

MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO ÁCIDO GRAXO LINOLEICO (LA) SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO DIABETES EXPERIMENTAL: ENFOQUE NA MODULAÇÃO DA INTERLEUCINA 6.

Palavras-Chave: CICATRIZAÇÃO, DIABETES, LINOLEICO

Autoras:

ISABELA BUQUIO BACCARIN, FCA-UNICAMP

Ms^a. BEATRIZ BURGER (co-orientadora), FCA- UNICAMP

Ms^a. ROBERTA NICOLLI SAGIORATO (co-orientadora), FCA- UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

O processo de cicatrização é orquestrado por uma sequência de eventos que pode ser didaticamente dividida em três fases temporais que se sobrepõem, são elas: fase inflamatória; fase proliferativa e fase de remodelamento (**Figura 1**).

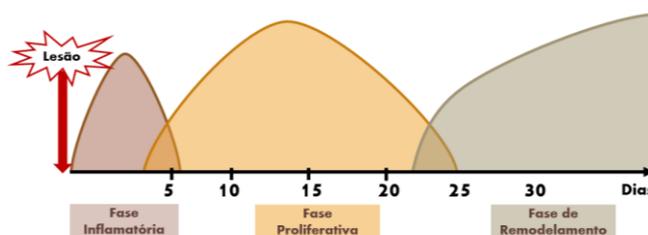


Figura 1. Visão geral esquemática das 3 fases da cicatrização de feridas ao longo do tempo.

Entretanto, algumas condições causam um atraso no reparo tecidual. Uma das mais significativas na formação de feridas crônicas é o diabetes *Mellitus*. Os motivos por trás desse desfavorecimento da cicatrização nos portadores de diabetes não estão bem elucidados, porém discute-se que a fisiopatologia da doença, sendo associada a uma inflamação crônica e de baixo grau, possa ter influência (PATEL *et al.*, 2019).

Um dos alvos dos estudos neste campo do reparo tecidual são os macrófagos, uma população heterogênea de células mielóides que desempenha muitas funções dentro do seu espectro de ativação, tanto com fenótipo pró-inflamatório, nos estágios iniciais, e com fenótipo anti-inflamatório e/ou pró-resolutivo, em estágios posteriores do reparo. Além disso, no local da ferida, essas células são responsáveis por fagocitar os resíduos celulares bem como a própria matriz extracelular (MEC). Nesse

sentido, os macrófagos sinalizam, principalmente para os fibroblastos, para que haja uma regulação da deposição e remodelamento de colágeno (PEÑA; MARTIN, 2024).

Outro elo entre os macrófagos e a MEC pode ser a inflamação. Ensaio com embriões de mamíferos demonstram que cicatrizes, ou seja, uma resposta fibrótica, passam a existir somente a partir do estágio de desenvolvimento embrionário no qual há o influxo de macrófagos na lesão. Anteriormente a isso, não há a formação de cicatrizes nos embriões submetidos à lesão (HOPKINSON-WOOLLEY *et al.*, 1994). Saindo do olhar das células, porém pensando em seus metabólitos, as citocinas possuem um papel chave na execução e regulação do processo de cicatrização. Em especial, a interleucina-6 (IL-6) têm sido descrita como fundamental no reparo tecidual (NIRENJEN *et al.*, 2023), dada sua ação tanto pró-inflamatória, nos eventos da fase inicial, como também pró-resolutiva, na fase de proliferação (GALLUCCI *et al.*, 2000, 2004; LIN *et al.*, 2003; NIRENJEN *et al.*, 2023).

Além disso, pode haver uma modulação da IL-6, visto que alguns estudos demonstram níveis diferentemente expressos do gene da IL-6 entre animais diabéticos e controle, e entre a pele sem lesão e lesionada dos animais diabéticos (NISHIKAI-YAN SHEN, *et al.*, 2017).

Em estudos prévios, nosso grupo demonstrou que a suplementação com ácido graxo linoleico (LA) acelerou o fechamento da ferida em animais diabéticos. Essa melhora foi associada com aumento nas concentrações teciduais de IL-6 no grupo diabético suplementado. Assim, nesta fase do projeto buscamos investigar os efeitos da IL-6 em células como macrófagos, as quais estão muito presentes no tecido cicatricial.

