



# 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 cm<sup>2</sup> de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal.

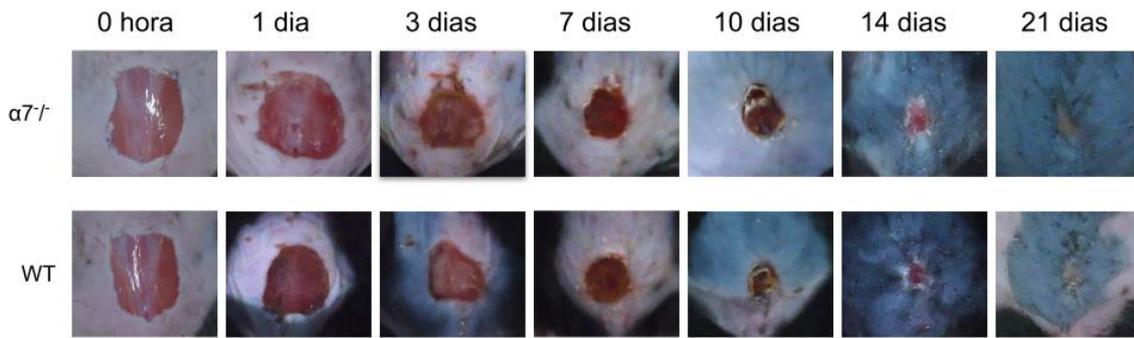
Para avaliar macroscopicamente o fechamento das feridas, as mesmas foram fotografadas nos diferentes tempos de seguimento (0 hora e 1, 3, 7, 10, 14, 16, 18 e 21 dias) após a lesão. As imagens foram capturadas por uma câmera digital Sony® cyber-shot (DSC-S950S 4X 10MP com zoom ótico). Para a análise, 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 ( $-80^\circ\text{C}$ ) 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  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ . A produção de citocinas (CXCL-1, CXCL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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).

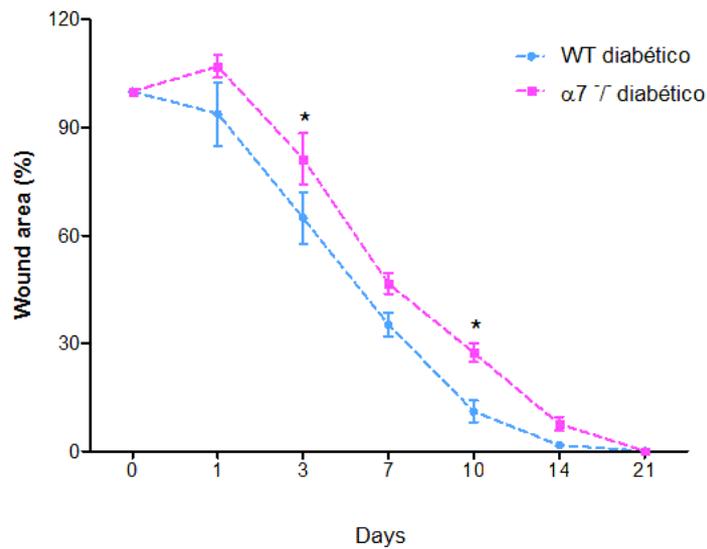
Os resultados serão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Comparações entre os grupos serão realizadas por teste t de Student. Para as análises estatísticas, será utilizado o programa Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças serão consideradas significativas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

