

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RUBYA PEREIRA ZACCARON

**EFEITO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL-1 β ASSOCIADO À
FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS
DIABÉTICAS**

CRICIÚMA, 2021

RUBYA PEREIRA ZACCARON

**EFEITO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL-1 β ASSOCIADO À
FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS
DIABÉTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Z13e Zaccaron, Rubya Pereira.

Efeito de um peptídeo inibidor de IL-1 β associado à fotobiomodulação no reparo tecidual de feridas diabéticas / Rubya Pereira Zaccaron. - 2021.

59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Diabetes Mellitus. 2. Cicatrização de feridas. 3. Fotobiomodulação. 4. Peptídeos. 5. Lasers em medicina. I. Título.

CDD 23. ed. 617.1406

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 385

Com início às 14h (quatorze horas) de vinte e um de dezembro de 2021 (dois mil e vinte e um), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **RUBYA PEREIRA ZACCARON**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada **“EFEITOS DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL-1 β ASSOCIADO A FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS DIABÉTICAS”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Gislaine Tezza (Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesseis horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de dezembro de 2021 (dois mil e vinte e um).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

**Dedico este trabalho aos meus pais
e aos indivíduos com Diabetes Mellitus.**

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação representa a concretização de um sonho plantado por Ele no meu coração há alguns anos. Como um pai dedicado, Deus plantou na minha vida pessoas que me impulsionaram e me auxiliaram na finalização deste ciclo, para que eu pudesse aprender e me desenvolver o máximo possível. A Ele meu primeiro agradecimento, por me fortalecer e me preparar durante este período para receber um novo tempo.

Agradeço aos meus pais, Teresinha e Claudio, pelo caminho que trilharam e que me trouxe até aqui, por me darem a vida e ensinarem o valor que possui o estudo. Apesar de tudo, hoje sei que só o amor constrói. De forma especial, agradeço a minha mãe por ser uma mulher de fibra, que nadou contra a corrente com garra por mim, atravessou desertos acompanhada da fé e do otimismo para que eu pudesse ir mais longe. Mãe, obrigada por confiar em mim e fazer dos meus sonhos os teus também, honrarei sempre tua história.

A todos do grupo de pesquisa em Proteção e Reparo Tecidual, obrigada pelo incentivo. Especialmente ao meu orientador Paulo, por me apresentar inúmeras oportunidades, por confiar nos meus projetos e permitir me descobrir dentro da pesquisa; por me alertar dos riscos, mas me apoiar independente da minha escolha, tua vida impactou minha história. Aos meus amados amigos e colegas de laboratório, Laura, João, Guga, Carol, Duda, Leandro, Germano, Lígia, Dani, por cada momento (científico ou não), pelo acolhimento e por trabalharem duro comigo neste projeto. Amo vocês e amo nosso grupo.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada pela parceria firmada neste trabalho, em especial ao professor Ricardo (campeão mineiro de truco e grande pesquisador) por me ensinar com paciência e me inserir em uma linha tão inovadora. A Rahisa, Mari, Maria Eduarda, pela ajuda e amizade construída. A Ellen, que trabalhou muito para viabilizar esta pesquisa e vibrou comigo em cada resultado, obrigada de coração.

Ao pessoal do Biotério e a todos os funcionários que trabalharam para tornar viável a realização desta pesquisa; a UNESC e a CAPES pelo apoio financeiro, muito obrigada!

A todos que me ajudaram de alguma forma, meu muito obrigada! Recebo com disposição este novo ciclo, lembrando de todos que estiveram comigo!

*“A teoria sem a prática vira 'verbalismo', assim como a prática sem teoria, vira
ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a
práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.”*