Justifica-se, portanto, o presente trabalho, que tem como objetivo a avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na presença de LA no contexto da cicatrização de feridas com foco investigativo em uma possível modulação da IL-6.

METODOLOGIA:

Perante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) (Protocolo: 5566-2/2020), utilizamos camundongos machos da linhagem C57BL/6 provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram utilizados após completadas 8 semanas de vida, e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura aproximada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com água e ração *ad libitum*.

O protocolo para obtenção de macrófagos peritoneais consistiu na injeção intraperitoneal de 1 mL de tioglicolato a 4%. 72 horas após a injeção, realizou-se a coleta dos macrófagos peritoneais através da injeção intra-abdominal de 5 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + 10% SFB (Soro fetal Bovino) + EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético). Imediatamente após a injeção, recuperou-se totalmente este líquido contendo os macrófagos peritoneais.

Após processamento, as células foram contadas e plaqueadas 1×10^6 células/poço, na placa de 24 poços com meio DMEM normo glucose suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e

mantidas por 2 horas na estufa à 37°C, 5% de CO₂ dando continuidade aos protocolos do experimento 1 e 2 descritos na **Figura 2**.

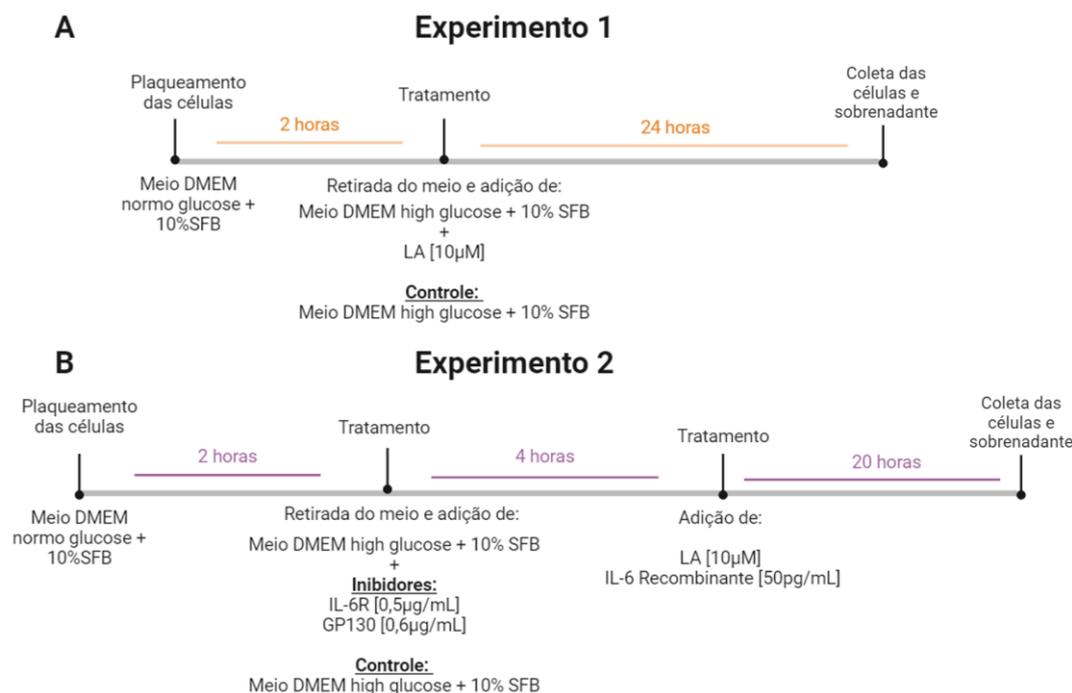


Figura 2. Desenho experimental 1 (A) e 2 (B) realizado com os macrófagos peritoniais.

O sobrenadante coletado dos macrófagos foi processado para avaliação da produção de IL-6 pelo método de ELISA utilizando o kit Duo Set (R&D System, Mineápolis, MN, USA), sem incluir as amostras que receberam a IL-6 Recombinante durante o tratamento.

