



ENVOLVIMENTO DA VIA COLINÉRGICA ANTI- INFLAMATÓRIA DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO DIABETES MELLITUS TIPO 1

Palavras-Chave: CICATRIZAÇÃO, VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA, DIABETES

Autoras:

SULIENE FRANÇA RIBEIRO, FCA/UNICAMP

ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (coorientadora), FCA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. HOSANA GOMES RODRIGUES (orientadora), FCA/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A pele atua como a primeira linha de defesa do organismo, sendo fundamental para a nossa sobrevivência. Uma vez que a pele é rompida, ocorre a ativação de uma sequência de eventos celulares e moleculares que resultam na cicatrização do tecido. Apesar de ser um processo fisiológico essencial à vida, a cicatrização pode ser prejudicada em condições patológicas, como o diabetes. O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença crônica causada pela destruição das células beta pancreáticas e resulta em hiperglicemia crônica. O atraso na cicatrização de feridas é uma complicação comum em indivíduos diabéticos devido ao estado inflamatório prolongado causado pela hiperglicemia. Considerando que a resposta inflamatória compreende a primeira fase da cicatrização, mecanismos de controle da inflamação podem afetar esse processo como um todo. A via colinérgica anti-inflamatória atua como um mecanismo de controle do sistema nervoso central que estimula o nervo vago e este, por sua vez, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune através da acetilcolina. Apesar dos estudos demonstrarem a influência da regulação da resposta inflamatória para o processo de cicatrização de feridas, ainda não se sabe sobre a importância da via anti-inflamatória colinérgica sobre a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a relevância da subunidade alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7nAChR$) para o processo de cicatrização e para a produção de citocinas inflamatórias em camundongos diabéticos.

METODOLOGIA:

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram utilizados camundongos homozigotos para deleção da subunidade alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7^{-/-}$) e seus controles do tipo selvagem (WT), machos, com 8

semanas de idade, provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura aproximada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após jejum de 4 horas, foi induzido o diabetes nos camundongos dos grupos $\alpha 7^{-/-}$ e WT através da administração intraperitoneal de 5 doses (45 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina (Sigma Aldrich, Alemanha) diluída em tampão citrato de sódio (pH 4.2). Após a injeção, os animais permaneceram em jejum por mais 2 horas.

Dez dias após a última injeção de estreptozotocina, aferiu-se os níveis de glicemia e os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia estavam acima de 240 mg/dL. Em seguida, os animais foram anestesiados e uma área de aproximadamente 1 cm² de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal.

Para avaliar macroscopicamente o fechamento das feridas, as mesmas foram fotografadas nos diferentes tempos de seguimento (0 hora e 1, 3, 7, 10, 14, 16, 18 e 21 dias) após a lesão. As imagens foram capturadas por uma câmera digital Sony® cyber-shot (DSC-S950S 4X 10MP com zoom ótico). Para a análise, a área da ferida foi medida através do software Image J (National Institute of Mental Health -NIH) e os resultados serão expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial da ferida (0 hora). Toda a análise será realizada sem que o avaliador saiba quais são os grupos (avaliação cega).

Os tecidos coletados no 7º dia após a indução das feridas, serão imediatamente acondicionados em nitrogênio líquido e mantidos no freezer (-80°C) até serem homogeneizados. Aproximadamente 100 mg de pele de cada animal será homogeneizada em 1 mL de solução de tampão fosfato-salino com inibidor de proteases (Complete Cocktail protease inhibitor, Roche, Mannheim, Germany). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C . A produção de citocinas (CXCL-1, CXCL-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e VEGF) foi avaliada através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) utilizando o Kit Duo Set (R&D System, Minneapolis, MN, USA). Os valores foram normalizados pela quantidade de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford (1976).

Os resultados serão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Comparações entre os grupos serão realizadas por teste t de Student. Para as análises estatísticas, será utilizado o programa Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise macroscópica do fechamento da ferida evidenciou o atraso na cicatrização dos animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos em relação aos animais WT diabéticos em 3 e 10 dias após a indução de ferida (Figura 2).