Paulo Freire

RESUMO

A diabetes mellitus (DM) é caracterizada por uma desordem metabólica severa que apresenta repercussões sistêmicas a longo prazo. A hiperglicemia crônica provoca lentidão no processo cicatricial devido à inflamação prolongada que impede a progressão da regeneração. Uma das características da ferida diabética são os níveis elevados de IL-1 β , que aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio e perpetuam o processo inflamatório. A fotobiomodulação (FBM) é considerada uma intervenção não farmacológica que consiste na aplicação de uma forma de luz não ionizada, a qual inclui o laser de baixa potência e possui efeitos anti-inflamatórios e bioestimulatórios que aceleram o processo cicatricial. A associação da FBM ao desenvolvimento de um peptídeo com capacidade de atenuar as respostas desencadeadas pela IL-1 β , representa uma opção promissora para o tratamento de lesões epiteliais; já que o excesso de IL-1 β provoca a senescência dos fibroblastos, redução na expressão de fatores de crescimento e degradação de proteínas da MEC. Inibidores de IL-1 β encontrados atualmente são de difícil viabilidade devido ao potencial citotóxico, valores abusivos e administração invasiva, portanto, a aplicação deste peptídeo em feridas diabéticas representa uma intervenção promissora para auxiliar na resolução da resposta inflamatória e progressão do processo regenerativo. Desta forma, este trabalho visa aplicar uma molécula inibidora de IL-1 β associada a irradiação com FBM, como estímulo à progressão do processo regenerativo de lesão epitelial em camundongos diabéticos. Após a indução do modelo de DM com estreptozocina (STZ), o modelo de lesão cutânea foi realizado através de excisão cirúrgica. Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6, distribuídos em 5 grupos experimentais (n:12): Lesão Epitelial (LE); DM + LE; DM+ LE+ Peptídeo Inibidor de IL-1 β ; DM+LE+FBM; DM+LE+FBM-Peptídeo Inibidor de IL-1 β . O tratamento foi iniciado 12 horas após a indução da ferida, e realizado diariamente durante cinco dias. Após 24 horas da última aplicação, foi realizada a eutanásia dos animais e a borda externa da ferida foi removida, processada e armazenada. Os resultados obtidos demonstram que o grupo DM+LE+FBM-pIL-1 β provocou a redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias, aumento de TGF- β e manutenção do estado redox celular com consequente redução no tamanho da ferida em cm² seis dias após a lesão, demonstrando o efeito do tratamento associado em acelerar a reepitelização.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, Cicatrização, Inflamação, Fotobiomodulação, Peptídeo.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is characterized by a severe metabolic disorder that has long-term systemic repercussions. Chronic hyperglycemia slows down the healing process due to prolonged inflammation that impedes the progression of regeneration. One of the characteristics of the diabetic wound is the high levels of IL-1 β , which increases the expression of adhesion molecules in the endothelium and perpetuates the inflammatory process. Photobiomodulation (FBM) is considered a non-pharmacological intervention consisting in the application of a form of non-ionized light, which includes a low-power laser and has anti-inflammatory and biostimulatory effects that accelerate the healing process. The association of FBM with the development of a peptide capable of attenuating the responses triggered by IL-1 β , represents a promising option for the treatment of epithelial lesions; since excess IL-1 β causes fibroblast senescence, reduced expression of growth factors and degradation of ECM proteins. Currently found IL-1 β inhibitors are difficult to be viable due to cytotoxic potential, abusive values and invasive administration, therefore, the application of this peptide in diabetic wounds represents a promising intervention to aid in the resolution of the inflammatory response and progression of the regenerative process. Thus, this work aims to apply an inhibitory molecule of IL-1 β associated with irradiation with FBM, as a stimulus to the progression of the regenerative process of epithelial damage in diabetic mice. After induction of the DM model with streptozocin (STZ), the skin lesion model was performed through surgical excision. Sixty C57BL/6 mice were used, distributed in 5 experimental groups (n:12): Epithelial Lesions (LE); DM + LE; DM+ LE+ IL-1 β Inhibitory Peptide; DM+LE+FBM; DM+LE+FBM-IL-1 β Inhibitor Peptide. Treatment was started 12 hours after wound induction, and carried out daily for five days. Twenty-four hours after the last application, the animals were euthanized and the outer edge of the wound was removed, processed and stored. The results obtained demonstrate that the DM+LE+FBM-pIL-1 β group caused a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines, an increase in anti-inflammatory cytokines, an increase in TGF- β and maintenance of the cellular redox state with a consequent reduction in size of the wound in cm² six days after the injury, demonstrating the effect of the associated treatment in accelerating re-epithelialization.

