



Efeito do tratamento tópico com membrana de quitosana e alginato associado ao gel de insulina sobre o tecido adiposo marrom em feridas de camundongos hiperglicêmicos.

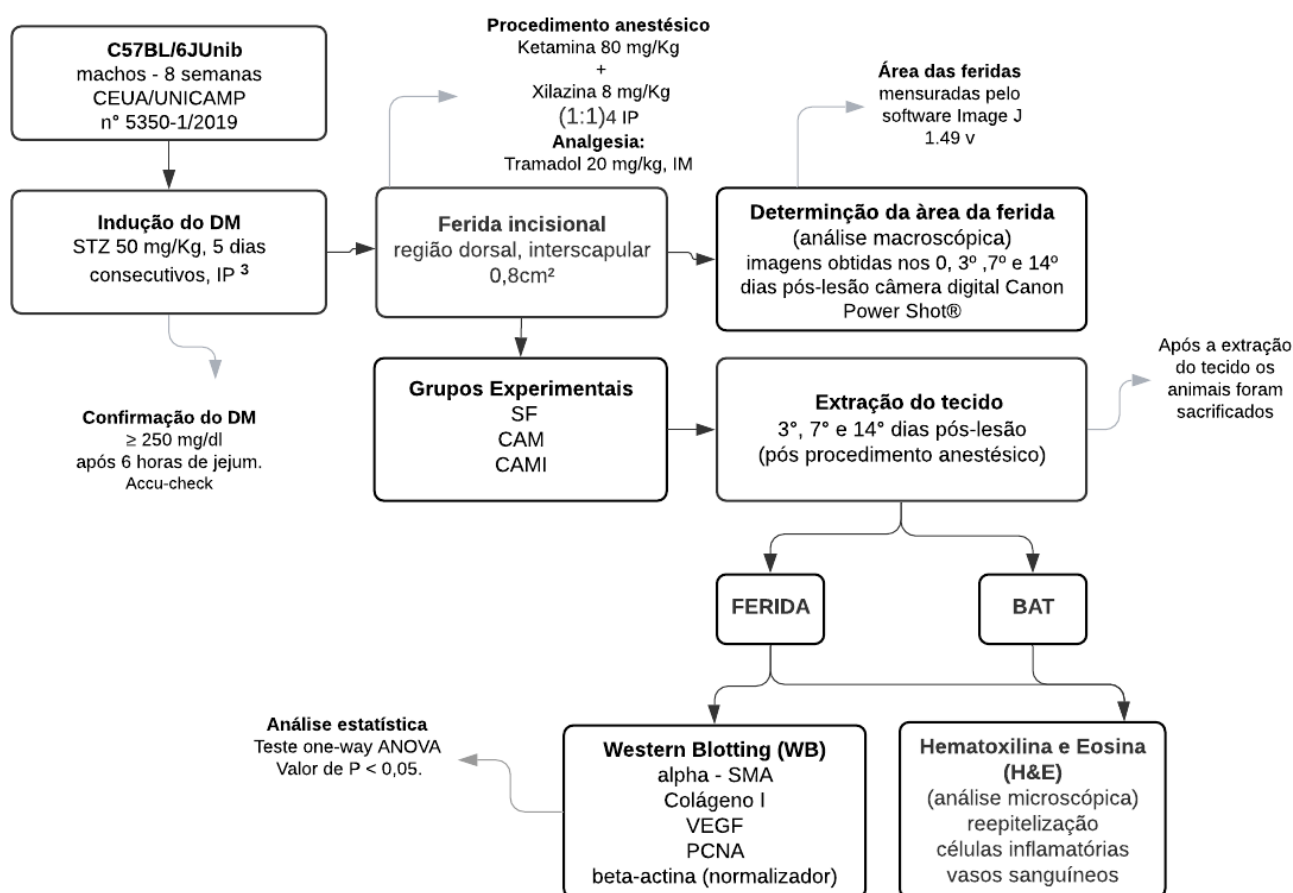
Bolsista: Beatriz Barbieri RA: 167134

Orientadora: Professora Maria Helena Melo Lima

Introdução

A busca por novos produtos para a cicatrização de feridas se deve às limitações dos produtos convencionais disponíveis no mercado. Várias estratégias são utilizadas com o intuito de modular o processo de cicatrização e acelerar o reparo tecidual, a fim de diminuir as complicações. A insulina é um importante produto para a translação das pesquisas pré-clínicas para as clínicas, estudado desde 1960. Bem como a membrana de quitosana e alginato (CAM), sendo capaz de estimular a proliferação de fibroblastos e produção de fibras de colágeno demonstrando um efeito positivo na cicatrização das feridas¹. O presente estudo tem o objetivo de analisar o reparo tecidual e o tecido adiposo marrom (BAT) na presença do tratamento tópico com membrana quitosana e alginato associado ao gel de insulina em feridas de camundongos hiperglicêmicos.

