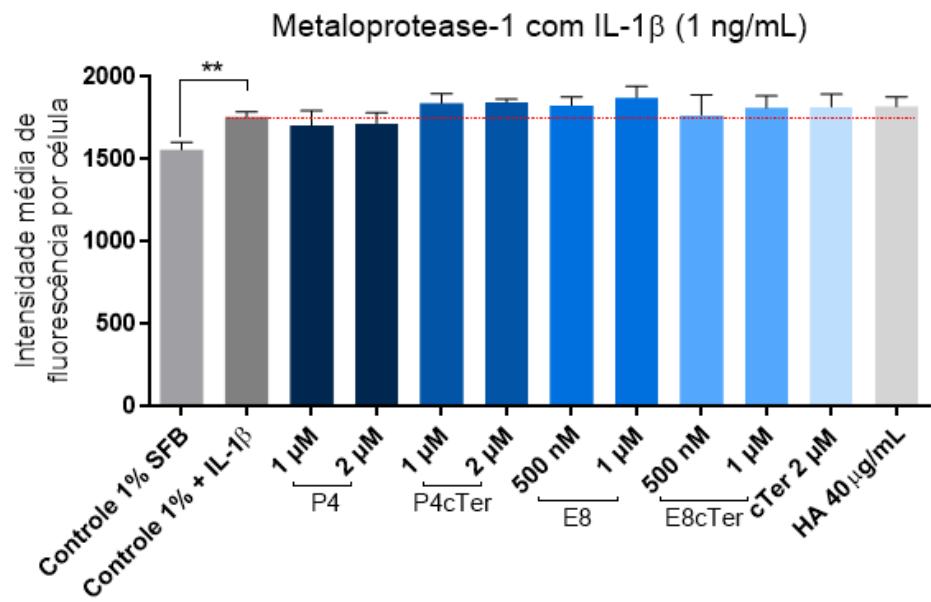


Figura 19. Expressão de metaloprotease-1 no tratamento em 24 horas com os peptídeos na presença de IL-1 β (1 ng/mL). Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM comparados ao controle (linha vermelha pontilhada) (** p < 0,001, test t, n=3).

A contagem nuclear mostra que o número de células também não foi alterado pelos tratamentos nas duas diferentes condições dentro do período de 24 horas (Figura 16).

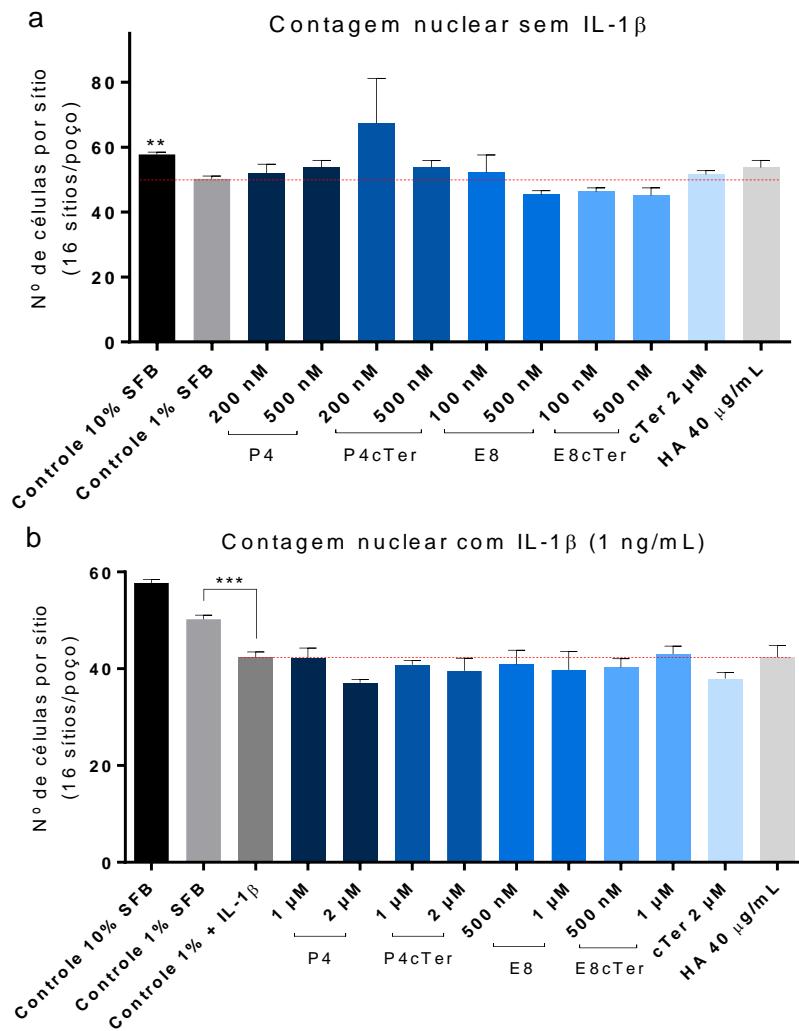


Figura 20. Média do número de células por sítio no tratamento com peptídeos na presença e ausência de IL-1 β . a) número de células por sítio após 24 horas do tratamento com os peptídeos na ausência de IL-1 β . b) número de células por sítio após 24 horas do tratamento com os peptídeos na presença de IL- β (1 ng/mL). Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM comparados ao respectivo controle (linha vermelha pontilhada) (** p < 0,001, test t, n=3).