Keywords: Diabetes Mellitus, Wound Healing, Inflammation, Photobiomodulation, Peptide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Desordem no processo fisiológico das fases de reparo na DM.....17
- Figura 2:** Possível mecanismo de ação do laser na mitocôndria. Moléculas com cobre em sua composição são excitadas pelo laser, dessa maneira aumentam a taxa de transferência de elétrons do citocromo *c* oxidase22
- Figura 3:** Mecanismos de ação da fotobiomodulação no tratamento de feridas diabéticas.....24
- Figura 4:** Desenho Experimental.....27
- Figura 5:** Modelo de irradiação do laser. A figura exemplifica os pontos onde no tratamento foi irradiado o laser, em cinco regiões das bordas da ferida.....28
- Figura 6:** Representação esquemática da evolução temporal da diabetes induzida por STZ (A). Os camundongos foram expostos a injeção de STZ (50 mg/kg) ou PBS (Sham+LE) por 5 dias consecutivos, mudanças típicas nos níveis de glicose no sangue são ilustradas. Peso corporal total (B) mensurado ao longo das semanas. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).....33
- Figura 7:** Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis proteicos de interleucinas pró inflamatórias: IL1 β , TNF α em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).....34
- Figura 8:** Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis proteicos de interleucinas anti-inflamatórias: IL-4 e IL-10 e níveis do fator de crescimento TGF- β em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).....36

Figura 9: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis de nitrito (A), marcadores de dano oxidativo: Carbonil (B) e Sulfidrila (C) e de defesa antioxidante: SOD (D) em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).....37

Figura 10: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre parâmetros de redução da área das feridas em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).....38

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP Adenosina Trifosfato, do inglês "*adenosine triphosphate*"

ATF-3 Fator de transcrição de ativação 3

CTE Cadeia Transportadora de Elétrons

DM Diabetes Mellitus

DTNB Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EGF Fator de Crescimento Epidérmico

ERN Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO Espécies Reativas do Oxigênio

FBM Fotobiomodulação

IFN- γ Interferon Gama

IGF1 Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IL-1 β Interleucina 1 beta

IL-1R Receptor de Interleucina 1 beta

IL1-Ra Antagonista do receptor de Interleucina 1 beta

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

LBP Laser de Baixa Potência

MAPK Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MDA Malondialdeído

MEC Matriz Extracelular

MMPs Metaloproteinases de Matriz

NF- κ B Factor Nuclear Kappa B

NRF2 Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

PI3K/AKT Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B

PTEN Fosfatase e homólogo de tensina

PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH Potencial hidrogeniônico

SOD Superóxido Dismutase

STZ Estreptozitocina, do inglês "*Streptozitocin*"

TGF- β Fator de Crescimento de Transformação - β

TNB Tetrametilbenzidina

TNF Fator de Necrose Tumoral

VEGF Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PROCESSO CICATRICIAL NA DIABETES MELLITUS.....	15
1.2 PAPEL DA IL-1 β NA FERIDA DIABÉTICA	18
1.3 FOTOBIMODULAÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 SÍNTESE DO PEPTÍDEO.....	26
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
3.3 TRATAMENTO.....	27
3.4 MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL.....	28
3.5 EUTANÁSIA	29
3.6 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS	29
3.7 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO.....	30
3.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	31
3.8.1 Determinação intracelular de óxido nítrico	31
3.8.2 Marcadores de dano oxidativo	31
3.8.3 Defesas antioxidantes	32
3.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS.....	32
4 RESULTADOS	33
4.1 MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE	33
4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO.....	34
4.3 MARCADORES DE ERN, DANO OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
4.4 ANÁLISE DO TAMANHO DA ÁREA DAS FERIDAS	38

5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSO CICATRICIAL NA DIABETES MELLITUS

A Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia metabólica multifacetada que atinge mais de 340 milhões de pessoas em todo o mundo; de forma geral, caracterizada pela capacidade reduzida ou nula de metabolizar glicose, causada pela deficiência absoluta na secreção de insulina (DM tipo 1) ou pela resistência periférica à insulina associada à resposta inadequada da secreção de insulina (DM tipo 2) (Kumar, 2013). Independentemente do tipo de DM, o quadro de hiperglicemia crônica desencadeia complicações similares a longo prazo, e dentre elas o retardo no processo de cicatrização de lesões epiteliais (Patel et al., 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 20% dos indivíduos com DM desenvolvem feridas crônicas, responsáveis por aproximadamente 50%-70% de todas as amputações de membros inferiores no mundo (Vijayakumar, 2019).

