



## EFEITO TÓPICO DO AGONISTA DO PEPTÍDEO-1 SEMELHANTE AO GLUCAGON (GLP-1) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS

**Palavras-chave:** agonistas de receptores de GLP-1, análogos ao GLP-1, cicatrização de ferida

### **Autoras:**

**Luiza Weingartner Pierrotti** (aluna) <sup>1</sup> Faculdade de Enfermagem- FENf  
**Eliana Pereira de Araújo** (orientadora) <sup>1</sup> Faculdade de Enfermagem- FENf  
**Thaís Paulino do Prado** (co-orientadora) <sup>1</sup> Faculdade de Enfermagem- FENf  
Laboratório de Sinalização Celular – FCM  
Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades – OCRC/ UNICAMP

---

### **INTRODUÇÃO**

O processo cicatricial é um fenômeno que envolve a integração funcional de diferentes tipos de células como macrófagos, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, além do de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, proteoglicanos e colágeno. Atrasos no processo de cicatrização caracterizam as feridas crônicas. Considerado um problema de saúde pública ao redor do mundo, as lesões crônicas, podem ocasionar diversos agravos à saúde física e mental do indivíduo, comprometendo a qualidade de vida e a capacidade laboral<sup>(1)</sup>.

A busca por terapias tópicas que possam favorecer a recuperação da integridade da pele, assim como de encontrar alvos terapêuticos capazes de tratar diversas doenças da pele representam um avanço na saúde pública. Tal avanço ocorre tendo em vista que o paciente com feridas apresenta não somente diminuição da qualidade de vida, mas também, considerável risco de sofrer mutilações, como as amputações. Nos Estados Unidos, as feridas crônicas afetam 6,5 milhões de pacientes com um gasto de US\$ 25 bilhões anualmente nesse tratamento<sup>(2)</sup>.

No Brasil, esses dados ainda não foram levantado pelo DATASUS, mas acredita-se que, como em outros países, aqui também há uma epidemia “silenciosa” de feridas crônicas. Este problema está crescendo rapidamente devido ao aumento dos custos com assistência médica, ao envelhecimento da população e a um aumento acentuado na incidência de diabetes e obesidade em todo o mundo. Os modelos experimentais em animais representam uma metodologia viável e para os estudos de mecanismos e aplicação de terapias tópicas e seus efeitos sobre a cicatrização<sup>(2)</sup>.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação tópica do agonista do GLP-1 na cicatrização de feridas de camundongos. Para isso foram utilizados camundongos C57\BL6, machos de oito semanas de idade, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle

(carbopol gel) e liraglutida (liraglutida e carbopol gel). Cada animal foi submetido à confecção de duas feridas na região dorsal com um *punch* de 6 mm. Imediatamente após, foi iniciado o tratamento tópico, uma vez ao dia até a reepitelização completa. A contração da ferida foi avaliada por análises macroscópicas e microscópicas, a morfologia do tecido neoformado por histologia e as proteínas envolvidas no processo de cicatrização foram analisadas por meio de western blot e PCR em tempo real, nos dias 3, 5 e 9 após confecção da ferida. Os dados foram tabulados no *software Excel* e as análises estatísticas foram realizados por meio do teste *t student*, sendo que o dado foi considerado significativo com o valor de  $p \leq 0,05$ .

**OBJETIVOS:** Geral: Avaliar a ação do tratamento tópico com liraglutida na cicatrização de feridas em camundongos; Específico: identificar a taxa de contração da ferida; avaliar a morfologia do tecido em cicatrização e a deposição de fibras de colágeno; avaliar a expressão gênica de marcadores pró e anti-inflamatórios, fatores de crescimento tecidual, metaloproteinase, integrinas, marcadores de apoptose, e proteínas envolvidas na sinalização do fator de crescimento epidermal - receptor ativado por GLP-1. (Bax O1 e FOXO1) - e a proteína envolvida na via do Fator de Crescimento Epidermal, cujo receptor também é ativado por Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1).