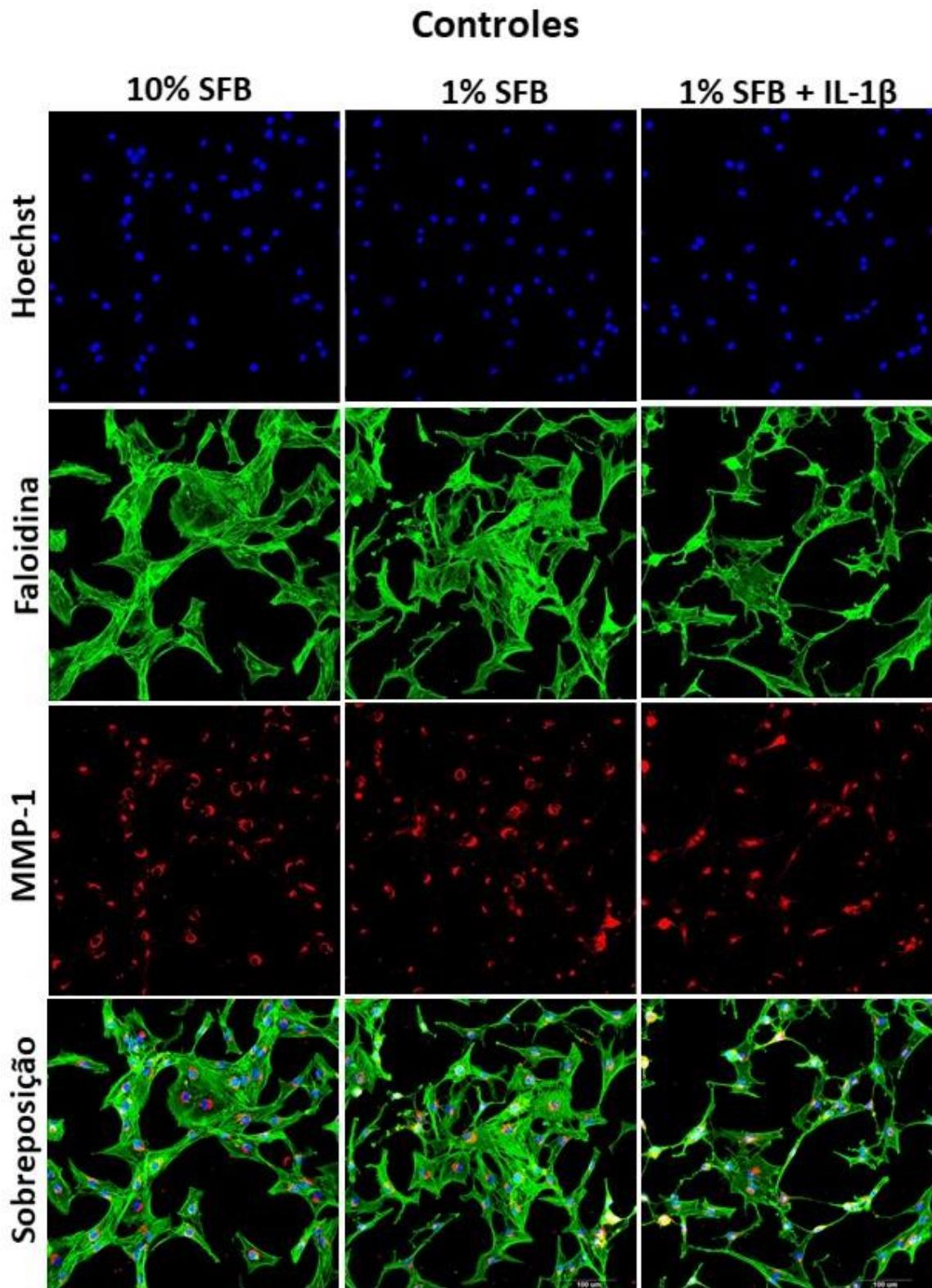


Figura 21. Expressão de MMP-1 em diferentes concentrações de SFB na presença e ausência de IL-1 β . Imagens representativas da expressão de MMP-1 a partir dos tratamentos com suplementação de 1 e 10% de SFB e IL-1 β (1 ng/mL) em meio DMEM durante o período de 24 horas. Aumento 20X. Barra de calibração: 100 μ m.

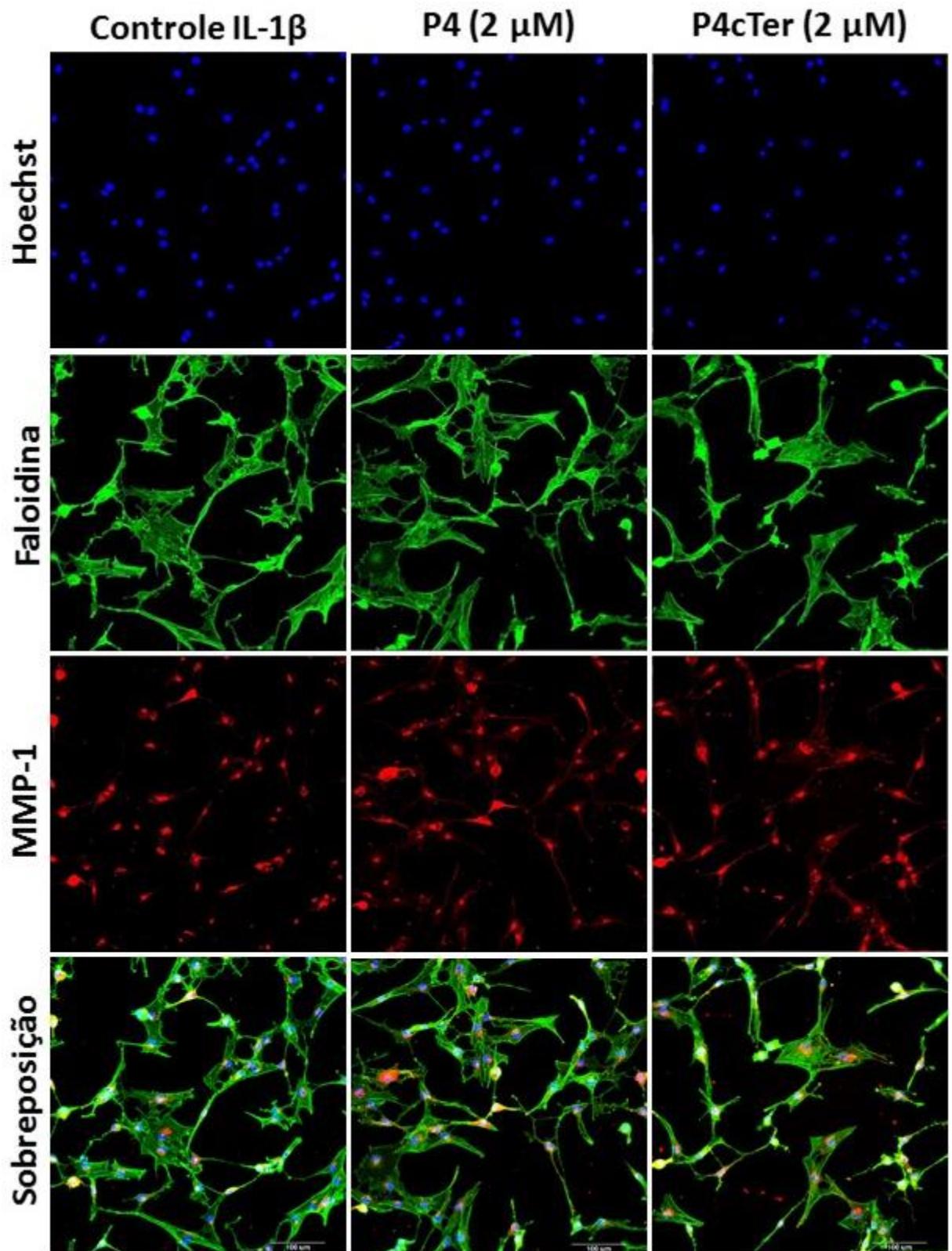


Figura 22. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com P4 e P4cTer na presença de IL-1 β .

Imagens representativas da expressão de MMP-1 a partir dos tratamentos com os peptídeos P4 e P4cTer e IL-1 β (1 ng/mL) em meio DMEM durante o período de 24 horas. Aumento 20X. Barra de calibração: 100 μ m.