Outras complicações como a neuropatia periférica, dificultam a identificação de agressores externos e a retirada do estímulo nocivo; disfunções vasculares e endoteliais provocam uma redução do fornecimento de oxigênio e nutrientes para o tecido, promovendo um quadro de hipóxia local com consequente necrose do tecido epitelial (Kavitha, 2014). Estes fatores secundários à DM são facilitadores para o rompimento do tecido cutâneo e consequentemente, o surgimento das feridas diabéticas.

A partir deste rompimento tecidual, iniciam-se respostas fisiológicas complexas que caracterizam o começo do processo de reparo cerca de 24 horas após a lesão (Baum e Arpey, 2005). O reparo tecidual na DM ocorre de forma lenta e desorganizada, resultando em uma ferida crônica que pode levar de meses a anos para restaurar a integridade das estruturas (Moura et al., 2019). Em tecido saudável, a cicatrização é descrita como quatro estágios sobrepostos e precisamente coordenados: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação. Porém, as feridas diabéticas apresentam características celulares e moleculares que causam a estagnação do processo na fase inflamatória, impedindo a progressão da regeneração (Tan et al., 2021). Esta inflamação persistente ocorre devido a uma resposta imune inadequada que estimula a migração excessiva de células inflamatórias, com

consequente aumento nos níveis de citocinas pró inflamatórias, alta concentração de proteases e baixos níveis de fatores de crescimento (Patel et al., 2019).

Após a resposta imediata de hemostasia com a agregação, degranulação de plaquetas e a formação de um coágulo de fibrina, ocorre a transição para a fase inflamatória, com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos, primeiras células a chegarem ao tecido lesado, seguidos por monócitos e linfócitos. Essas células inflamatórias são atraídas para o local da lesão por citocinas, incluindo TGF β e PDGF (Singer e Clark, 1999; Guo e Dipietro, 2010). Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana) e auxiliam na limpeza da área lesada produzindo radicais livres, considerados essenciais para proteger o organismo contra bactérias invasoras e outros microrganismos (Silva et al., 2010). É durante a fase inflamatória que ocorre a maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) através da bomba respiratória, estimulada pela migração de neutrófilos e macrófagos (Kanta et al., 2011).

Os macrófagos com fenótipo pró inflamatório (M1) migram para a ferida de 48 a 96 horas após a lesão, essa migração celular continua o processo de fagocitose e promove o término do debridamento iniciado pelos neutrófilos, aumentando a secreção de citocinas. Após a fagocitose, os macrófagos assumem o fenótipo anti-inflamatório (M2), afim de promover a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição na fase proliferativa (Broughton et al., 2006).

O quadro de hiperglicemia crônica e o estresse oxidativo presentes na DM, modificam a epigenética dos macrófagos, o que resulta na alteração desregulada de fenótipo e a permanência do M1 no tecido, um dos maiores responsáveis pela estagnação do processo regenerativo. Conseqüentemente, essa função prejudicada dos macrófagos estimula a expressão sustentada de citocinas pró-inflamatórias, e promove um déficit na expressão de fatores de crescimento, inibindo a proliferação de queratinócitos e fibroblastos (Loot et al., 1991). Além desta alteração epigenética, fatores como a hipóxia decorrente da glicação da hemoglobina, estreitamento dos vasos sanguíneos e complicações endoteliais, agravam a disfunção de macrófagos e neutrófilos. Estes eventos biológicos promovem uma fase inflamatória persistente, com níveis elevados e sustentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF-

α , impedindo a formação do tecido de granulação e progressão para a fase proliferativa, como demonstrado na figura 1.

