



PARTICIPAÇÃO DA VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM ÁCIDO LINOLEICO

Palavras-Chave: diabetes, cicatrização, ácido linoleico; via anti-inflamatória colinérgica

Autores(as):

SOPHIA FRANCHI BRUZETTI, FCA/UNICAMP

ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (co-orientadora), FCA/UNICAMP

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

INTRODUÇÃO

A pele é a primeira linha de defesa do corpo, responsável pelo revestimento e proteção extracorpórea. A cicatrização é um mecanismo fisiológico desencadeado imediatamente após a lesão da pele e, apesar de ser um processo evolutivamente conservado, pode ser prejudicada devido a complicações patológicas, como o diabetes. O diabetes mellitus tipo I é uma doença crônica causada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas, o que resulta em hiperglicemia crônica, devido à ausência de insulina. O atraso na cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos se deve a inflamação crônica devido a hiperglicemia e aumento do estresse oxidativo. Feridas diabéticas apresentam maior infiltração de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios que estimulam a secreção de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6). Considerando que a resposta inflamatória compreende a primeira fase do processo de cicatrização e regula todas as fases subsequentes, mecanismos de controle da inflamação contribuem para o reparo tecidual. A via anti-inflamatória colinérgica é um mecanismo do sistema nervoso central de controle da resposta inflamatória que atua através da ativação do nervo vago que, por sua vez, estimula a secreção de acetilcolina pelas células imunes e bloqueia a síntese de citocinas inflamatórias. Resultados anteriores do nosso grupo, demonstraram que a administração oral de ácido linoleico em camundongos diabéticos acelera o reparo tecidual e estimula a secreção de IL-6 em relação aos animais diabéticos não suplementados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação da via colinérgica anti-inflamatória em camundongos diabéticos suplementados com ácido linoleico durante a cicatrização de feridas e na secreção de citocinas inflamatórias, como a IL-6.

METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela 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 ($Chrna7^{-/-}$) 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 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram distribuídos em 4 grupos: (WT) animais do tipo selvagem diabéticos suplementados com água; (WT DLA) animais do tipo selvagem diabéticos suplementados com 50 μL de ácido linoleico (22 mg/kg); ($Chrna7^{-/-}$) animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos suplementados com água e ($Chrna7^{-/-}$ DLA) animais $\alpha 7^{-/-}$ diabéticos suplementados com 50 μL de ácido linoleico (22 mg/kg)

Após jejum de 4 horas, o diabetes foi induzido nos camundongos dos grupos $Chrna7^{-/-}$ 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). Os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia estavam acima de 240 mg/dL (MEYEROVICH et al., 2017; FIDLER et al., 2019).

Foi realizado um acompanhamento da glicemia, que garantiu que todos os animais permaneceram diabéticos durante todo o processo, ou seja, com níveis glicêmicos ≥ 240 mg/dL. Após a confirmação do diabetes, foi realizada a indução de ferida, e para acompanhamento da glicemia dos animais durante o processo cicatricial, a mesma foi aferida nos tempos 0 hora, 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias, coletando o sangue da veia caudal e utilizando o Kit Accu-chek® Active.

Dez dias após a última injeção de estreptozotocina, iniciamos a suplementação dos animais. Os animais dos grupos *Chrna7^{-/-}* DLA e WT DLA receberam suplementação oral de 50 μ L/dia de ácido graxo linoleico puro por 5 dias consecutivos (Sigma Aldrich, Alemanha) por pseudogavagem com pipeta monocanal mecânica (10-100 μ L, Eppendorf®). Os animais dos grupos WT e *Chrna7^{-/-}* foram suplementados com água (RODRIGUES et al., 2010). Após 5 dias de administração do ácido linoleico, os animais foram anestesiados e uma área de aproximadamente 1 cm² de pele foi removida cirurgicamente da região dorsal. Foram realizados lotes de camundongos que foram eutanasiados tanto no 7º, quanto no 21º dia após a realização das feridas.

Para avaliar o fechamento das feridas, as mesmas foram fotografadas em diferentes tempos de seguimento 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 foram expressos em porcentagem (%) em relação à área inicial da ferida (0 hora).

Aproximadamente 100 mg de pele foi homogeneizada em 1 mL de solução de tampão fosfato-salino com inibidor de proteases (Complete Cocktail protease inhibitor, Roche, Mannheim, Germany). 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 método de ELISA utilizando o Kit Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA). Os valores foram normalizados pela quantidade de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford (1976).