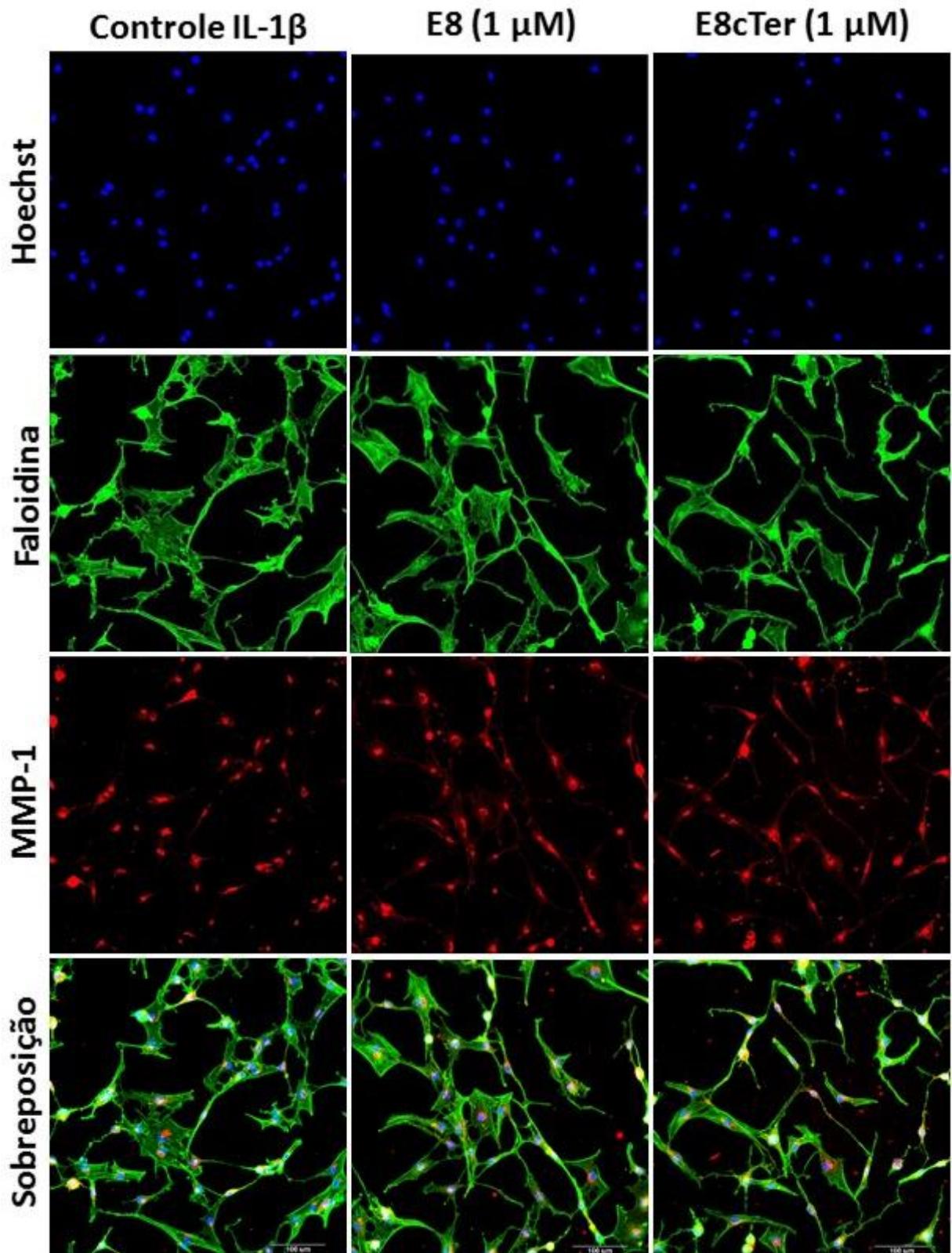


Figura 23. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com E8 e E8cTer na presença de IL-1 β .
Imagens representativas da expressão de MMP-1 a partir dos tratamentos com os peptídeos E8 e E8cTer e IL-1 β (1 ng/mL) em meio DMEM durante o período de 24 horas. Aumento 20X. Barra de calibração: 100 μ m.

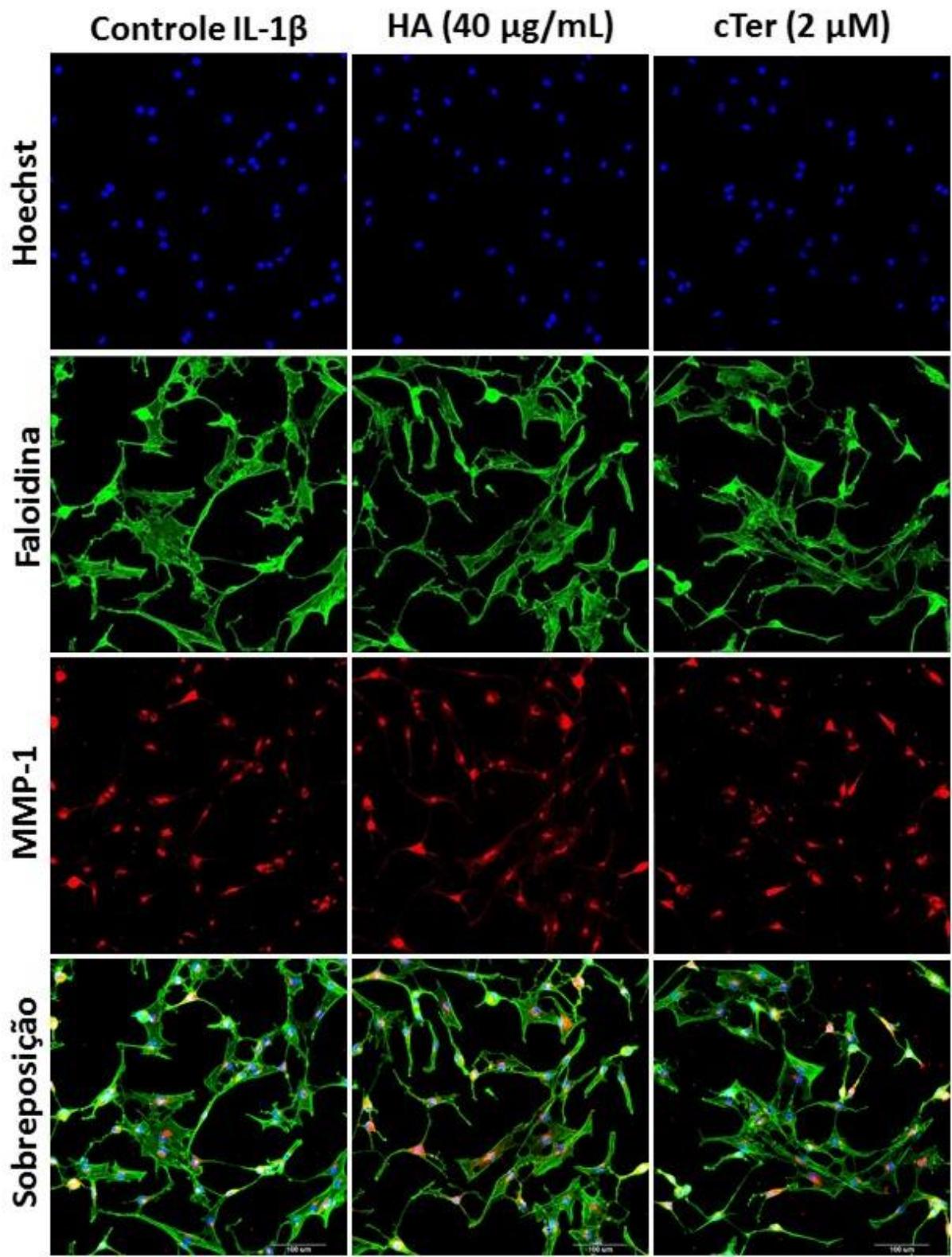


Figura 24. Expressão de MMP-1 sob o tratamento com ácido hialurônico e cTer na presença de IL-1 β . Imagens representativas da expressão de MMP-1 a partir dos tratamentos com ácido hialurônico e cTer e IL-1 β (1 ng/mL) em meio DMEM durante o período de 24 horas. Aumento 20X. Barra de calibração: 100 μm .