**METODOLOGIA:** Estudo experimental em pesquisa básica com modelo animal de ferida. Foram utilizados camundongos C57/BL6 machos – amplamente aceitos como um bom modelo animal para experimentação em cicatrização de feridas - recebidos com quatro semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em caixas individuais, com água e ração padrão para roedores sob condição padronizada de iluminação e temperatura. Ao total, foram concedidos 36 camundongos sendo que, para cada experimento, foram utilizados grupos com 12 animais. Após atingirem oito semanas de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos (cada animal será numerado e sorteado): um grupo tratado com veículo (carbopol gel) e um grupo tratado com liraglutida (tratamento tópico com o liraglutida a 100  $\mu\text{M}$  + carbopol gel). Antes da confecção das feridas, foi realizada a tricotomia e a antisepsia do local. Para a realização da lesão, foi administrada anestesia geral e as feridas foram confeccionadas na região dorsal dos animais com o auxílio de *punch* metálico de 6 mm.

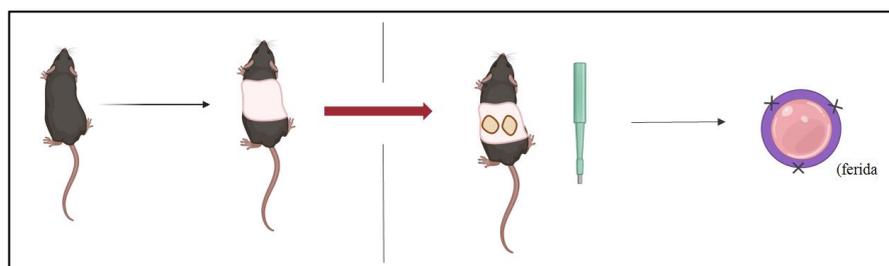


Figura 1. Esquematização do processo de confecção das feridas no dorso dos animais, realizadas com um *punch* metálico. Em volta de cada ferida foi colocada uma placa de silicone (representada pelo círculo roxo) e em seguida, foi suturada. Esse processo teve como intuito controlar a taxa de contração muscular e “fixar” a ferida.

Após esse processo, foi iniciado o tratamento tópico nos animais pertencentes a cada grupo e a ferida foi coberta com um curativo desenvolvido pelas pesquisadoras (confeccionado com tegaderm, esparadrapo e bandaid). Os dados foram tabulados no software Excel, enquanto que as análises estatísticas, pelo teste t student. Ao final desse experimento, no dia 9, realizamos a extração das feridas, sendo que, as amostras de tecido cicatricial foram coletadas para análises histológicas e para a de expressão gênica por qPCR.

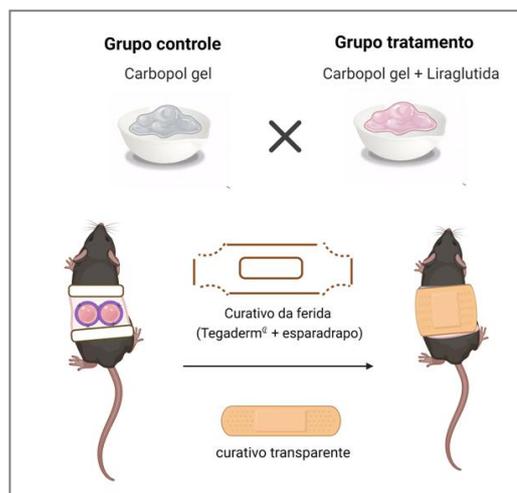


Figura 2. Esquemática do tratamento tópico nos camundongos assim como o respectivo processo de da realização do curativo para proteger a ferida.

Na segunda bateria de experimentos, o processo foi semelhante, porém, as feridas não foram fotografadas e a extração das feridas ocorreu no quinto dia após a confecção das mesmas. E na última bateria do experimento, as feridas também não foram fotografadas, mas extraídas no terceiro dia após a data de sua confecção. Os dados foram registrados em protocolo individual até o dia da eutanásia, realizada por meio de *overdose* e posterior deslocamento de cervical.