A expressão gênica de colágeno, tipo I, alfa 1 (*Col1a1*) nos macrófagos foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (rtPCR). Para isso, o RNA foi extraído das células coletadas em trizol, o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm e realizada a visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1,5%. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit High Capacity cDNA reverse transcription da Applied Bioscience (Life Technologies) para finalmente obtermos a quantificação da expressão gênica através do equipamento/software Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System utilizando SYBR™ Green Master Mix como fluoróforo (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). As amostras tiveram sua expressão relativa do gene alvo, *Col1a1*, determinada utilizando a fórmula 2-DDCt e os valores obtidos para o gene endógeno *UBC*.

As análises estatísticas foram realizadas no software Prisma GraphPad 8.0 por teste *t* não pareado ou por *One-Way* ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Apesar dos macrófagos não deterem o papel de principal tipo celular associado à produção de MEC, eles são influenciados grandemente por essa matriz, é o caso, por exemplo, dos tumores, onde

há um aumento na rigidez da matriz no microambiente tumoral e isso altera o comportamento dos macrófagos (LARSEN *et al.*, 2020). As correlações vão além da modulação de suas funções celulares, outros estudos têm demonstrado ainda que esse tipo celular é sim capaz de contribuir diretamente com a deposição de colágeno para formação de uma cicatriz pós-lesional, tendo sido visto em um contexto de lesão cardíaca em animais zebrafish, o que abre um novo campo de exploração (SIMÕES *et al.*, 2020).

Buscamos entender se os macrófagos poderiam estar operando da mesma forma no modelo de cicatrização em um meio com alta glicose (High glucose). Entretanto, os resultados de expressão gênica de *Col1a1* não foram diferentes nos macrófagos tratados com ácido graxo linoleico (LA), e não houve diferença perante o uso dos inibidores das vias da IL-6, o que parece demonstrar que o LA não age por meio dessa via de sinalização nos macrófagos em relação à expressão gênica de *Col1a1* (Figura 3).

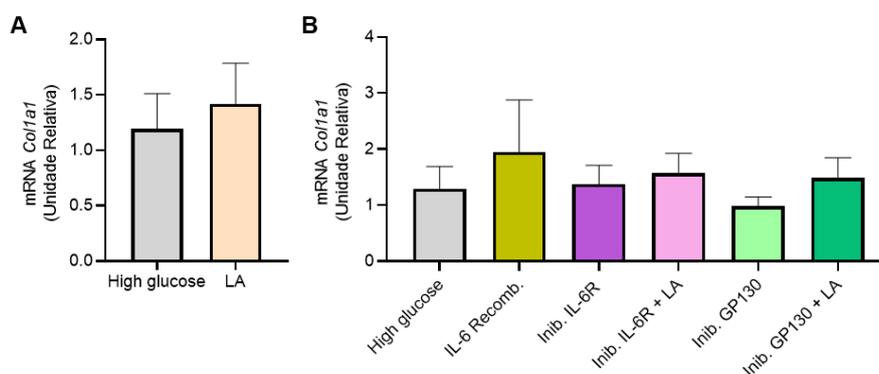


Figura 3. Expressão gênica de *Col1a1* nos macrófagos peritoniais. A expressão gênica de *Col1a1* foi avaliada por PCR em tempo real (rtPCR) com um n=5 para cada condição de tratamento do experimento 1 (A) e do experimento 2 (B). Valores são expressos como média \pm erro padrão da média. Inib.=Inibidor; Recomb.=Recombinante.

O mesmo comportamento foi visto na análise de quantificação da proteína IL-6 no sobrenadante dos macrófagos. Não houve diferença na produção e secreção extracelular dessa interleucina, por parte dos macrófagos peritoniais em meio high glucose, na presença de LA e/ou na presença dos inibidores da via da IL-6 (Figura 4).