O Lopap mostrou efeito na expressão de MMP-1 apenas na concentração de 1000 nM, aumentando-a significativamente no tratamento sem IL-1 β durante 24 horas. A contagem nuclear também se manteve em todas as concentrações em comparação ao controle (Figura 17).

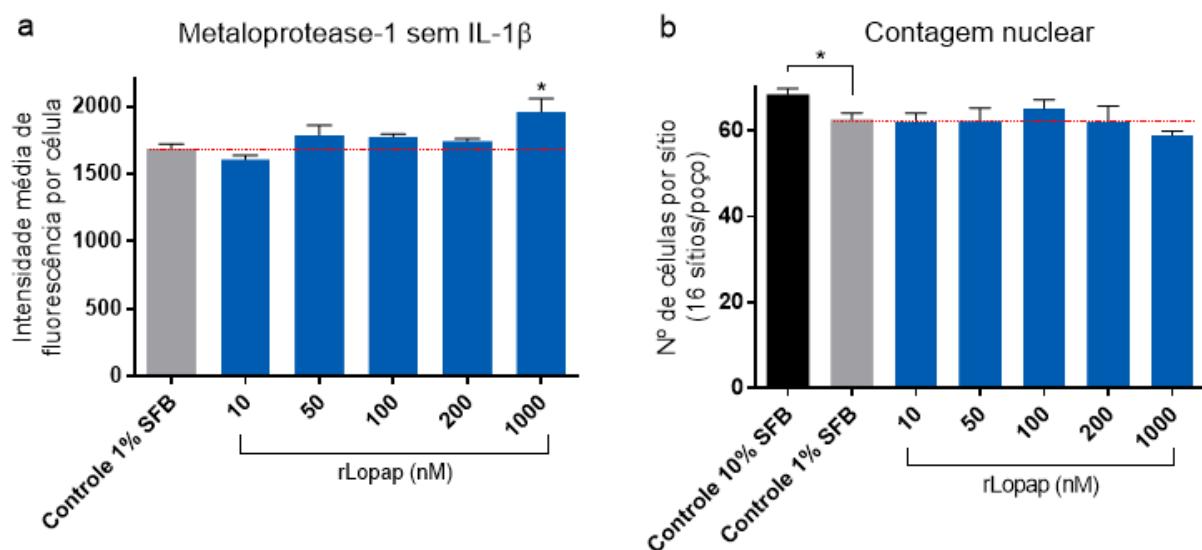


Figura 25. Efeito do Lopap em diferentes concentrações sem IL-1 β em 24 horas. a) efeito do rLopap em 5 diferentes concentrações sobre a expressão de MMP-1 dentro do período de 24 horas. b) número de células por sítio após 24 horas do tratamento com rLopap em 5 diferentes concentrações. Os peptídeos e suas respectivas concentrações estão indicadas na figura. Os dados estão apresentados como a média \pm EPM comparados ao respectivo controle (linha vermelha pontilhada) (* p<0.05, test t, n=3).

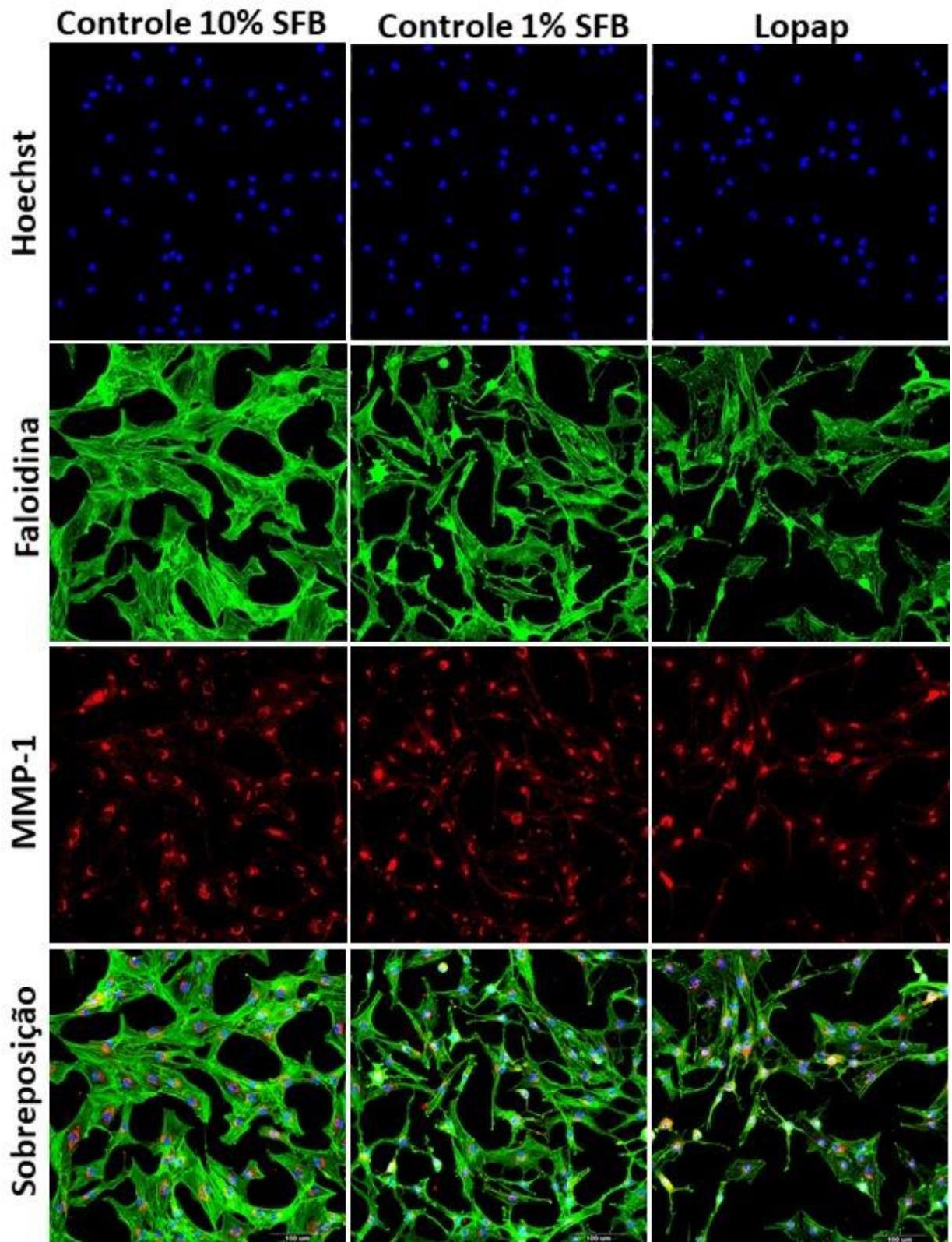


Figura 26. Expressão de MMP-1 em diferentes concentrações de suplementação com SFB e Lopap. Imagens representativas da expressão de MMP-1 a partir dos tratamentos com suplementação de 1 e 10% de SFB em meio DMEM e rLopap por 24 horas. Aumento 20X. Barra de calibração: 100 μ m.