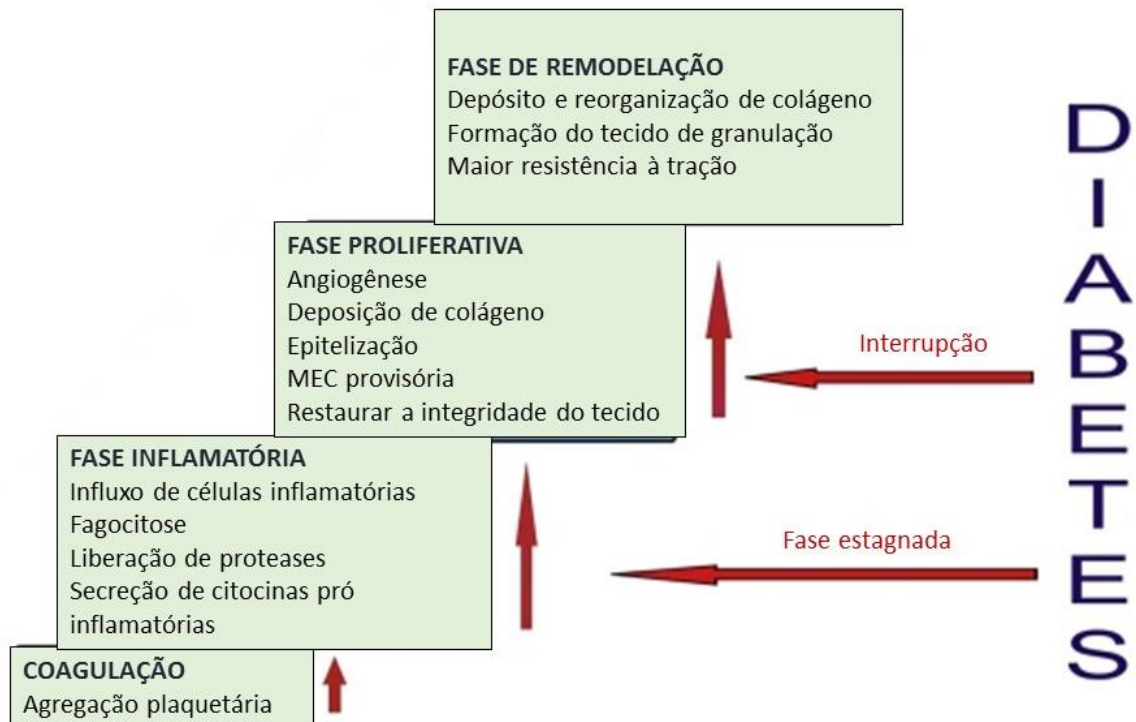


Figura 1: Desordem no processo fisiológico das fases de reparo na DM (Adaptado de Patel et al., 2019).

Em tecidos saudáveis, o término da liberação de citocinas pró-inflamatórias acontece cerca de 4 dias após a lesão, nesta etapa temos liberação de citocinas anti-inflamatórias (interleucina-10/ IL-10 e Interleucina/ IL-4) que estimulam o início da fase proliferativa ou de granulação caracterizada pela reepitelização da epiderme e pelo reparo da camada dérmica ou mesenquimal subjacente. Esta fase ocorre em quatro etapas fundamentais (epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno), com a derme restaurada por fibroblastos invasores e proliferantes que sintetizam e secretam proteínas da matriz extracelular embrionária e também liberam fatores de crescimento como TGF- β 1 (Clark, 1990; Clark, 1996; Leask e Abraham, 2004).

Durante a fase proliferativa do reparo da ferida, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (Van, 1967). A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado

de quiescência (Li et al., 2005). O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF, em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno do tipo I e a transformar-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (Barrientos et al., 2008). Na DM, a reepitelização é afetada devido à sustentação da inflamação que impede a expressão de marcadores que estimulam a migração de queratinócitos (Bhattacharya et al., 2015; Icli et al., 2016).