Metodologia



Fluxograma 1 – Corresponde as etapas sessão material e métodos: C57BL/6JUnib machos, 8 semanas foram submetidos a indução do Diabetes Mellitus (DM) por meio de streptozotocina (STZ), por 5 dias consecutivos, 50 mg/Kg intraperitoneal (IP), após jejum de 8 horas. Considerados DM (Diabetes Mellitus) os animais que

apresentaram glicemia ≥ 250 mg/dl após 6 horas de jejum. Foram randomizados em três grupos: animais hiperglicêmicos submetidos ao tratamento tópico com soro fisiológico 0,9%(SF); animais hiperglicêmicos submetidos ao tratamento tópico com membrana de quitosana e alginato (CAM) e animais hiperglicêmicos submetidos ao tratamento tópico com membrana de quitosana e alginato associado ao gel de insulina (CAMI). Foram realizadas análises macroscópicas por meio de imagens fotográficas (para análise da área da ferida) e microscópicas por meio do H&E, foi realizada uma análise qualitativa da reepitelização, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Análise por WB a expressão das proteínas totais através dos anticorpos: actina do músculo liso α (α -SMA): Colágeno I; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA). Análise estatística do WB por teste one-way ANOVA Valor de $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Análise morfométrica e histológica (Hematoxilina & Eosina)

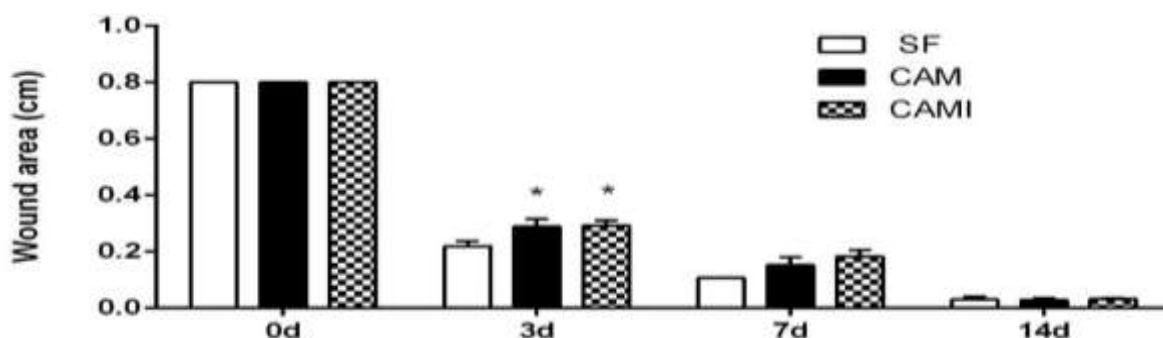
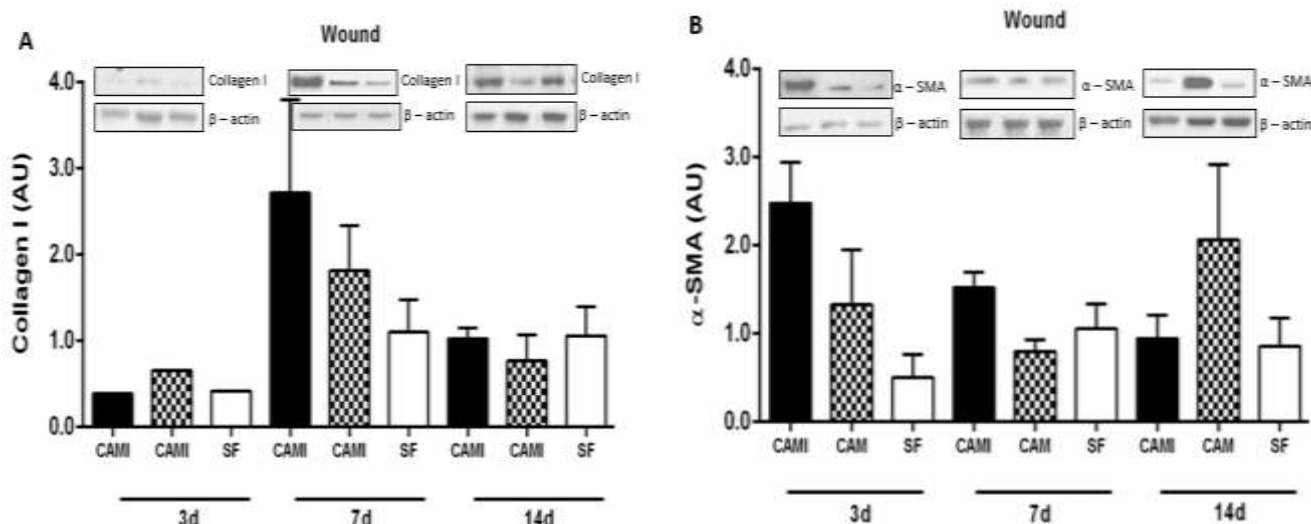