Figura 1. Análise macroscópica do fechamento de ferida em animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos e WT diabéticos. Fotos representativas do acompanhamento do processo de cicatrização de ferida nos animais.

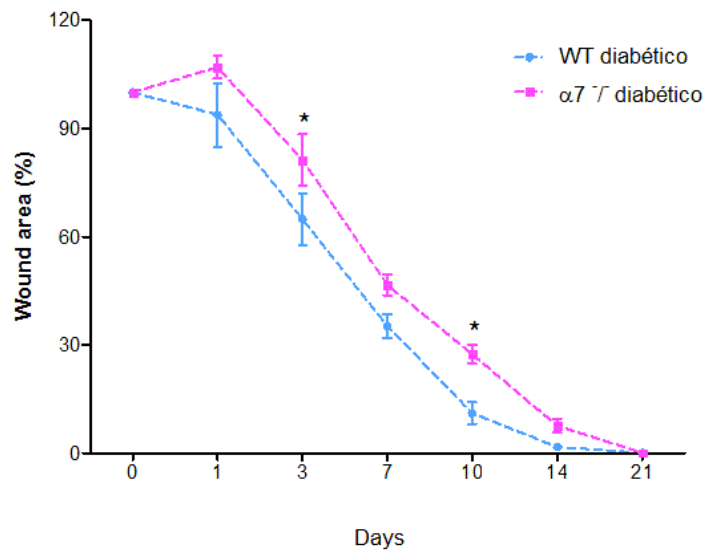
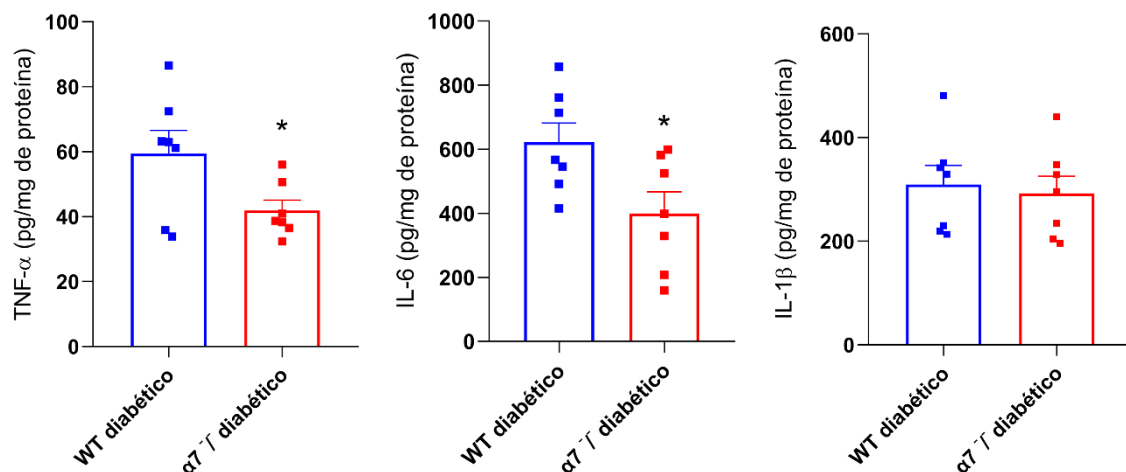


Figura 2. Análise da área da ferida expressa em porcentagem em animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos e WT diabéticos.

Analisou-se a quantificação citocinas e quimiocinas, IL-6, IL- β , IL-10, CXCL1, CXCL2, e de fatores de crescimento, TNF- α e VEGF nos tecidos cicatriciais de 7 dias entre os animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos em relação aos animais WT diabéticos. Não houve diferença significativa na dosagem de IL- β , IL-10, CXCL1, CXCL2, VEGF, no entanto TNF- α e IL-6 apresentaram diferença significativa (Figura 3).