Na fase de maturação ou remodelamento, ocorre a deposição de colágeno de forma organizada. O colágeno que é produzido de forma inicial apresenta espessura com menor diâmetro do que o colágeno existente na pele normal. Durante a fase de remodelação, a formação de tecido de granulação cessa, devido a apoptose das células responsáveis (Mandelbaum et al., 2003; Profyris et al., 2012). Com a maturação da ferida, a composição da matriz extracelular sofre alterações.: o colágeno tipo III depositado durante a fase proliferativa é lentamente degradado e substituído por colágeno mais forte, tipo I. Este tipo de colágeno é orientado como pequenos feixes paralelos, que diferem drasticamente da orientação tecidual do colágeno presente na derme normal. Em direção aos estágios finais da cicatrização, a ferida sofre uma resposta contrátil através da ação dos miofibroblastos. Em virtude de seus múltiplos pontos de ligação ao colágeno, essas células ricas em actina contraem e reduzem a área da superfície da cicatriz (Gurtner, 2007). O sucesso do reparo tecidual ocorrerá quando houver equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da antiga, o que não ocorre na DM (Lorena et al., 2002). A maturação do tecido é afetada principalmente pelo aumento significativo de metaloproteinases na ferida diabética, o que provoca a degradação excessiva de componentes saudáveis da MEC com concomitante acúmulo errôneo e variação na proporção dos tipos de colágeno, resultando na formação de um tecido com pouca função, incapaz de suportar carga ou tração (Brem et al., 2007; Goovit et al., 2014).

1.2 PAPEL DA IL-1 β NA FERIDA DIABÉTICA

A IL-1 β é uma das citocinas pró inflamatórias mais conhecidas e investigadas, sua via de sinalização está associada à imunidade inata, com ativação de cascatas características de receptores do tipo Toll-like e cascatas clássicas do NF- κ B e MAP quinases (Nosenko, 2019). A partir destas ativações, a IL-1 β desencadeia

respostas como aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio, associado ao estímulo à expressão de quimiocinas, que promovem o aumento na atividade de linfócitos e infiltração de células inflamatórias para o espaço extravascular (Naik et al., 2017).

Alguns estudos demonstram que a resposta desencadeada pelo excesso de IL-1 β possui papel patogênico durante o processo de regeneração da pele e da córnea, além de ser um agravante na fisiopatologia de muitas doenças inflamatórias, incluindo diabetes mellitus (Yan et al., 2016). O desequilíbrio na sinalização imunológica é uma das características observadas em pacientes diabéticos, onde níveis elevados de IL-1 desempenham papel central no processo inflamatório e impactam o processo de cura de feridas crônicas (Ishida et al., 2006).

Além do estímulo à super expressão de fatores que contribuem para a resposta inflamatória aguda, a IL-1 β possui capacidade de atuar sustentando a ativação do inflamassoma em macrófagos na ferida (Agostini et al., 2004). O inflamassoma por sua vez, promove ainda mais liberação de IL-1, mantendo um ciclo inflamatório através deste feedback positivo que evita a transição do macrófago em direção a um fenótipo anti-inflamatório. O ambiente pró-inflamatório encontrado em feridas diabéticas tem o potencial de sustentar um fenótipo de macrófago pró-inflamatório, estagnando o processo regenerativo que contribui para a formação de feridas crônicas (Dinarello, 2018). Além disso, outros sinais relevantes são desencadeados pelo excesso de IL-1 β , como a senescência dos fibroblastos, redução na expressão de fatores de crescimento e degradação de proteínas da MEC devido a altos níveis de metaloproteinases; portanto, o desenvolvimento de moléculas com capacidade de bloquear IL-1 β ou sua sinalização através do seu receptor, representam uma opção promissora para resolução da resposta inflamatória e progressão do processo regenerativo (Boraschi, 2013).

Sistemicamente, estudos demonstram que o bloqueio desta citocina em humanos e em camundongos, apresentou capacidade de otimizar o controle glicêmico e a função das células β pancreáticas (Osborn et al., 2008). Na pele, a utilização de antagonista de IL-1 apresentou capacidade de reduzir a formação de fibrose, além de induzir a uma mudança de fenótipo nos macrófagos e aumentar a expressão de fatores de crescimento na ferida (Thomay et al., 2009). Um estudo de Mirza et al. (2014), ressalta que a inibição de IL-1 β in vivo regulou negativamente o fenótipo de macrófago pró inflamatório e regulou positivamente a expressão de fatores que

auxiliam no processo de reepitelização em feridas diabéticas. A distribuição simples e tópica de uma matriz projetada através de um antagonista de IL-1, promoveu a redução dos níveis de citocinas pró inflamatórias, redução nos níveis de fibroblastos senescentes e níveis elevados de fatores de crescimento, com consequente fechamento acelerado da ferida em camundongos diabéticos (Tan et al., 2021).