Figura 2 – Área das feridas, em cm², do grupo de animais submetidos ao tratamento tópico com soro fisiológico 0,9% (SF), dos grupos de animais hiperglicêmicos submetidos ao tratamento tópico com SF (n=30), com CAM (n= 28) e CAMI (n=37) nos dias 3^o, 7^o e 14^o dias pós-lesão.

Na análise morfométrica da área das feridas (Figura 2), foi observado diferença estatística (menor área da ferida nos animais do grupo tratados com SF 0,9% quando comparado aos demais grupos, no 3^o dia pós-ferida. Na análise qualitativa dos cortes histológicos destaca-se no 14^o dia pós-lesão, a quantidade de vasos no grupo submetido ao tratamento com CAMI quando comparado com os grupos submetidos ao tratamento tópico com CAM e SF. Reafirmando o que Lima et al⁴ descreveram, de que a insulina é capaz de aumentar a expressão do VEGF. Foi observado uma menor quantidade de células inflamatórias no grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI quando comparado aos grupos CAM e SF. Reiterando de que a insulina é capaz de modular a fase inflamatória e incentivar a angiogênese e a formação de fibras elásticas⁵.

Análise das proteínas Colágeno I, α -SMA, PCNA e VEGF (Western Blotting)



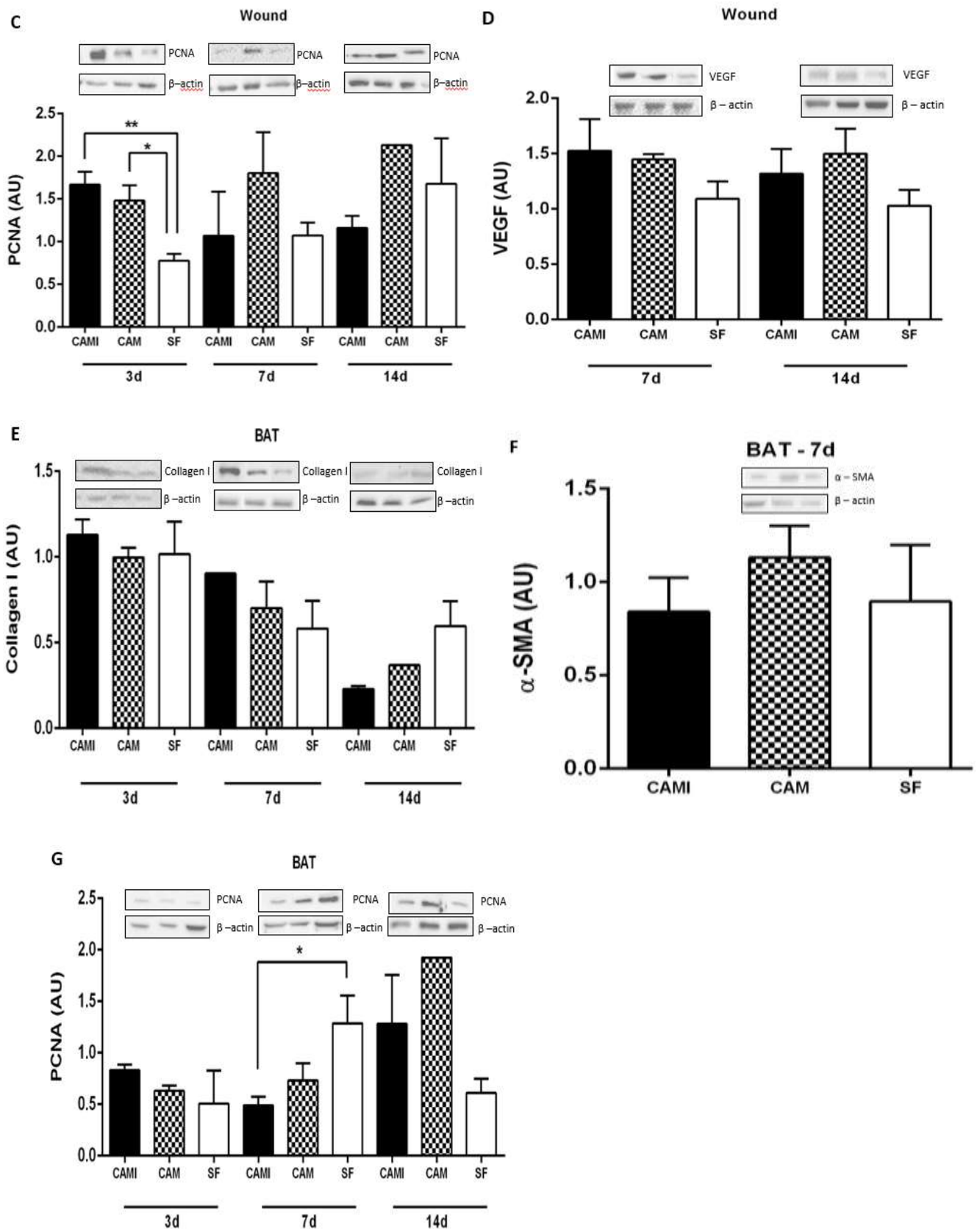


Figura 5 (A – G) Expressão das proteínas Colágeno I (ab34710; 130 kDa 1:1000), α -SMA (ab32575; 42 kDa; 1:1000), PCNA (Ab92552; 29 kDa; 1:1000) e VEGF (ab1316; 24-45 kDa; 1:250), nos 3^o, 7^o e 14^o dia pós-lesão na ferida (wound) e no tecido adiposo marrom (BAT) dos grupos submetidos ao tratamento tópico com CAMI (n=5), CAM (n=4) e SF (n=4). Os dados foram expressos pela média (\pm) erro padrão da média (\pm). Os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de

Tukey. Análises realizadas no software GraphPad Prisma versão 6 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas o valor de $P < 0,05$. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$

Os resultados mostram no 7º dia pós-lesão um aumento da expressão de colágeno I (Figura 5- A, $p < 0,05$) no grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI, quando comparado aos grupos submetidos ao tratamento tópico com CAM e SF (Figura 5- A, $p < 0,05$). Estudos fazem referência a insulina como estimuladora de timidina nos fibroblastos e a partir disso há síntese de colágeno⁶.

