

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA IL-6 NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS POR MEIO DE FERRAMENTAS DE TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA

Palavras-Chave: CICATRIZAÇÃO, DIABETES, TRANSCRIPTÔMICA

Autores(as):

ISABELA BUQUIO BACCARIN, FCA-UNICAMP

**Dr^(a). VINÍCIUS DE REZENDE RODOVALHO (co-orientador), Laboratório Nacional de
Computação Científica - LNCC**

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

INTRODUÇÃO:

O reparo tecidual é um processo altamente regulado que ocorre em três fases principais: inflamação, proliferação e remodelamento. Cada etapa envolve a atuação coordenada de células específicas, bem como a produção de mediadores moleculares que orquestram as etapas até a reorganização da matriz extracelular (MEC) e a formação do novo tecido (PEÑA; MARTIN, 2024; EMING *et al.*, 2014). Dentre esses mediadores, a interleucina-6 (IL-6) parece ter um papel multifuncional, participando da ativação de fibroblastos, deposição de colágeno e organização da MEC, em sinergia com fatores como TGF- β (*transforming growth factor-beta*) (WONG *et al.*, 2025).

Contudo, em indivíduos com diabetes mellitus (DM), esse processo se encontra comprometido, resultando em retardo na cicatrização, maior risco de infecções e formação de úlceras cutâneas, como as úlceras do pé diabético (DFU, Diabetic Foot Ulcer). Neste trabalho, exploramos perfis de expressão gênica em tecido cutâneo humano de pacientes saudáveis ou portadores de diabetes, com ou sem lesão, contribuindo com evidências transcriptômicas complementares aos dados previamente obtidos em modelos experimentais do grupo, onde também há protagonismo das citocinas supracitadas.

METODOLOGIA:

As análises foram realizadas partindo de dois conjuntos de dados públicos depositados com os números de BioProject PRJNA555081 e PRJNA601464 e identificadores GEO GSE134431 e GSE143735, respectivamente (SAWAYA *et al.* 2020; THEOCHARIDIS *et al.* 2020). O primeiro conjunto, GSE199939, contém amostras da pele do pé de pacientes saudáveis, não portadores de diabetes mellitus (Control), e amostras de úlceras do pé de pacientes portadores de diabetes (DFU, Diabetic Foot Ulcer). O segundo conjunto de dados públicos, GSE134431, contém amostras da pele do pé de pacientes portadores de diabetes mellitus, sem úlcera (DFS, Diabetic Foot Skin), com úlcera que cicatrizou (DFU_healer), ou com úlcera que não cicatrizou (DFU_nonhealer).

A extração dos dados brutos, metadados e arquivos fastq foi realizada com o pipeline nf-core/fetchngs (ref: 10.5281/zenodo.5070524), utilizando os identificadores IDs GEO como entrada para recuperação dos dados

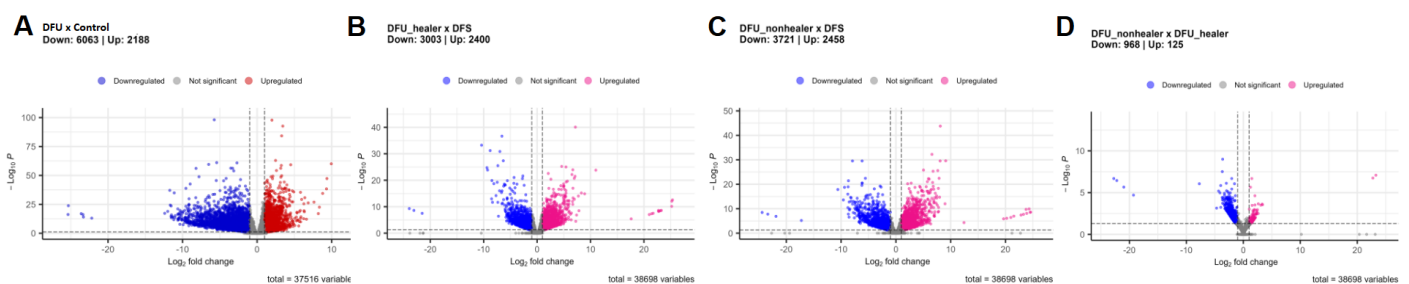
públicos. A análise transcriptômica foi realizada com um pipeline específico para RNA-seq (nf-core/rnaseq; ref: 10.5281/zenodo.1400710), aplicando os parâmetros *default* da versão 3.17.0 do pipeline. O genoma de referência utilizado foi o GRCh38 (do inglês, Genome Reference Consortium Human Build 38). O relatório de qualidade do pipeline do sequenciamento de RNA, MultiQC, foi avaliado a fim de garantir a qualidade dos processos (EWELS *et al.* 2016).