3.3 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA PRESENÇA DE CITOQUINAS AVALIADO POR IMUNOENSAIO UTILIZANDO A TECNOLOGIA MULTIPLEX

A identificação e análise quantitativa das citocinas presentes no sobrenadante do tratamento com peptídeos foi realizada utilizando a tecnologia Luminex xMAP. O resultado obtido do controle de qualidade está dentro dos valores estabelecidos pelo protocolo do fabricante. Foram avaliados 24 analitos, dos quais apenas 10 demonstraram alteração na presença de 1ng/mL de IL-1 β (Quadro 4).

Analito	Controle de qualidade (pg/mL)		IL-1 β (1ng/mL)
	Controle 1	Controle 2	
1 EGF	161,18	851,32	-
2 FGF-2	128,92	621,87	-
3 TGF- α	137,96	835,44	-
4 G-CSF	150,98	719,21	-
5 GM-CSF	159,72	755,29	+
6 IFN- α 2	138,79	737,95	-
7 IFN-Gama	155,33	677,19	+
8 IL-10	182,78	762,51	-
9 MCP-3	153,21	682,49	+
10 IL-12P70	146,66	692,71	-
11 CD40L	126,73	729,56	-
12 IL-17A	145,31	732,29	-
13 IL-1 α	157,69	761,65	-
14 IL-1 β	160,14	844,52	+
15 IL-2	146,5	747,49	-
16 IL-4	134,05	706,23	-
17 IL-6	134,83	676,07	+
18 IL-8	165,62	753,13	+
19 IP-10	153,02	604,14	+
20 MCP-1	199,27	749,08	+
21 MIP-1 α	174,91	1275	+
22 MIP-1 β	161,34	744,21	-
23 TNF- α	142,66	678,43	+
24 TNF- β	132,55	738,75	-

Quadro 4. Analitos avaliados pela tecnologia de multiplex. Valores obtidos em pg/mL pelos controles de qualidade de cada analito, marcado com (-) estão os analitos que não apresentaram diferença entre os controles dos tratamentos sem e com IL-1 β e com (+) os positivos.

Dos analitos que demonstraram alteração na presença de citocina, alguns merecem destaque uma vez que também têm sua presença alterada a partir do tratamento com os peptídeos: G-CSF, GM-CSF, INF- γ , MCP-3, IL-1 β , IP-10, MIP-1 α e TNF- α (Quadro 5).

Analito	Controle	IL-1 β (1ng/mL)	IL-1 β (1ng/mL)				
			P4 (2 μ M)	P4cTer (2 μ M)	E8 (1 μ M)	E8cTer (1 μ M)	HA (40 μ g/mL)
1 G-CSF	4,04	5,9 \pm 0,9	7,25 \pm 0,44	6,75 \pm 1,55	* 71,36 \pm 1,68	* 203,7 \pm 20,27	4,04
2 GM-CSF	<2.14↓	29,59 \pm 3,31	20,24 \pm 0,8	32,22 \pm 1,14	* 11,73 \pm 0,36	24,83 \pm 4,17	* 10,36 \pm 0,5
3 IFN-gama	<0,76↓	7,48 \pm 3,2	1,3 \pm 0,26	3,42 \pm 0,42	<0,76↓	1,72 \pm 0,3	1,72 \pm 0,27
4 MCP-3	2,74	17,3 \pm 4,53	7,62 \pm 0,14	22,8 \pm 2,43	<2,37↓	<2,37↓	6,84 \pm 1,23
5 IL-1 β	4,04	4,68 \pm 0,87	3,08 \pm 0,05	4,1 \pm 0,26	<2,54↓	* 2,99 \pm 0,19	<2,54↓
6 IL-6	5,9 \pm 0,88	4600 \pm 1200,46	2203,33 \pm 38,23	4683 \pm 49,75	1330,33 \pm 47,74	3468,33 \pm 480,8	1403 \pm 135,66
7 IL-8	<2,69↓	271,6 \pm 68,47	108,2 \pm 8,54	488,8 \pm 18,05	8,11 \pm 0,62	62,71 \pm 4,07	77,02 \pm 15,92
8 IP-10	<2,88↓	15,16 \pm 3,91	6,37 \pm 0,65	25,30 \pm 2,55	<2,88↓	3,95 \pm 0,34	6,54 \pm 1,43
9 MCP-1	360,31 \pm 45,87	5024 \pm 441	5426 \pm 205,4	5532 \pm 485,3	4173,33 \pm 112	5151 \pm 242,45	4738 \pm 272,47
10 MIP-1 α	<3,02↓	6,31 \pm 0,07	4,47 \pm 0,5	* 11,63 \pm 0,44	<3,02↓	6,39 \pm 0,44	<3,02↓
11 TNF- α	<2,61↓	66,95 \pm 9,7	31,06 \pm 0,7	76,2 \pm 4,06	* 13,83 \pm 1,31	50,82 \pm 4,81	* 16,63 \pm 1,63

Quadro 5. Valores obtidos de cada analito em pg/mL a partir do tratamento com os peptídeos na presença de IL-1 β (1 ng/mL). Os dados estão apresentados como a média \pm EPM (* p<0,05 quando comparado ao controle com IL-1 β , test t, n=3).

4 DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DOS PEPTÍDEOS E DO LOPAP NA VIABILIDADE CELULAR DE CONDRÓCITOS

O presente estudo mostrou, por meio do ensaio de viabilidade por MTT, que os peptídeos P4, P4cTer, E8 e E8cTer possuem efeito citoprotetor sobre os condróцитos humanos, inclusive na condição de inflamação induzida pela IL-1 β nas concentrações de 1 e 10 ng/mL, aumentando a viabilidade celular. Os peptídeos estudados estão diluídos em H₂O, esta representando até 5% do volume do meio utilizado no tratamento. O ensaio de viabilidade celular também avaliou o efeito da H₂O e o resultado comprovou que a concentração de máxima de H₂O presente nos tratamentos não é capaz de induzir alterações no modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β .