Aproximadamente 70 mg de tecido cicatricial foi armazenado em reagente de estabilização de RNA (RNAlater da Qiagen® (Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante (100 μ L/10 mg de tecido). O tecido foi homogeneizado e o RNA foi extraído utilizando o kit RNAeasy da Qiagen® (Hilden, Alemanha) conforme descrito pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando 2 μ g de RNA e reagentes do kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade da Applied Biosystems® (Foster City, Califórnia, EUA). O PCR quantitativo foi realizado utilizando-se o kit iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad®, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os resultados serão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo WT DLA foi retirado das análises e de todos os resultados do presente estudo porque além de estudos anteriores do nosso grupo já terem resultados com um grupo idêntico, este não estava coerente com as comparações de grupos que realmente interessavam para atingir o objetivo central da pesquisa e então, estava comprometendo análises estatísticas fidedignas.

De acordo com os resultados apresentados abaixo, o fechamento da ferida dos animais do grupo $\alpha 7^{-/-}$ DLA foi atrasado em relação aos animais do grupo $\alpha 7^{-/-}$ D no 3º e 7º dia após a lesão.

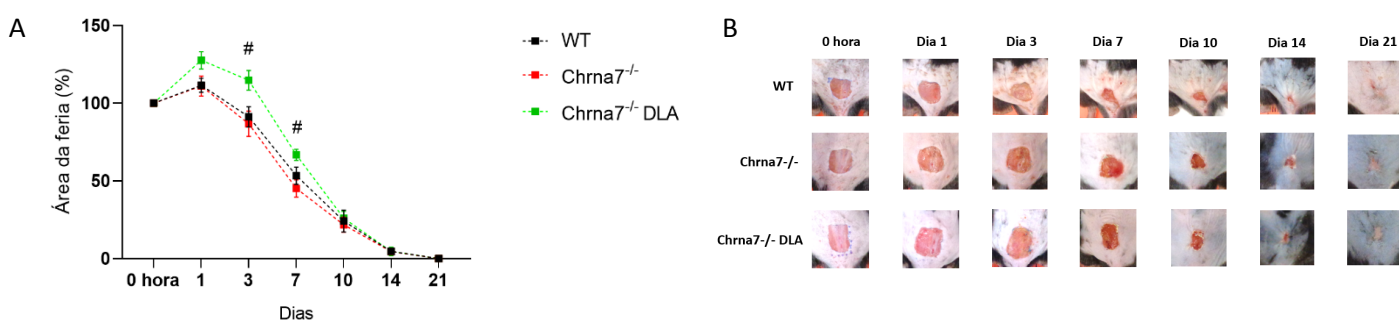


Figura 1. Análise do fechamento da área da ferida e fotos representativas dos animais dos grupos WT, *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA. **(A)** Fotos representativas do fechamento da ferida. **(B)** Análise temporal do percentual da área da ferida em relação às feridas no tempo 0 hora. # Indica diferença significativa entre os grupos *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA.

O acompanhamento da glicemia dos animais durante o decorrer dos dias comprova que todos permaneceram diabéticos durante toda a experimentação, com níveis de glicemia ≥ 240 mg/dL.

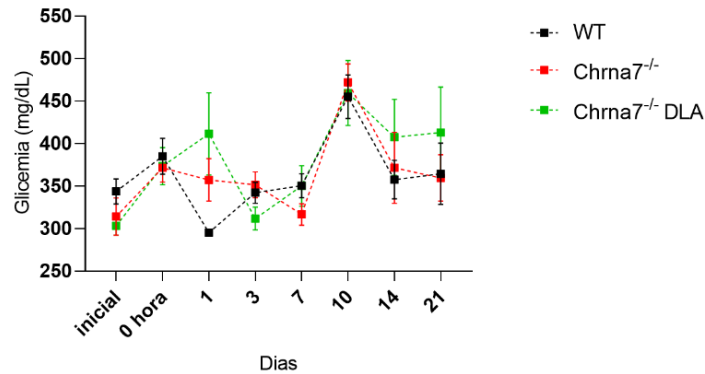


Figura 2. Acompanhamento de glicemia durante 21 dias.

A histologia em Hematoxilina e Eosina mostra que não existem diferenças entre os grupos *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA, mas observando o grupo WT, percebe-se que este possui maior inflamação do que os dois outros grupos em comparação.