Para análise da abundância diferencial entre os genes, foi utilizado o pipeline do Nextflow nf-core/differentialabundance (ref: 10.5281/zenodo.7568000). Os valores de expressão diferencial dos genes, e resultados estatísticos foram calculados pelo método DESeq2, com *cutoffs* $|\log_2FC| > 1$ e *padj* (*q value*) < 0.05 . Para a visualização dos genes diferencialmente expressos entre os grupos, foi utilizado o pacote EnhancedVolcano (BLIGHE; RANA; LEWIS, 2018) na linguagem R. A análise de enriquecimento de conjuntos de genes (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) foi realizada no próprio pipeline nf-core/differentialabundance, utilizando a coleção Hallmark do MSigDB (LIBERZON *et al.*, 2015). A análise de enriquecimento funcional com Over-Representation Analysis (ORA), utilizou do pacote clusterProfiler 4.0 (WU *et al.*, 2021) na linguagem R, com a base de vias do Reactome Pathway Knowledgebase (MILACIC *et al.*, 2024). Os resultados de termos funcionais enriquecidos foram visualizados por meio de gráficos do tipo *dot plot*. O pacote ComplexHeatmap (GU *et al.*, 2016) foi utilizado para construção de *heatmaps* com transcritos das vias enriquecidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

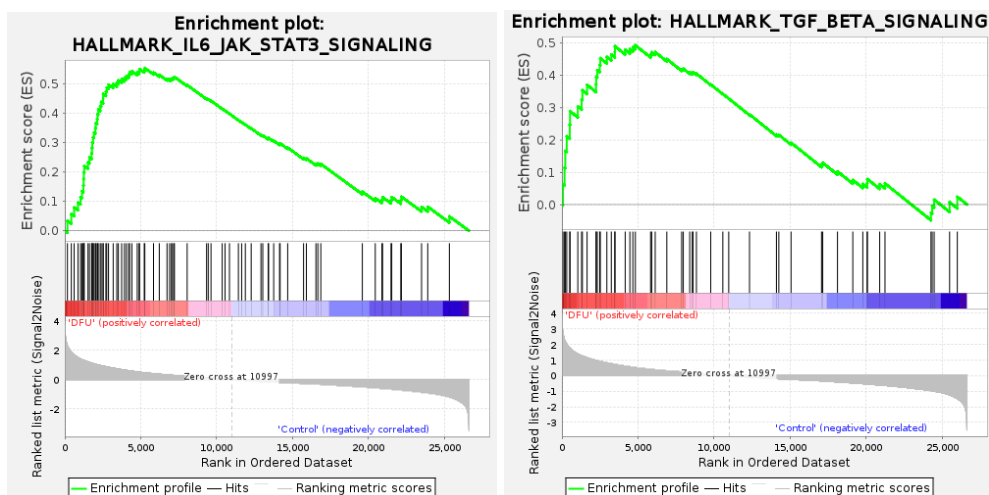
A análise de expressão diferencial revelou um conjunto de genes significativamente modulados entre os grupos. O gráfico **1A** se refere ao conjunto de dados GSE199939, e os gráficos **1 B-D** são referentes à cada comparação entre os três grupos amostrais do conjunto de dados GSE134431. Comparações entre indivíduos controles (Control ou DFS) e indivíduos com lesão (DFU), independente da cicatrização ter ocorrido ou não, mostraram modulações na ordem de milhares de genes (**Figura 1A-C**). Enquanto a comparação entre os subgrupos de pacientes DFU, ou seja, healers e non-healers, revelaram diferenças mais sutis, com 125 genes regulados positivamente e 968 genes regulados negativamente (**Figura 1D**).