Estudos prévios demonstraram que o Lopap purificado da *L. obliqua*, bem como a proteína recombinante (rLopap), promovem citoproteção além de aumentar a expressão de moléculas de adesão envolvidas no processo inflamatório (FRITZEN et al., 2005, WAISMAN et al., 2009). Em concordância com a literatura, neste trabalho a proteína rLopap apresentou efeito citoprotetor, promovendo o aumento da viabilidade celular apenas com a concentração de 50 nM na condição sem IL-1 β . Uma observação interessante foi que os controles tradados na ausência ou na presença de IL-1 β não apresentaram diferença estatisticamente significante quando avaliado pelo método do MTT (Figura 2). Diferente do observado por outros métodos, onde a presença de 1 ng/mL de IL-1 β induz a translocação de NF- κ B (Figura 14) e a liberação significativa de citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-6 e IL-8 (Quadro 5). O resultado dos controles obtido pelo método de MTT pode ser explicado, uma vez que o ensaio mede a viabilidade por meio da avaliação da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial. Assim, pode não ser um método apropriado para o estudo do modelo inflamatório de condrócitos.

Outro método de avaliar a viabilidade celular é por meio da verificação da liberação de LDH. Os valores obtidos no presente trabalho evidenciaram que os

peptídeos são capazes de reduzir a liberação de LDH. No entanto, esses valores não possuem significância estatística, assim sendo, não é possível afirmar que existe um efeito dos peptídeos sobre o tratamento. Assim, com base nos resultados obtidos pelos ensaios de MTT, é sugerido que o ensaio de viabilidade celular por LDH também não é um método adequado para avaliação neste modelo.

4.2 CONDIÇÕES IDEAIS PARA O TRATAMENTO PARA O ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA HIGH-CONTENT SCREENING

As condições ideais para o tratamento para o ensaio de imunofluorescência para HCS foram determinadas por meio da análise de translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65).

O NF-κB é considerado uma via de sinalização pró-inflamatória e sua ativação é dada por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α), além de uma via alternativa, a CD40L (LAWRENCE, 2009). A IL-1 se liga ao seu receptor, levando à ativação da quinase indutora de NF-κB (NIK), a qual ativa o complexo inibidor de quinase KB (IKK), o que leva a degradação de inibidores celulares. Essa degradação permite o NF-κB se translocar para o núcleo e transativar os promotores de MMPs (VINCENTI *et al.*, 2001).

Para tanto, foram testadas quatro diferentes concentrações para IL-1β e SFB. No grupo cultivado na ausência de SFB a contagem celular demonstrou uma redução no número de células em comparação ao controle de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Por outro lado, os grupos cultivados com meio suplementado com 1, 2,5 e 5% de SFB, não apresentaram variação no número de células, sendo similar ao controle 10% SFB, independente da concentração de IL-1β (Figura 8).

Além da contagem nuclear, foi determinada a concentração ideal de IL-1β para indução da translocação de NF-κB, avaliando-se também dois tempos de incubação: 30 minutos e 2,5 horas. Na ausência de SFB a translocação aumenta significativamente nos dois tempos (Figura 8 e 9), porém, como indicado no parágrafo anterior, esta condição de ausência de soro reduz o número de células. Por outro lado, nas condições de cultivo com suplementação de 1, 2,5, e 5% de SFB a translocação

nuclear do NF-κB é similar e estatisticamente significativa apenas no tempo de 30 min (Figura 8). O tempo ideal para a indução da translocação de NF-κB foi determinado em 30 minutos.

Finalmente, a condição ideal para o tratamento de condrócitos no modelo inflamatório foi determinada em 1% de SFB e 1 ng/mL para IL-1β para aplicação no ensaio de imunofluorescência para *High Content Screening*. A padronização do modelo celular utilizado para análise da translocação de NF-κB é essencial para possibilitar a realização de *screening* de diversas moléculas simultaneamente pelo HCS, obtendo resultados mais precisos por utilizar o mesmo modelo celular.

4.3 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DO NF-κB E EXPRESSÃO DE MMP-1

As metaloproteases (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação da MEC, sendo que a MMP-1 é ativada pela MMP-3 e é responsável por clivar uma ampla gama de proteínas da matriz, principalmente os colágenos intersticiais dos tipos I, II e III. Uma importante via de sinalização para ativação de MMPs envolve a translocação de NF-κB do citoplasma para o núcleo (VINCENTI *et al.*, 2001).

O presente estudo mostra que pela análise da intensidade de fluorescência, os quatro peptídeos avaliados não possuem efeito sobre expressão de MMP-1 nos condrócitos no período de 24 horas tanto na ausência quanto presença de IL-1β (1 ng/mL), enquanto o Lopap aumenta a expressão apenas na concentração de 1000 nM, isto sem o efeito da IL-1β. No entanto, pode se observar que o padrão de marcação de MMP-1 em células não estimuladas com IL-1β mostram um padrão perinuclear, enquanto que as células estimuladas com IL-1β tem um padrão mais espraiado, sugerindo que há uma modulação na localização da MMP-1 mais do que a intensidade de fluorescência. Considerando a localização subcelular e as mudanças de expressão de MMP1 frente aos tratamentos dos condrócitos no tempo de 24h, uma nova estratégia de análise será utilizada para quantificar esta molécula. Esta nova abordagem de análise será direcionada à quantificação de MMP1 no contexto da sua

expressão perinuclear, através do delineamento de parâmetros de análise que privilegiem as mudanças da expressão e localização intra-celular da proteína.

Complementando, o trabalho também mostrou o efeito dos peptídeos e do Lopap sobre a translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65). Foi observado que os peptídeos P4 e P4cTer aumentam a translocação em todos os períodos de pré incubação estudados, enquanto E8 reduz apenas no tratamento de pré incubação do peptídeo por 24 horas e E8cTer reduz a translocação quando é pré incubado e aumenta a translocação quando adicionado simultaneamente a IL-1β.

Uma vez que os peptídeos são capazes de alterar a translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65), é esperado observar uma alteração na expressão de metaloprotease-1, o que não foi obtido a partir dos ensaios realizados. Portanto, são necessários estudos posteriores sobre a expressão de MMP-1 para observar o efeito dos peptídeos e do Lopap, assim como o estudo sobre a translocação do NF-κB, ambos com tempos de pré incubação dos peptídeos mais longos, como de 2 a 7 dias. Além do efeito do Lopap na translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF-κB (p65), o qual não foi avaliado.

4.4 EFEITO DOS PEPTÍDEOS NA PRESENÇA DE CITOQUINAS

Conforme mostrado no Quadro 4, dos 24 analitos avaliados, apenas 10 demonstraram alteração na presença de 1 ng/mL de IL-1β, um deles é o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também pertence à família de citocinas de fatores de crescimento, além de estimular a proliferação, sobrevivência e maturação de granulócitos, e é atuante igualmente em macrófagos. Seu efeito envolvendo o processo de inflamação tem sido explorado há anos. Estudos indicam que o GM-CSF pode induzir a secreção de citocinas pró inflamatórias, como IL-1 e TNF-α, enquanto outros mostram que essa indução não leva a secreção de quantidades significativas (HAMILTON, 2002).