Figura 3. Foto registrada para análise do processo de cicatrização da ferida. Na etiqueta, "D" representa o "dia" e o número em seguida o dia de registro a partir da confecção das feridas. O número "1" representa o número do animal no grupo.

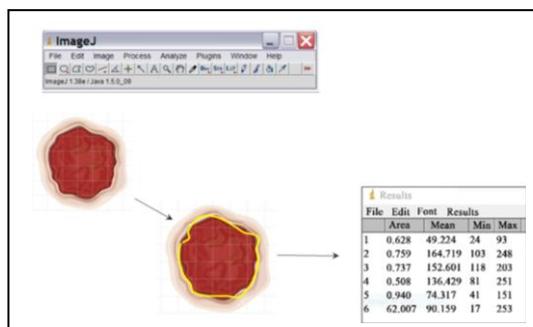


Figura 4. Esquemática da avaliação do processo de cicatrização a partir do software ImageJ®. As fotos são digitalizadas e, em seguida, contorna-se a área correspondente à ferida para analisar tal processo e comparar o grupo tratado com o controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o tratamento tópico com liraglutida incorporado ao gel de carbopol não modificou a contração a nível macroscópico da ferida, quando comparado com o grupo controle. Entretanto, a estrutura da cicatriz formada nas feridas tratadas com liraglutida apresentou não somente maior consistência tecidual (ou seja, a derme e epiderme mostraram-se mais aderidas) durante a fase de proliferação do tecido de granulação, como também intensa angiogênese e deposição de colágeno. Já em relação à quantidade, à organização e à uniformidade das fibras de colágeno não ocorreu o processo de modulação. Por fim, também não foram observadas diferenças nos tipos de fibras polarizadas em relação aos grupos controle e tratamento.

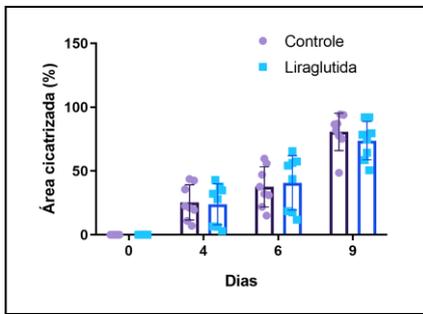


Figura 5. Resultado gráfico da área de cicatrização (%) nos dias 0,4,6 e 9 nos grupos controle e tratamento.

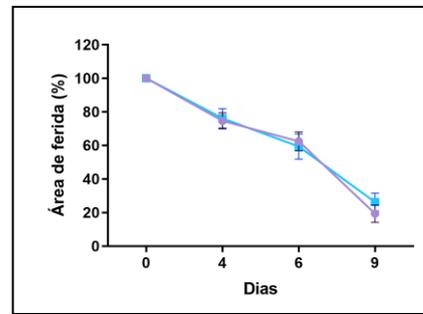


Figura 6. Resultado gráfico da área de ferida (%) nos dias 0,4,6 e 9 nos grupos controle e tratamento.

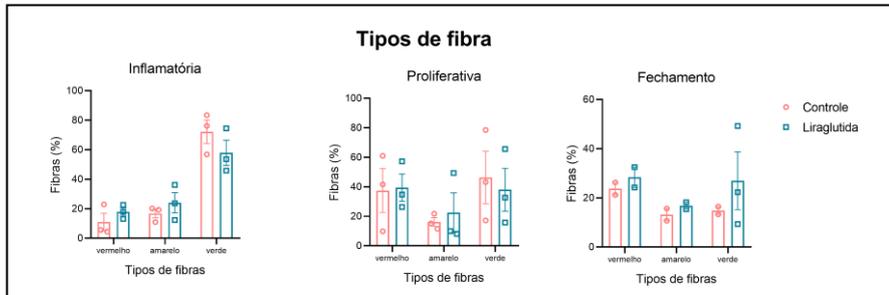


Figura 7. Análise gráfica da quantidade e do tipo de fibra de colágeno presente no grupo tratamento e no grupo controle nas fases da cicatrização (inflamatória proliferativa e fechamento).