Figura 1. Volcano Plot dos DEGs



Os resultados do GSEA utilizando os conjuntos de genes da coleção “Hallmarks” do MSigDB revelou vias significativamente enriquecidas no grupo DFU em comparação ao Control. Dentre elas, merece destaque, as vias "IL6_JAK_STAT3_SIGNALING" e "TGF_BETA_SIGNALING" conforme ilustrado nos *Enrichment Plots* (**Figura 2**). Ambas as vias estão envolvidas de certa forma em processos do reparo tecidual, o TGF- β é uma das principais citocinas de controle da síntese de colágeno, e um dos eixos pelo qual desempenha tal função leva como protagonista também a IL-6, se trata do eixo TGF- β / IL-6/IL-17A descrito por DUFOUR *et al.* (2018). Além do mais, são duas vias de interesse para o enriquecimento dos achados experimentais do grupo.

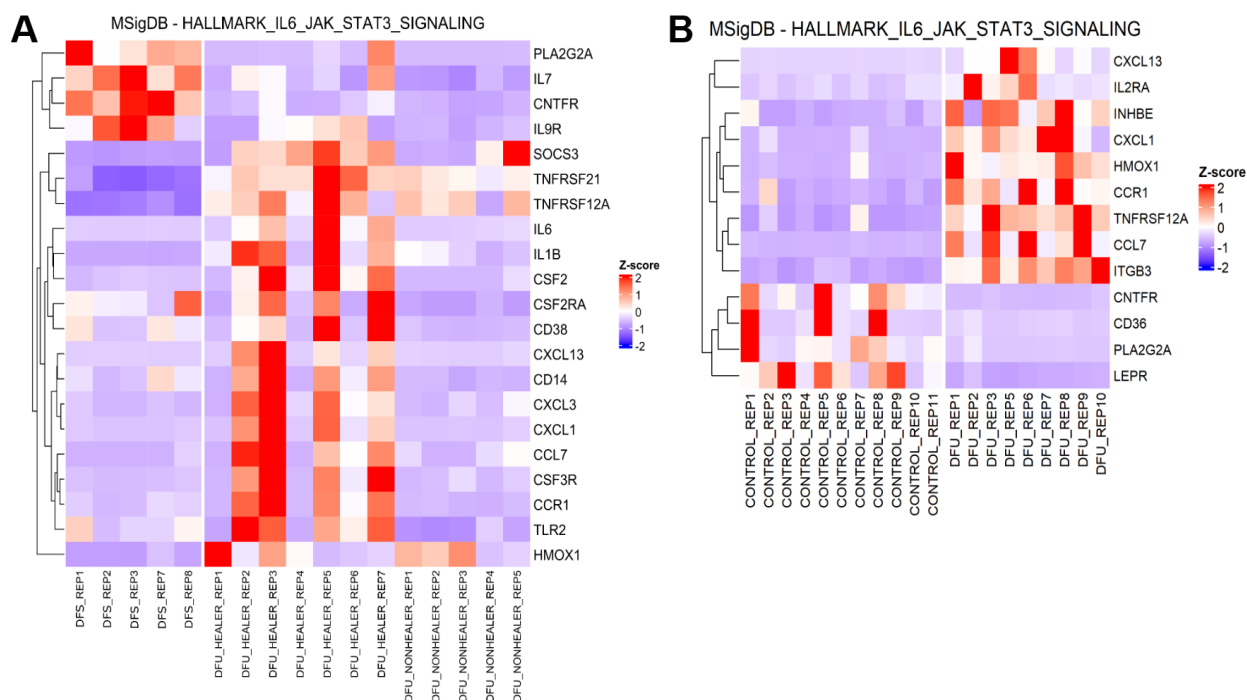
Figura 2. Enrichment plots. Vias Hallmarks “IL6_JAK_STAT3_SIGNALING” e “TGF_BETA_SIGNALING” na comparação DFU x Control do dataset GSE199939.



Analisando o heatmap dos genes da via “IL6_JAK_STAT3_SIGNALING”, é possível observar que o grupo DFU_healer apresenta uma expressão que contrasta muito mais com a dos outros dois grupos, enquanto o DFU_nonhealer apresentou um perfil de expressão mais semelhante ao da pele diabética não ulcerada (DFS) (**Figura 3A**). Já na comparação entre a expressão dos genes dessa via entre a pele de pacientes saudáveis (Control) e diabéticos com úlcera (DFU) (**Figura 3B**), os padrões de expressão foram marcadamente distintos entre controle e DFU, reforçando o impacto do contexto fisiopatológico da úlcera diabética na via da IL-6.