Já a histologia em Sirius Red mostra que o grupo WT possui mais fibras desorganizadas quando comparado ao grupo *Chrna7^{-/-}*, o que é benéfico para maior funcionalidade e qualidade tecidual. Enquanto isso, o grupo *Chrna7^{-/-}* DLA parece apresentar maior matriz extracelular (MEC) quando comparado ao grupo *Chrna7^{-/-}*, o que pode estar demonstrando um desenvolvimento de colágeno mais acelerado neste grupo.

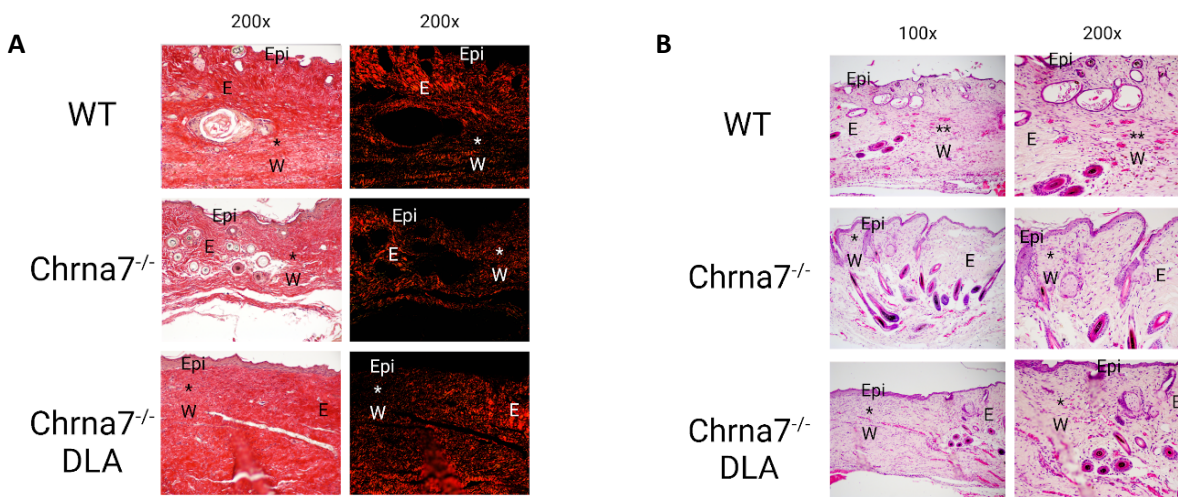


Figura 3. Análise histológica de tecido cicatricial de 21 dias. **(A)** Histologia em Sirius Red, com aumento de 200x; imagens sem e com polarização. **(B)** Histologia em Hematoxilina e Eosina, com aumentos de 100x e 200x. Epi - indica epiderme. W - indica área de ferida. E - indica área de borda. * Indica inflamação.

Para tentar explicar esses resultados avaliamos as concentrações teciduais de mediadores inflamatórios envolvidos no processo de cicatrização. A única diferença significativa foi entre grupos *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA, na quantificação de IL-10 e no tempo de 0 hora.