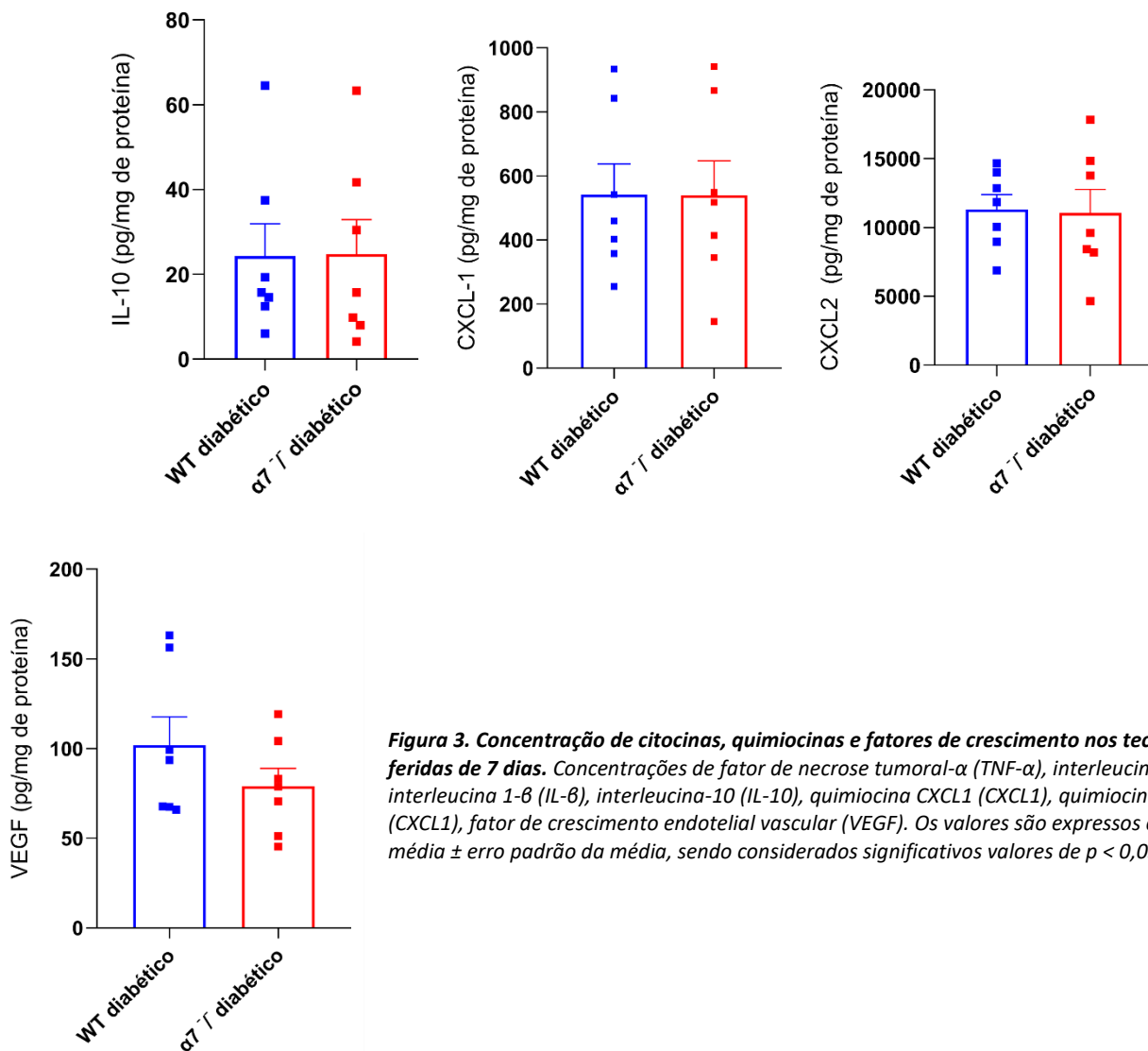


Figura 3. Concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos tecidos de feridas de 7 dias. Concentrações de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina 1- β (IL- β), interleucina-10 (IL-10), quimiocina CXCL1 (CXCL1), quimiocina CXCL2 (CXCL2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$ (*).