Figura 3. Heat Map da via “IL6_JAK_STAT3_SIGNALING” de Hallmarks - MSigDB.

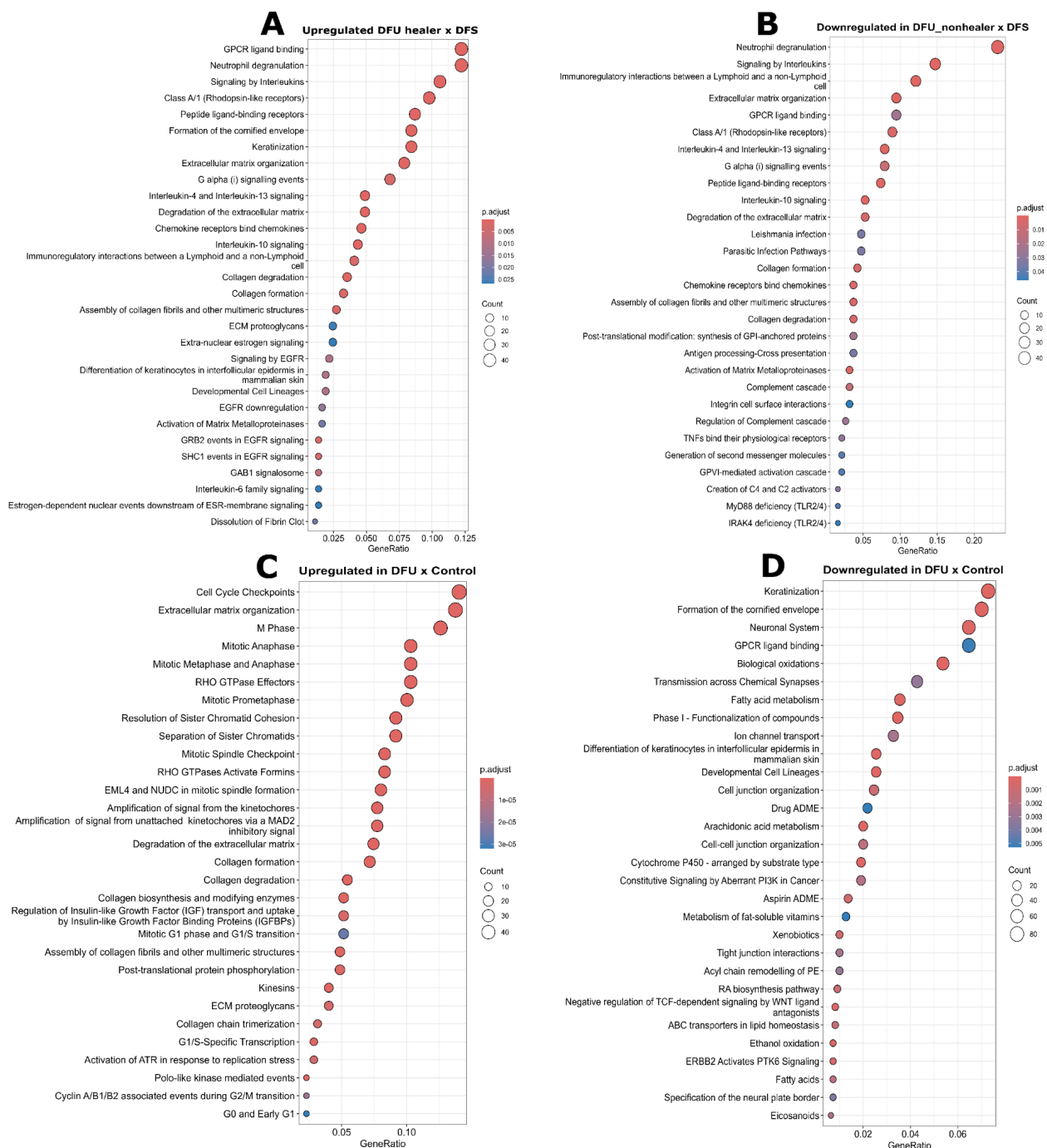
(A) GSE134431. (B) GSE199939.