Atualmente, diversas ferramentas de bioinformática são utilizadas para modelar tais moléculas. A bioinformática é uma área de pesquisa caracterizada como “a aplicação de ferramentas computacionais para organizar, analisar, compreender, visualizar e armazenar informações associadas a macromoléculas biológicas” (Luscombe et al., 2001). Esta área de pesquisa vem crescendo a cada dia, de modo que a partir de diversos bancos de dados, programas de visualização das estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas, bem como programas capazes de prever aminoácidos epitópicos, são grandes aliados na produção destas novas moléculas mais fáceis, estáveis e viáveis financeiramente de serem produzidas (Steiner, 2019).

Portanto, a bioinformática, possui potencial para o desenvolvimento de um peptídeo com capacidade de atenuar ou inibir a IL-1 β no tratamento de feridas crônicas ou em outras condições inflamatórias onde a sinalização de IL-1R desempenha um papel patológico. Entretanto, apesar de apresentarem resultados promissores, os inibidores de IL-1 β atualmente encontrados no mercado e utilizados em pesquisas possuem custo elevado e vias de administração invasivas. Em vista do exposto, a produção deste peptídeo pode acarretar em alto impacto econômico e social nos sistemas de saúde, visto que sua fabricação possui baixo custo financeiro.

A estrutura tridimensional da interação entre a IL1-Ra e o receptor IL-1R1 foi localizada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Zhang et al., 2008). Com o auxílio do programa de visualização de proteínas *Swiss PDB Viewer* (Guex e Peitsch, 1997), os aminoácidos-chaves da IL-1Ra, ou seja, aqueles que possuem interação com o receptor IL-1R1. A partir disso, foram avaliados e selecionados manualmente os resíduos que obtenham interação com o receptor IL-1R1 (Neshich et al., 2004). A partir disto, a sequência do peptídeo foi proposta com base na proximidade dos aminoácidos selecionados, como descrito no trabalho Machado de Ávila et al. (2014).

1.3 FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação (FBM) é considerada uma intervenção não farmacológica que consiste na aplicação de uma forma de luz não ionizada, a qual inclui o laser de baixa potência (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), diodos emissores de luz e outras luzes com um espectro mais amplo que varia de visível a infravermelho (Anders et al., 2015).

Por possuir uma estrutura heterogênea que é constantemente exposta à luz, o tecido cutâneo responde de forma eficiente à FBM devido a sua propriedade de absorção óptica que promove a infiltração de luz através do tecido (Jacques, 2013). O comprimento de onda do laser de baixa potência entre 600 e 1100 nm acomoda uma janela óptica onde a luz é maximizada por causar diminuição da dispersão de luz, que penetra e descarrega energia de forma efetiva (Yadav-Gupta, 2017; Jacques, 2013; Oyebode, 2021). A luz vermelha visível na faixa específica de 630-700nm possui capacidade de atingir diretamente as células e ser absorvida pelo sangue total e componentes na superfície da pele (Yadav-Gupta, 2017).

Uma vez que ocorre a incidência do seu feixe de luz sobre a pele, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (Karu, 1999). A FBM se baseia na aptidão da luz em causar alterações no metabolismo celular por meio de sua absorção pelas proteínas heme e citocromo c oxidase localizadas na mitocôndria ou na membrana plasmática da célula, atuando como um fotoceptor e um foto transdutor de sinal (Karu, 2010; Passarella, 2014). Esta ação na cadeia de transporte de elétrons e nas enzimas endógenas, desencadeia o aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à ativação de mensageiros secundários que por sua vez ativam as cascatas de sinalização necessárias (Silveira et al., 2010; Poyton e Ball, 2011).

A proteína citocromo c oxidase (polipeptídeo do complexo IV da cadeia respiratória) é um cromóforo que tem propriedades de absorver a luz irradiada de um determinado comprimento de onda (Karu et al., 2004; Karu et al., 2008; Santana-Blank et al., 2010). O aumento na atividade enzimática desta proteína após irradiação com LBP tem sido demonstrado em vários estudos, bem como um aumento na síntese de ATP após irradiação de mitocôndrias isoladas (Yu et al., 1997; Santana-Blank et al., 2010; Karu, 2010; Chen et al., 2011).