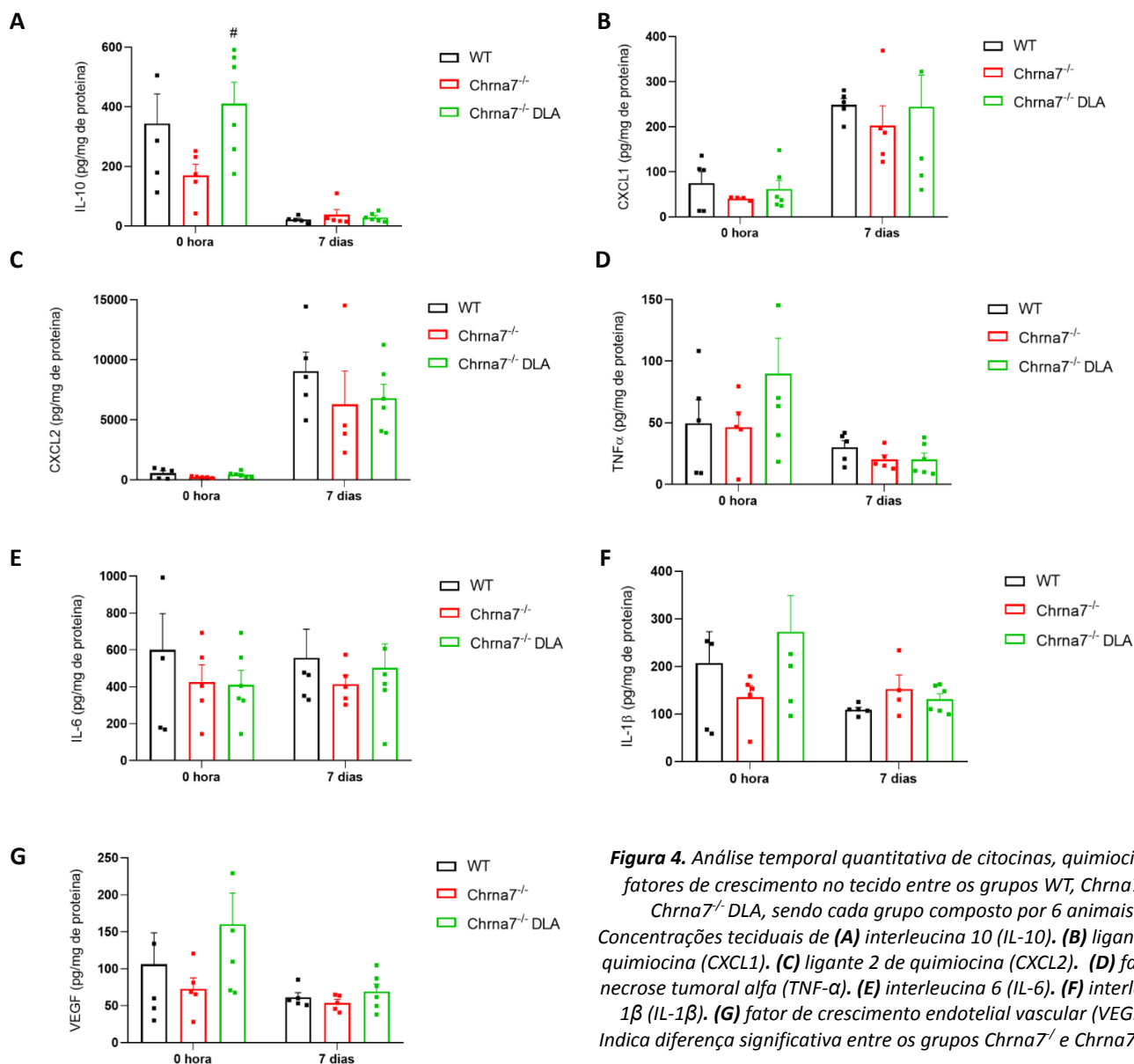


Figura 4. Análise temporal quantitativa de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido entre os grupos WT, *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA, sendo cada grupo composto por 6 animais. Concentrações teciduais de (A) interleucina 10 (IL-10). (B) ligante 1 de quimiocina (CXCL1). (C) ligante 2 de quimiocina (CXCL2). (D) fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). (E) interleucina 6 (IL-6). (F) interleucina 1 β (IL-1 β). (G) fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). # Indica diferença significativa entre os grupos *Chrna7^{-/-}* e *Chrna7^{-/-}* DLA.

Embora os resultados de análise de fechamento de ferida (Figura 1) apresentem que não houve melhora significativa na cicatrização dos animais *Chrna7^{-/-}* diabéticos, estudos experimentais com denervação confirmaram que as terminações nervosas simpáticas na pele tem papel significativo e complexo na cicatrização. Os beta2-adrenoceptores podem ser ativados perto de terminações simpáticas; suprimem a inflamação e a reepitelização, enquanto os adrenoceptores alfa1 e alfa2 induzem inflamação e ativam os queratinócitos. Levando em conta a pele saudável, todos os efeitos são importantes para uma cicatrização de sucesso. Entretanto, as pesquisas têm mostrado que em feridas diabéticas, o bloqueio beta e a estimulação colinérgica fornecem os melhores resultados quando se fala em melhoria da cicatrização de feridas (IVANOV, *et al.*, 2023).

Além disso, estudos têm mostrado que ambos os tipos de receptores colinérgicos inibem a secreção de citocinas dos leucócitos, embora os mAChR (receptores muscarínicos de acetilcolina) sejam mais bem pesquisados (IVANOV, *et al.*, 2023). Considerando isso, a liberação de acetilcolina também pode diminuir a inflamação na área da ferida, promovendo vasodilatação e então estimulando o extravasamento de leucócitos, o que revela a importância da presença da via colinérgica anti-inflamatória num processo inflamatório e de cicatrização (KURZEN, *et al.*, 2007).