Os *dot plots* das análises de enriquecimento funcional do tipo *Over-Representation Analysis* (ORA), com os DEGs, e as vias da base Reactome, apresentam vários termos enriquecidos, porém, neste momento, foram destacados alguns dos mais relevantes, considerando a pertinência biológica e o espaço disponível. Na

comparação entre DFS e DFU_healer, de forma positivamente regulada no grupo DFU_healer, aparece novamente a IL-6, na via "Interleukin-6 family signaling", além de outras vias com protagonismo da sinalização de citocinas. Estão enriquecidos também neste grupo processos relacionados à MEC e ao colágeno sugerindo processos regenerativos (**Figura 4A**). Na comparação entre DFU_nonhealer e DFU_healer, vias relacionadas à matriz extracelular, ao colágeno e à sinalização da IL-10 estavam moduladas de forma reprimida no grupo DFU_nonhealer, corroborando com a não cicatrização presente nestes pacientes (**Figura 4B**). Na comparação entre Controle e DFU, o grupo DFU apresenta uma regulação positiva de vias relacionadas à MEC e processamento de colágeno (**Figura 4C**), condizente com o remodelamento tecidual necessário nesse grupo amostral. Já vias associadas ao metabolismo lipídico e à queratinização estavam significativamente reprimidas em comparação ao Controle (**Figura 4D**).

Figura 4. Dot Plots. Análise de enriquecimento funcional do tipo ORA com vias da base Reactome.



CONCLUSÕES:

Os achados apresentados até aqui suportam a hipótese de que a IL-6 desempenha um papel na fisiopatologia da cicatrização de feridas em portadores de diabetes. Suas alterações podem estar relacionadas com a não-cicatrização dessas feridas, visto pela análise do dataset GSE134431. Ou, como mostra o dataset GSE199939, ao comparar a pele saudável com a de uma úlcera diabética, há possibilidades de que haja, no contexto do diabetes mellitus, uma alteração nas funções dessa citocina, podendo ser um dos mecanismos que dificulta a cicatrização nesses pacientes. Contudo, um maior número de análises é necessário para compreender de forma mais fidedigna os mecanismos envolvidos com o reparo tecidual e o papel da IL-6 nesse cenário.

APOIO FINANCEIRO:

FAPESP, CNPq. Este trabalho tem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Código: 001.

BIBLIOGRAFIA

- BLIGHE, Kevin; RANA, S.; LEWIS, M. **EnhancedVolcano**. Bioconductor, 2018. Disponível em: <<https://bioconductor.org/packages/EnhancedVolcano>>.
- DUFOUR, Aleksandra Maria *et al.* Interleukin-6 and Type-I Collagen Production by Systemic Sclerosis Fibroblasts Are Differentially Regulated by Interleukin-17A in the Presence of Transforming Growth Factor-Beta 1. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 13 ago. 2018.
- EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, 3 dez. 2014.
- EWELS, Philip *et al.* MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 1 out. 2016.
- GU, Zuguang; EILS, Roland; SCHLESNER, Matthias. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016.
- KOLBERG, Liis *et al.* g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W207–W212, 5 jul. 2023.
- LIBERZON, Arthur *et al.* The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417–425, 23 dez. 2015.
- MILACIC, Marija *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. D1, p. D672–D678, 5 jan. 2024.
- PEÑA, Oscar A.; MARTIN, Paul. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 8, p. 599–616, ago. 2024.
- SAWAYA, Andrew P. *et al.* Deregulated immune cell recruitment orchestrated by FOXM1 impairs human diabetic wound healing. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4678, 16 set. 2020.
- THEOCHARIDIS, Georgios *et al.* Integrated Skin Transcriptomics and Serum Multiplex Assays Reveal Novel Mechanisms of Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. **Diabetes**, v. 69, n. 10, p. 2157–2169, out. 2020.
- WONG, Rachel Si-Yin *et al.* The role of cytokines in wound healing: from mechanistic insights to therapeutic applications. **Exploration of Immunology**, v. 5, p. 1003183, 11 fev. 2025.
- WU, Tianzhi *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The Innovation**, v. 2, n. 3, p. 100141, ago. 2021.