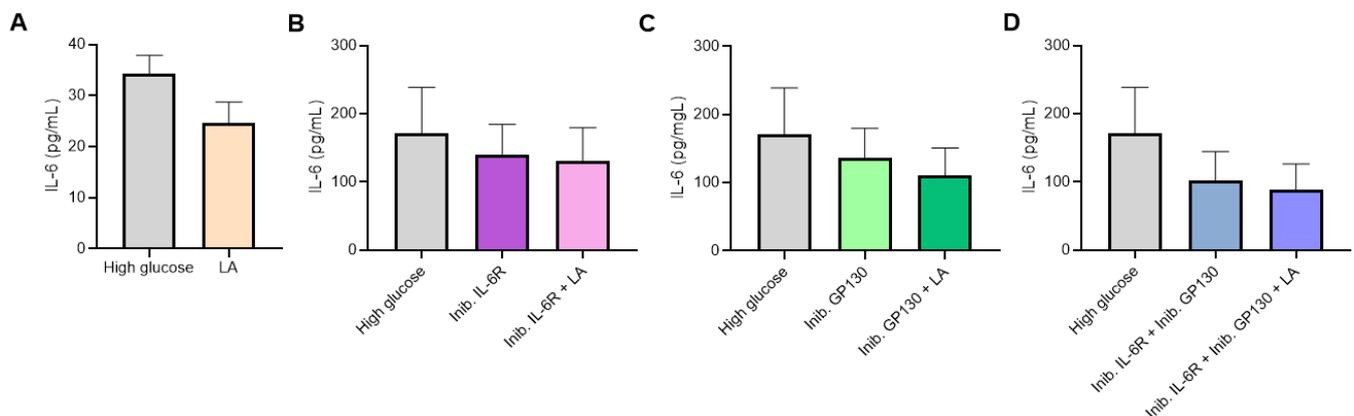


Figura 4. Quantificação da proteína IL-6 no sobrenadante dos macrófagos peritoniais. A quantificação proteica de IL-6 foi avaliada por ELISA com um n=7 para cada condição de tratamento do experimento 1 (A) e do

experimento 2 (B), sendo excluídas as condições nas quais havia a IL-6 Recombinante. Valores são expressos como média ± erro padrão da média. Inib.=Inibidor; Recomb.=Recombinante.

CONCLUSÕES:

Os resultados preliminares desse estudo direcionam para a conclusão de que a expressão gênica de *Col1a1*, em macrófagos peritoniais, e a produção de IL-6, no sobrenadante dessas células, na presença de meio com alta glicose, não é regulada na presença de LA e/ou na presença dos inibidores dos receptores de IL-6. Contudo um maior número de análises é necessário para compreender de forma mais fidedigna os mecanismos envolvidos com o reparo tecidual e o papel do LA nesse cenário.

BIBLIOGRAFIA

- ABDALLAH, F.; MIJOUIN, L.; PICHON, C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–17, 2017.
- BURGESS, J. L. *et al.* Diabetic Wound-Healing Science. **Medicina**, v. 57, n. 10, p. 1072, 8 out. 2021.
- GALLUCCI, R. M. *et al.* Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 15, p. 2525–2531, dez. 2000.
- GALLUCCI, R. M. *et al.* Interleukin 6 Indirectly Induces Keratinocyte Migration. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 3, p. 764–772, mar. 2004.
- HOPKINSON-WOOLLEY, J. *et al.* Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 5, p. 1159–1167, 1 maio 1994.
- International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021.
- LARSEN, A. M. H. *et al.* Collagen Density Modulates the Immunosuppressive Functions of Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 5, p. 1461–1472, 1 set. 2020.
- LIN, Z.-Q. *et al.* Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 6, p. 713–721, 1 jun. 2003.
- NIRENJEN, S. *et al.* Exploring the contribution of pro-inflammatory cytokines to impaired wound healing in diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1216321, 27 jul. 2023.
- NISHIKAI-YAN SHEN, T. *et al.* Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0178232, 23 maio 2017.
- PATEL, S. *et al.* Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108615, abr. 2019.
- PEÑA, O. A.; MARTIN, P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 8, p. 599–616, ago. 2024.
- RODRIGUES, H. G. *et al.* Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165115, 20 out. 2016.
- SILVA, J. R. *et al.* Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: From Inflammation to Repair. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–17, 2018.
- SIMÕES, F. C. *et al.* Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 600, 30 jan. 2020.