Para além da análise macroscópica do fechamento da ferida, quando observamos as histologias de 21 dias (Figura 3) percebemos que no grupo WT, existe maior inflamação em relação aos demais grupos, porém maior desorganização das fibras de colágeno quando observamos a coloração em Sirius Red. Os estudos mostram que, na fase de remodelamento do tecido, ocorre intensa produção e digestão do colágeno, bem como

a substituição do colágeno III pelo colágeno I. Esses eventos visam manter as fibras na mesma direção do tecido não lesionado para restabelecer suas funções e forças mecânicas. Levando em consideração as funções da pele e sua necessidade de flexibilidade, a desorganização das fibras é extremamente importante para sua funcionalidade (SILVA, 2018).

Em relação a matriz extracelular, quando observamos a histologia em Sirius Red percebemos maior desenvolvimento no grupo Chrna7^{-/-} DLA quando comparado aos demais grupos. É através da matriz extracelular, que ocorre a migração de diferentes tipos de células necessárias para o processo de cicatrização (SILVA, 2018). Além disso, a MEC desempenha funções muito importantes como estruturação, organização e orientação para as células e tecidos, auxiliando diretamente o controle do metabolismo celular (XUE e JACKSON, 2015). Apesar da ausência de testes para análise mecânica do tecido, esse maior desenvolvimento da MEC pode sim ser associado à melhoria na qualidade e funcionalidade do tecido.

A fase inflamatória é fundamental para que ocorra a infiltração de células e produção de mediadores inflamatórios, que são muito importantes para o sucesso do processo de cicatrização. Porém, tão essencial quanto esta fase, é justamente o controle dela. O controle da inflamação é indispensável para a reparação tecidual, afinal a inflamação crônica pode piorar a ferida (SILVA, 2018). Através da análise do fechamento da ferida (Figura 1), é possível perceber que provavelmente é o controle da inflamação que está ruim, isso porque são nos primeiros dias que o grupo Chrna7^{-/-} DLA apresenta maior área de ferida.

Sabe-se que a suplementação de ácido linoleico tem ação pró-inflamatória, entretanto estudos demonstram que mesmo aumentando a liberação de mediadores pró inflamatórios na fase inicial da inflamação, ele também os reduz na fase de resolução (SILVA, 2018), o que pode justificar o fato do grupo Chrna7^{-/-} DLA apresentar diferenças significativas no início do acompanhamento do fechamento da ferida (Figura 1), entretanto menor área inflamada e maior desenvolvimento de MEC em 21 dias, quando observa-se a histologia (Figura 3).

CONCLUSÃO

Após um aprofundamento dos resultados, podemos dizer que o grupo Chrna7^{-/-} não apresentou diferença no fechamento da ferida em relação aos animais WT. Entretanto, foi observado alinhamento paralelo das fibras colágenas na pele de 21 dias, o que indica atraso no processo. Por outro lado, grupo Chrna7^{-/-} DLA atrasou o fechamento da ferida, mas apresentou melhora na organização da MEC em relação ao grupo Chrna7^{-/-}. Através da literatura e demais estudos que demonstraram que a suplementação de ácido linoleico pode ser benéfica, podemos supor que a ausência da subunidade alfa 7 está prejudicando as vias de atuação do ácido graxo e impedindo o desenvolvimento de tal efeito.

Além disso, os estudos nessa área ainda são escassos, o que evidencia a necessidade de mais pesquisas sobre os temas cicatrização de pele e ácido linoleico, para maior compreensão sobre o assunto.

REFERÊNCIAS:

- IVANOV E, Akhmetshina M, Erdiakov A, Gavrilova S. **Sympathetic System in Wound Healing: Multistage Control in Normal and Diabetic Skin**. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 20;24(3):2045. doi: 10.3390/ijms24032045. PMID: 36768369; PMCID: PMC9916402.
- KURZEN, H.; Wessler, I.; Kirkpatrick, CJ; Kawashima, K.; Grando, SA **O Sistema Colinérgico Não Neuronal da Pele Humana**. *Horm. Metab. Res.* **2007**, *39*, 125–135.
- SILVA, Jéssica R. et al. **Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: from inflammation to repair.: From Inflammation to Repair. Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1-17, 2018.
- XUE M, Jackson CJ. **Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring**. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Mar 1;4(3):119-136. doi: 10.1089/wound.2013.0485. PMID: 25785236; PMCID: PMC4352699.
- BALBINO, Carlos Aberto, Pereira, Leonardo Madeira e Curi, Rui. **Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [online]. 2005, v. 41, n. 1 [Acessado 10 Maio 2022], pp. 27-51. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100004>>. Epub 25 Out 2006. ISSN 1516-9332. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100004>.