Alguns analitos foram modulados pelo tratamento com os peptídeos. Um deles é o fator estimulador de colônias de granulócitos, G-CSF, o qual pertence à família de citocinas de fatores de crescimento. Sua função é estimular a proliferação,

sobrevida e maturação de células comprometidas com a linhagem de granulócitos por meio da ligação ao seu receptor (G-CSFR). Além disso, já é conhecido que em modelos de infecções periféricas o G-CSF tem efeitos anti-inflamatórios significativos; a sinalização JAK-STAT induzida pelo G-CSF leva a redução de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8. O G-CSF é capaz de diminuir a liberação do TNF- α em modelos *in vitro* (SCHÄBITZ *et al.*, 2003).

No presente trabalho foi observado que os peptídeos E8 e E8cTer são capazes de aumentar a expressão de G-CSF, assim como reduzem de IL-1 β . Porém apenas o E8 é capaz de reduzir a expressão de TNF- α . Conjuntamente, o E8 é capaz de reduzir a expressão de GM-CSF. As alterações apresentadas indicam uma possível via de atuação de ambos no efeito citoprotetor no modelo celular estudado.

A redução da proteína quimiotática de monócitos 3 (MCP-3) também foi observada como efeito do tratamento de 24 horas com os peptídeos E8 e E8cTer. A proteína MCP-3 é membro da família das quimiocinas cisteína-cisteína (CCs), também conhecida por CCL7, e atua como mediador chave das vias pró-inflamatórias, uma vez que leva a ativação de leucócitos por meio de ligação a vários receptores de quimiocinas. Logo, sua expressão é aumentada em condições de inflamação. Sua produção é estimulada por meio da presença de IL-1 β e TNF- α (THOMPSON *et al.*, 2009). Assim, o efeito dos peptídeos E8 e E8cTer na redução da proteína MCP-3 sugere um efeito anti-inflamatório dos peptídeos

A proteína induzível por IFN- γ (IP-10 ou CXCL10) é ativada pelo INF- γ , em doenças inflamatórias seus níveis são aumentados, possuindo um papel importante no recrutamento de células T (DUFOUR *et al.*, 2002). De acordo com os presentes resultados, a expressão é reduzida pelo peptídeo E8, sugerindo outra via de atuação do peptídeo, corroborando seu efeito citoprotetor.

A quimiocina, proteína inflamatória de macrófagos 1 α , MIP-1 α , foi identificada originalmente como um gene expresso em células T ativadas, porém estudos posteriores demonstraram que uma ampla gama de células é capaz de produzi-la. Seu papel na inflamação tem sido comprovado por sua neutralização aliviar alterações patológicas em vários modelos inflamatórios, incluindo infecção viral (SU *et al.*, 1997). Os níveis de MIP-1 α são elevados nos fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide (FULLER *et al.*, 1995). Foi observado que o peptídeo P4cTer é capaz de

reduzir os níveis de MIP-1 α no modelo inflamatório de condrócitos utilizado no estudo, indicando uma possível via de atuação do peptídeo que leva ao seu efeito citoprotetor. Sendo assim, uma análise de mais citocinas é necessária para compreender melhor sua atuação.

5 CONCLUSÕES

O Lopap é uma proteína presente no veneno da *Lonomia obliqua* e o extrato bruto desse veneno evidenciou por meio de estudos *in vivo* uma resposta inflamatória. O CENTD vem estudando os mecanismos de sinalização e ação dessa proteína e de seus peptídeos derivados, os quais são interessantes para o desenvolvimento de novos tratamentos, potencialmente mais eficientes, de doenças que envolvam processos inflamatórios, como a osteoartrite. O presente trabalho traz o estudo do rLopap e de seus peptídeos derivados codificados como P4, P4cTer, E8 e E8cter, em relação aos seus efeitos citoprotetor e anti-inflamatório em um modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β .

A partir dos resultados obtidos e a discussão realizada foi possível concluir que os peptídeos possuem um efeito anti-inflamatório e citoprotetor no modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β , uma vez que o efeito sobre o aumento da viabilidade celular foi comprovado; já o rLopap necessita de mais estudos sobre seu efeito na viabilidade celular para chegar a uma conclusão concreta. Ainda em relação a viabilidade celular, conclui-se que o ensaio a partir da liberação de LDH não é um método adequado para avaliação neste modelo.

Para o estudo sobre a translocação nuclear do fator de transcrição fosforilado NF- κ B (p65) por meio do ensaio de imunofluorescência para *High-Content Screening*, foi possível concluir que as condições ideais de tratamento para o modelo utilizado neste trabalho são: meio DMEM suplementado com 1% de SFB, com concentração de IL-1 β a 1 ng/mL, e o tempo de ação da IL-1 β até a fixação das células de 30 minutos. Também mostrou que apesar do efeito dos peptídeos no aumento da translocação nuclear do NF- κ B, os mesmos não levam à alteração na expressão de MMP-1, sendo necessários mais estudos sobre os efeitos gerados a partir do aumento da translocação nuclear do NF- κ B.

O presente trabalho também indica possíveis vias de atuação dos peptídeos P4, P4cTer, E8 e E8cter, sendo necessário ainda explorar mais as proteínas afetadas por essas vias para, então, identificar os mecanismos de ação desses peptídeos.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados obtidos, torna-se necessária a realização de mais ensaios para o estudo do rLopap em condrócitos para avaliar seus efeitos no modelo inflamatório, começando pelo estudo da viabilidade celular por MTT utilizando concentrações mais baixas que as utilizadas neste trabalho.

Em relação aos efeitos dos peptídeos, é sugerida outra análise sobre a expressão de MMP-1 por meio do ensaio de imunofluorescência para *High-Content Screening* com tempo maior de atuação dos peptídeos neste modelo, assim como uma investigação mais profunda sobre o padrão de marcação perinuclear em células não estimuladas com a IL-1 β . Assim como a identificação dos níveis de outras proteínas ainda não avaliadas relacionadas as possíveis vias de atuação dos peptídeos.

Além disso, também é sugerida a realização da PCR quantitativo em tempo real para quantificação da expressão gênica alterada a partir do tratamento dos condrócitos com o Lopap e seus peptídeos no modelo inflamatório de condrócitos humanos utilizando IL-1 β .

6 ANEXOS

6.1 ANEXO 1 – Tampões e Soluções para o HCS

Wash Buffer 1 (WB1) - PHEM

O tampão foi preparado para um volume final de 500 mL. A diluição foi feita na seguinte ordem:

- 2 mM HEPES (0,26 g)
- 10 mM EGTA (1,5 g)
- Adicionar 3 *pellets* de NaOH
- 2 mM MgCl₂ (0,2 g)
- 60 mM PIPES (9 g)

A solução foi ajustada para o pH 6,9 e posteriormente filtrada.

Wash Buffer 2 (WB2): PHEM-GLYCINE

O tampão foi preparado a partir da dissolução de 1,875 g de glicina em 250 mL de PHEM.

Fixation e Permeabilization Buffers (FB e PB)

Para o *Fixation Buffer* (FB) foi diluído 2 g de PFA em 40 mL de PHEM, aquecido a 70°C e adicionado 0,1 M de NaOH até a solução ficar translúcida. O pH foi ajustado para 6,9, o volume para 50 mL e então filtrado. Após a filtração foi adicionado 2,5 g de sacarose.