Até o momento observamos que animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos apresentam maior dificuldade em cicatrizar a ferida, a qual pode estar relacionada com uma maior resposta inflamatória devido ao próprio diabetes e também a ausência da via colinérgica anti-inflamatória que conseqüentemente resulta na secreção contínua de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune provocando um estado inflamatório crônico. Nos resultados obtidos, observamos diminuição na produção de TNF- α e IL-6 nas feridas dos animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos em relação aos animais WT diabéticos.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, ou seja, com propriedades anti e pró-inflamatórias produzidas por várias células do corpo, incluindo células imunológicas, fibroblastos e células endoteliais. O aumento agudo da IL-6 em resposta a uma infecção, traumatismo ou exercício físico medeia os benefícios anti-inflamatórios, ao passo que a elevação persistente da IL-6 está relacionada com a inflamação patogênica (SUREDA, et al., 2016). No contexto da cicatrização de feridas, a IL-6 está envolvida com o controle da inflamação, principalmente por induzir ativação de macrófagos com características anti-inflamatórias, a migração de células epiteliais e o remodelamento do tecido. Estudos demonstraram que a IL-6 é necessária para a resolução da inflamação, e sua ausência impede a recuperação adequada

(FERNANDO *et al.*, 2014). Dessa forma, a diminuição da IL-6 observada no grupo dos animais $\alpha 7^{-/-}$ diabético, estão coerentes, uma vez que a ausência da via colinérgica anti-inflamatória reduziria o estímulo para a expressão da citocina.

O TNF- α é uma citocina inflamatória secretada principalmente por macrófagos que ajuda a regular a inflamação e as respostas imunes no corpo. Ela desempenha um papel importante no processo de cicatrização, promovendo a inflamação, que é uma parte essencial da resposta imune a lesões ou infecções (ZHANG *et al.*, 2022). Dessa forma, ao avaliar a dosagem da citocina por ELISA encontramos um resultado incoerente com o visto na literatura, encontramos uma diminuição de TNF- α em vez de um aumento nos animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos. Como foi no estudo de DONG *et al.* (2016) que mostrou que a ativação de $\alpha 7$ nAChR promove a cicatrização de feridas diabéticas ao suprimir a produção de TNF- α induzida por produtos de glicação avançada em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Entretanto é importante ressaltar que ao se trabalhar experimentalmente com animais nocaute deve-se levar em consideração a possibilidade do surgimento de novas vias de compensação para a deleção. Outro ponto relevante é que através do método utilizado para a dosagem de citocinas não conseguimos avaliar se essas citocinas estão ativas ou inativas. E também podem depender de outros fatores, como o equilíbrio de outras citocinas e vias inflamatórias envolvidas. Sendo assim, pesquisas adicionais são necessárias para compreender completamente os mecanismos e implicações dessa interação.

CONCLUSÕES:

Os animais com a deleção da subunidade alfa 7 do receptor nicotínico de acetilcolina apresentaram piora na cicatrização de feridas, logo os resultados sugerem que a via colinérgica possui um papel extremamente importante na regulação da inflamação e conseqüentemente melhora na cicatrização da pele.

BIBLIOGRAFIA

DONG MW, Li M, Chen J, Fu TT, Lin KZ, Ye GH, Han JG, Feng XP, Li XB, Yu LS, Fan YY. **Activation of $\alpha 7$ nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF- α Production.** *Inflammation*. 2016 Apr;39(2):687-99. doi: 10.1007/s10753-015-0295-x. PMID: 26650489.

SUREDA A, Batle JM, Martorell M, Capó X, Tejada S, Tur JA, Pons A. **Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy.** *PLoS One*. 2016 Sep 21;11(9):e0163371. doi: 10.1371/journal.pone.0163371. PMID: 27654305; PMCID: PMC5031445.

FERNANDO MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. **The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages.** *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188. PMID: 24736635; PMCID: PMC3988054.

ZHANG E, Miramini S, Patel M, Richardson M, Ebeling P, Zhang L. **Role of TNF- α in early-stage fracture healing under normal and diabetic conditions.** *Comput Methods Programs Biomed*. 2022 Jan;213:106536. doi: 10.1016/j.cmpb.2021.106536. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34823199.