A reestruturação da ferida também sofre influência da actina do musculo alfa liso (α -SMA). No entanto quanto menor sua expressão melhor o reparo da ferida, pois o aumento da expressão de α -SMA forma cicatrizes no tecido lesado⁷. Nossos achados demonstram que no 14º dia pós-lesão nos animais submetidos ao tratamento tópico com CAMI (Figura 5- B, $p < 0,05$) tiveram menor expressão do α -SMA quando comparado ao grupo submetido ao tratamento tópico com CAM.

Outro fator presente na fase proliferativa é o antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA). Nossos resultados apresentaram no 3º dia pós-lesão no grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI (Figura 5- C, $p < 0,05$) uma expressão um pouco maior do PCNA quando comparado com os outros dois grupos (CAM e SF). Com esse resultado destaca-se o grupo tratado com insulina apresentou uma maior proliferação celular, a literatura menciona o PCNA para analisar a proliferação de células no reparo tecidual⁸.

Observamos também um aumento da expressão de VEGF no 7º dia pós-lesão no grupo de animais submetidos ao tratamento tópico com CAMI (Figura 5- D, $p < 0,05$) quando comparado aos grupos submetidos ao tratamento tópico com CAM e SF. No 14º dia pós-lesão o grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI (Figura 5- D, $p < 0,05$) apresentou maior expressão de VEGF quando comparado ao grupo submetido ao tratamento tópico com SF. Esses resultados reafirmam o que a literatura menciona quanto a insulina agir no aumento da expressão do VEGF⁴.

Investigamos também como o tratamento tópico com CAM e com CAMI influenciam o tecido adiposo marrom (BAT) no reparo tecidual da ferida. Há poucos estudos relacionando o efeito da insulina no BAT, no entanto há estudos que associam a atividade do BAT à taxa metabólica de repouso, sendo uma descoberta relevante considerando que o hipermetabolismo causa atraso na cicatrização de feridas¹⁰. Nossos resultados demonstraram maior expressão de colágeno I (Figura 5 – E, $p < 0,05$), nos 3º e 7º dia pós-lesão no grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI em relação aos outros dois grupos (CAM e SF). Isso se deve ao transportador de glicose 4 (GLUT 4) ser mais expresso no tecido adiposo marrom do que no tecido adiposo branco, o que leva a uma maior absorção de glicose estimulada por insulina no BAT¹¹.