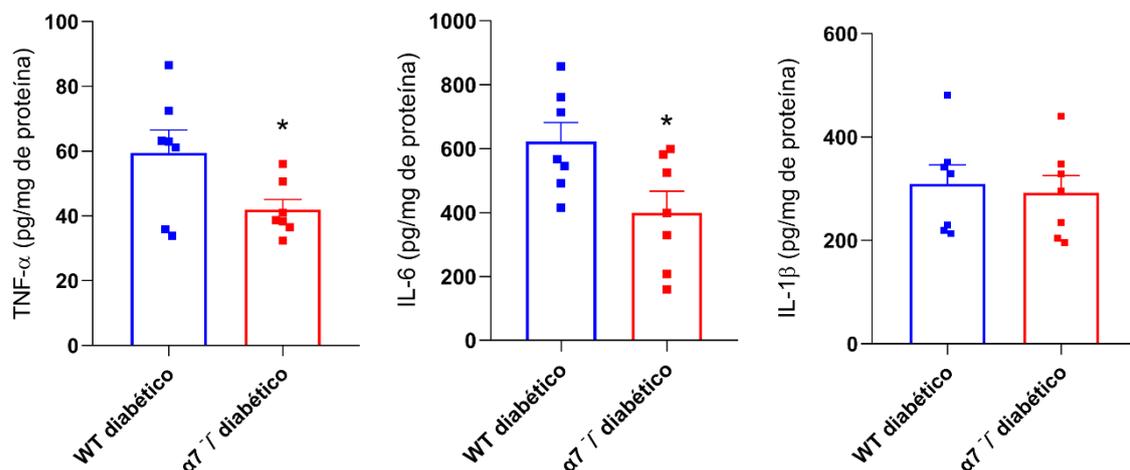


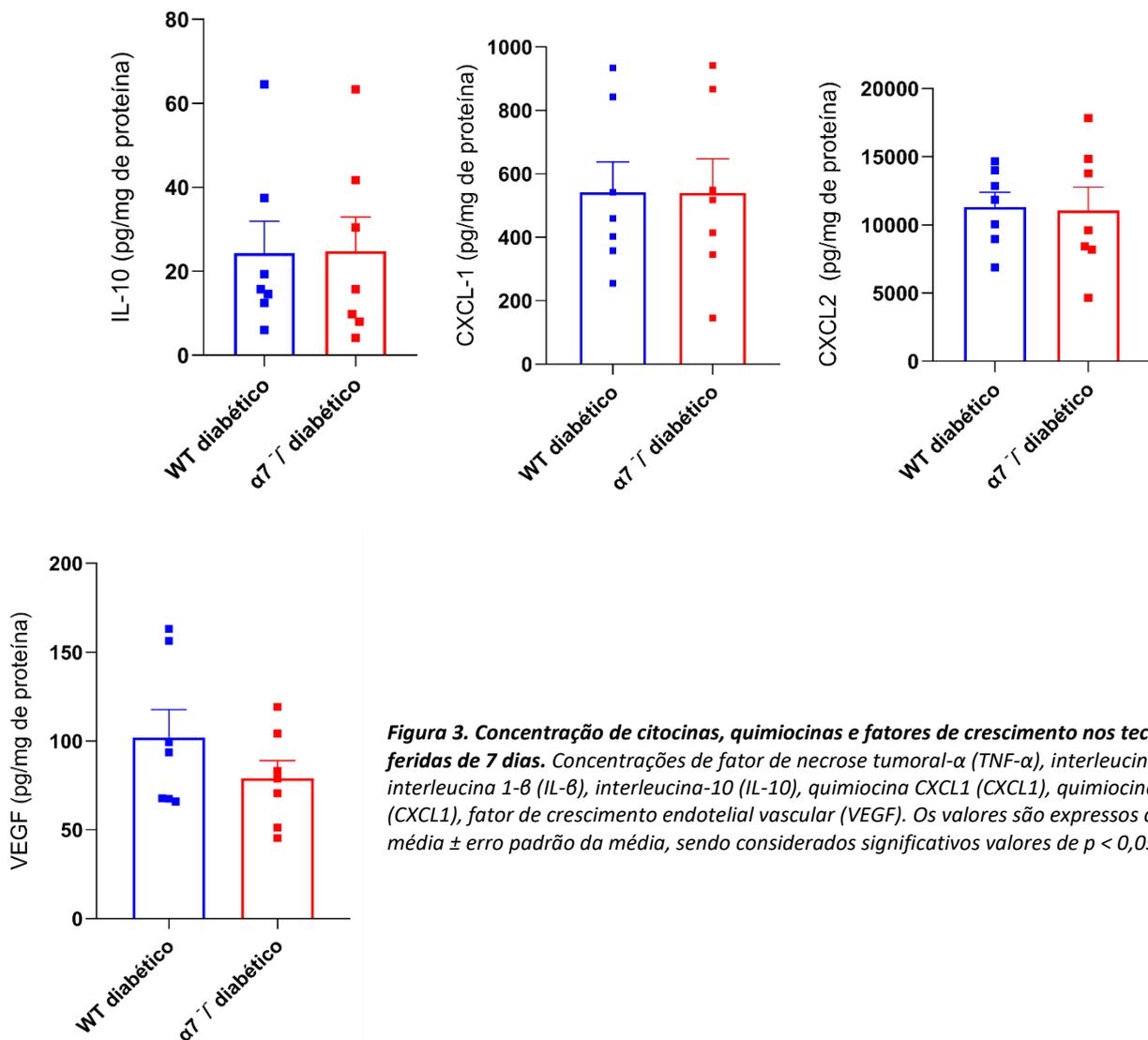
**Figura 1.** Análise macroscópica do fechamento de ferida em animais  $\alpha 7^{-/-}$  diabéticos e WT diabéticos. Fotos representativas do acompanhamento do processo de cicatrização de ferida nos animais.



**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- $\beta$ , IL-10, CXCL1, CXCL2, e de fatores de crescimento, TNF- $\alpha$  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- $\beta$ , IL-10, CXCL1, CXCL2, VEGF, no entanto TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina 1- $\beta$  (IL- $\beta$ ), 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.