As análises de expressão gênica mostraram que não há significativa modulação na expressão de genes relacionados à fase inflamatória, reepitelização, morte celular, sinalização de GLP-1, assim como na expressão de metaloproteinase e de integrinas. Após análise de resultados, uma das hipóteses levantadas consiste no fato de que a ação da liraglutida pode ter sido minimizada por sua incorporação ao gel de carbopol (o qual possibilita um maior umedecimento do tecido) (3,4).

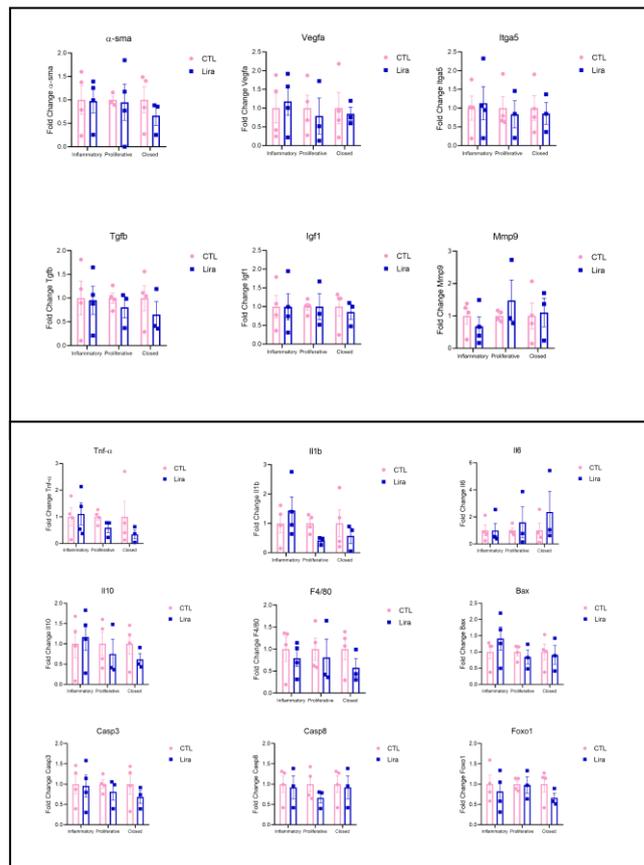


Figura 8. Avaliação da expressão gênica de marcadores pró e anti-inflamatórios e fatores de crescimento tecidual nos grupos controle e tratamento, considerando as fases inflamatória, proliferativa e de fechamento.

Tendo em vista os mecanismos de tratamentos assim como os respectivos resultados, pode-se possibilitar que estudos futuros consigam padronizar um melhor veículo de incorporação para a ação da liraglutida no que se diz ao processo de cicatrização de feridas. Consequentemente, também pode-se favorecer e facilitar uma maior descrição dos mecanismos de ação ativados pela via de sinalização do GLP-1.

## REFERÊNCIAS

1. Almeida WA, Ferreira AM, Ivo ML, et al. Fatores associados à qualidade de vida de pessoas com feridas complexas crônicas. Rev. Fund. Care Online. 2018 jan/mar
2. Ennis WJ, Hoffman RA, Gurtner GC, Kirsner RS, Gordon HM. Wound healing outcomes: Using big data and a modified intent-to-treat method as a metric for reporting healing rates. Wound Repair Regen. 2017 Aug;25(4):665-672. doi: 10.1111/wrr.12575. Epub 2017 Nov 6.
3. Natal RA, Vassalo J, Paiva GR et al. Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast câncer. Tumor Biology April 2018; 1–12.
4. Rüter L, Voss W. Hydrogel or ointment? Comparison of five different galenics regarding tissue breathability and transepidermal water loss. Heliyon 7 (2021) e06071. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06071>