Em relação ao α -SMA no BAT (Figura 5 – F, $p < 0,05$), no 7º dia pós-lesão o grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI apresentou menor expressão quando comparado aos outros dois grupos (CAM e SF). Estudo demonstra que o aumento de miofibroblastos e sua persistência no ambiente do reparo estão relacionados com uma piora no processo de reparo, formando cicatrizes mais densas e hipertróficas¹².

A proteína PCNA (Figura 5 – G, $p < 0,05$) teve maior expressão no 3º dia pós-lesão no grupo submetido ao tratamento tópico com CAMI quando comparado aos grupos submetidos ao tratamento tópico com CAM e SF. Dados da literatura descrevem que, em camundongos diabéticos, o processo de cicatrização prejudicado caracteriza-se por persistência do infiltrado inflamatório, atraso na formação do tecido de granulação, redução da angiogênese e redução na deposição de fibras colágeno¹³. Desta forma, destacamos que mesmo com a presença do quadro hiperglicêmico nos três grupos experimentais houve uma alteração na inflamação já no terceiro dia pós-lesão no grupo CAMI.

Conclusão

Dessa forma, o gel de insulina na ferida de camundongos diabéticos foi capaz de melhorar a cicatrização, pois aumentou a expressão de colágeno I e VEGF, diminuiu a expressão do α -SMA e influenciou na formação de vasos sanguíneos. No BAT, o gel de insulina influenciou o aumento da expressão de colágeno

I e PCNA e diminuição da expressão de α -SMA, demonstrando que a insulina apresentou um melhor efeito do que os outros tratamentos.

Referências

1. Breder JSC, Pires ALR, Azevedo FF, et al. Enhancement of cellular activity in hyperglycemic mice dermal wounds dressed with chitosan-alginate membranes. *Brazilian J Med Biol Res.* 2020;53(1). doi:10.1590/1414-431x20198621
2. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70(1). doi:10.1002/0471141755.ph0547s70
3. Jaber SM, Hankenson FC, Heng K, McKinstry-Wu A, Kelz MB, Marx JO. Dose regimens, variability, and complications associated with using repeat-bolus dosing to extend a surgical plane of anesthesia in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(6):684-691. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253583/>
4. Lima MHM, Caricilli AM, de Abreu LL, et al. Topical Insulin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing the AKT and ERK Pathways: A Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. Brandner JM, ed. *PLoS One.* 2012;7(5):e36974. doi:10.1371/journal.pone.0036974
5. Azevedo FF, Moreira GV, Teixeira CJ, Pessoa AFM, Alves MJ, Liberti EA, Carvalho CRO, Araújo EP, Saad MJA, Lima MHM. Topical Insulin Modulates Inflammatory and Proliferative Phases of Burn-Wound Healing in Diabetes-Induced Rats. *Biol Res Nurs.* 2019 Oct;21(5):473-484. doi: 10.1177/1099800419864443. Epub 2019 Jul 23.
6. Verhofstad MHJ, Bisseling TM, Haans EMH, Hendriks T. Collagen synthesis in rat skin and ileum fibroblasts is affected differently by diabetes-related factors. *Int J Exp Pathol.* 2002;79(5):321-328. doi:10.1046/j.1365-2613.1998.t01-1-780407.x
7. Jiang Z-T, Li Z-Z, Jiang D-P. Vanadate affects proliferation of healing fibroblasts, cellular production of collagen, and expression of alpha-SMA in vitro. *Med Sci Monit.* 2010;16(4):BR107-111. doi:20357710
8. Fu X, Fang L, Li H, Li X, Cheng B, Sheng Z. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007;15(4):540-548. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00262.x
9. Halpern B, Mancini MC, Halpern A. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(9):889-899. doi:10.1590/0004-2730000003492
10. Zhuang S, Chai J, Duan H. [Advances in the research on the relationship between brown adipose tissue and metabolism in burn and trauma]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2014;30(3):251-253. doi:25174388
11. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, et al. Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin. *Cell Metab.* 2011;14(2):272-279. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.012
12. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The Myofibroblast. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807-1816. doi:10.2353/ajpath.2007.070112
13. Galeano M, Torre V, Deodato B, et al. Raxofelast, a hydrophilic vitamin E-like antioxidant, stimulates wound healing in genetically diabetic mice. *Surgery.* 2001;129(4):467-477. doi:10.1067/msy.2001.112072