A solução foi dividida em 2 frascos com mesmo volume em cada. Um deles para o FB e no outro adicionou-se 125 µL de Triton X-100 para o PB.

Blocking Buffer

BSA 1% (w/v)

REFERÊNCIAS

AKHTAR, N.; MILLER, M. J.; HAGGI, T. M. Effect of a Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. **BMC Complement Altern Med.** Aug 19. 11 (1): 66, 2011.

AKKIRAJU, H. & NOHE, A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. **Journal of developmental biology.** 2015; 3: 177-192.

ALTMAN, R. D.; MANJOO, A.; FIERLINGER, A.; NIAZI, F.; NICHOLLS, M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. **BMC Musculoskeletal Disorders.** Oct 26. 16(1): 321, 2015.

ALVAREZ FLORES, M. P.; FURLIN, D.; RAMOS, O. H. P.; BALAN, A.; KONNO, K.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Losac, the first hemolin that exhibits procoagulant activity through selective Factor X proteolytic activation. **Journal Biol. Chem.**, v. 286, n. 9, p. 6918-6928, 2011.

ALVAREZ FLORES, M. P.; ZANNIN M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. New Insight into the Mechanism of *Lonomia obliqua* Envenoming: Toxin Involvement and Molecular Approach. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis.** v. 37, n. 1, p. 1-16, 2010.

BUCHSER, W., COLLINS, M., GARYANTES, T., GUHA, R., HANEY, S., LEMMON, V., LI, Z., & TRASK, O.J. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. 2012 Oct 1 [Updated 2014 Sep 22]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and

the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100913/>.

CARRIJO-CARVALHO, L. C.; MARIA, D. A.; VENTURA, J. S.; MORAIS, K. L.; MELO, R. L.; RODRIGUES, C. J. & CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A lipocalin-derived Peptide modulating fibroblasts and extracellular matrix proteins. **Journal of toxicology**. v. 2012, 2012.

CHOWDHURY, F.; WILLIAMS, A.; JOHNSON, Peter. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex® and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. **Journal of immunological methods**, v. 340, n. 1, p. 55-64, 2009.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; CARRIJO-CARVALHO, L. C.; WAISMAM, K.; FARSKY, S. H.; RAMOS, O. H. & REIS, C. V. A lipocalin sequence signature modulates cell survival. **FEBS letters**. v. 584, n. 13, p. 2896-2900, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M., ALVAREZ-FLORES, M. P., CARRIJO-CARVALHO, L. C. & RICCI-SILVA, M. E. Toxins from *Lonomia obliqua* - Recombinant Production and Molecular Approach. In: Gandhi Rádis Baptista. (Editor). An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications. 1ed. Rijeka: **InTech**, p.1-32, 2013.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. & ALVAREZ-FLORES, M. P. Exploring New Molecules and Activities from *Lonomia obliqua* Caterpillars. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**. v. 34, n. 4-5, p. 228-233, 2005.

DASA, V.; DEKOVEN, M.; SUN, K.; SCOTT, A.; LIM, S. Clinical and cost outcomes from different hyaluronic acid treatments in patients with knee osteoarthritis: evidence from a US health plan claims database. **Drugs in context**. Jun 23. 5: 1-12, 2016.

- DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; HUSLOP, S.; DUARTE, A.; ANTUNES, E.; LE BONNIEC, B. F.; *et al.* *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. **Thrombosis and Haemostasis**. Mar. 80 (03): 539-542, 1998.
- DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E., & LUSTER, A. D. IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3195-3204, 2002.
- FRITZEN, M.; ALVAREZ FLORES, M. P.; REIS, C.V.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. **Biochemical and biophysical research communications**. Jul 29. 333 (2): 517-523, 2005.
- FULLER, K.; OWENS, J. M. & CHAMBERS, T. J. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 11, p. 6065-6072, 1995.
- GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**. v. 38, n. 4, p. 406-424, 2017.
- HAMILTON, J. A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. **Trends in immunology**, v. 23, n. 8, p. 403-408, 2002.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**. Jan. 7 (1): 33, 2011.

KELLEN, E. M. A.; PICARELLI, Z. P.; DUARTE, A. C. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**. 14 (3): 283-308, 1995.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a001651, 2009.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**; v. 65, n 1-2, p. 55–63, 1983.

RAMOS, A. T.; GONÇALVES, L. R. C.; RIBEIRO, O. G.; CAMPOS, A. R.; SANT'ANNA, O. A. Effects of *Lonomia obliqua* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. **Toxicon**. Jun. 43 (7), 761-768, 2004.

REIS, C.V.; ANDRADE, S.A.; RAMOS, O.H.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; BATISTA, I.F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. **Biochem J.** 398(2):295-302, 2006.

SCHABITZ, W.-R.; KOLLMAR, R.; SCHWANINGER, M.; JUETTLER, E.; BARDUTZKY, J.; SCHÖLZKE, M. N.; SOMMER, C. & SCHWAB, S. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 34, n. 3, p. 745-751, 2003.

REIS, C. V.; PORTARO, F. C.; ANDRADE, S. A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B. L.; SAMPAIO, C. A.; *et al.* A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap): biochemical characterization. **Thrombosis research**. Jun 1. 102 (5): 427-436, 2001.

REIS, C. V.; ANDRADE, S. A.; RAMOS, O. H. P.; RAMOS, C. R. R.; HO, P. L.; BATISTA, I. D. F. C. & CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure–function insights. **Biochemical Journal**. v. 398, n. 2, p. 295-302, 2006.

SU, S.; MUKAIDA, N.; WANG, J. B.; ZHANG, Y.; TAKAMI, A.; NAKAO, S. & MATSUSHIMA, K. Inhibition of immature erythroid progenitor cell proliferation by macrophage inflammatory protein-1 α by interacting mainly with a CC chemokine receptor, CCR1. **Blood**, v. 90, n. 2, p. 605-611, 1997.

THOMPSON, W. L. & VAN ELDIK, L. J. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NF κ B and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. **Brain research**, v. 1287, p. 47-57, 2009.

VENTURA, J. S.; CARVALHO, L. C. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Peptides, compositions, and uses thereof. U.S. Patent n. 8,883,740, 11 nov. 2014.

VINCENTI, M. P. & BRINCKERHOFF, C. E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. **Arthritis research & therapy**. v. 4, n. 3, p. 157, 2002.

WAISMAN, K.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; FERNANDES PACHECO, M.T.; FARSKY, S.H.P. Lopap: A non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells. **Toxicon**. 53:652-659, 2009.

ZANNIN, M., LOURENÇO, D.M., MOTTA, G., DALLA COSTA, L.R, GRANDO, M., GAMBORGİ, G.P., NOGUTI, M.A., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil. **Thromb Haemost** 89: 355-364, 2003.

ZHOU, P. H.; LIU, S. Q.; PENG, H. The effect of hyaluronic acid on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**. Jun 3; 26 (12): 1643-1648, 2008.