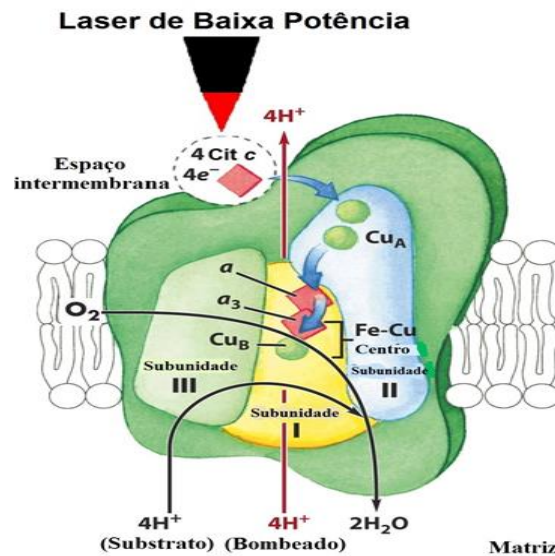


Figura 2: Possível mecanismo de ação do laser na mitocôndria. Moléculas com cobre em sua composição são excitadas pelo laser, dessa maneira aumentam a taxa de transferência de elétrons do citocromo *c* oxidase (Adaptado de Karu, 1999).

As moléculas que possuem cobre em sua composição no complexo IV da cadeia respiratória, CuA e CuB, são consideradas como fotoceptores, podendo ser oxidados ou reduzidos e assim aumentar a taxa de transferência de elétrons do citocromo *c* oxidase (Karu, 1999) (Figura 2). Uma das vias de sinalização do LBP estaria ligada à excitação da molécula fotoceptora, que parece estimular o metabolismo celular através de cascatas de reações de sinalização celular ou sinalização mitocondrial retrógrada. A sinalização retrógrada (oposta ao caminho comum), leva informações do núcleo e do citoplasma para a mitocôndria. Assim, a sinalização retrógrada envia informações de volta ao núcleo sobre mudanças no estado funcional da mitocôndria (Karu, 2008). Uma destas cascatas envolve a dissociação do óxido nítrico do centro catalítico do citocromo *c* oxidase onde age como um inibidor. Quando a atividade da enzima é reduzida pela irradiação com LBP, o óxido nítrico dissocia-se do centro catalítico, e esse evento poderia transitoriamente diminuir essa inibição (Karu, 2010).

Após a irradiação, a absorvância de energia do fóton nas células faz com que o cromóforo assumira um estado eletronicamente excitado, provocando o aumento do metabolismo celular que resulta em aumento na produção de ATP e na permeabilidade da membrana celular, seguida pela ativação de metabólitos secundários que desencadeiam uma cascata de sinais intracelulares (Hourelid, 2014; Evans e Abrahamse, 2009). Dentre estes sinais, ocorre a regulação de vários fatores

de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), proteína ativadora-1 (AP-1), p53, fator indutível por hipóxia (HIF) -1, e ativação de fator de transcrição / ligação de elemento de resposta a cAMP proteína (ATF / CREB).

Através desta regulação gênica ocorre o estímulo à proliferação, migração e remodelação celular, principalmente via modulação na via da PI3K / AKT, via que atualmente é descrita como uma das responsáveis pela progressão da DM e suas complicações (Khorami et al., 2015). Extremamente importante no processo de reparo dos tecidos, a via PI3K / AKT está envolvida na renovação e reparação de tecidos lesados, e migração de queratinócitos para cicatrização acelerada de feridas (Squarize et al., 2010; Xiao et al., 2017).

Além disso, a FBM promove a diminuição da ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ (Pires et al., 2012; Basso et al., 2012). Outros efeitos anti-inflamatórios exercidos pelo laser são observados através do estímulo à microcirculação, resultando em mudanças na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários da inflamação (Da Silva et al., 2010).

Efeitos também podem ser observados no comportamento dos linfócitos aumentando sua proliferação e ativação; nos macrófagos com aumento da fagocitose; já nos fibroblastos, ocorre o aumento na secreção de fatores de crescimento e absorção de fibrina e colágeno, promovendo formação de matriz extracelular, como descrito na figura 3 (Andrade, 2014).

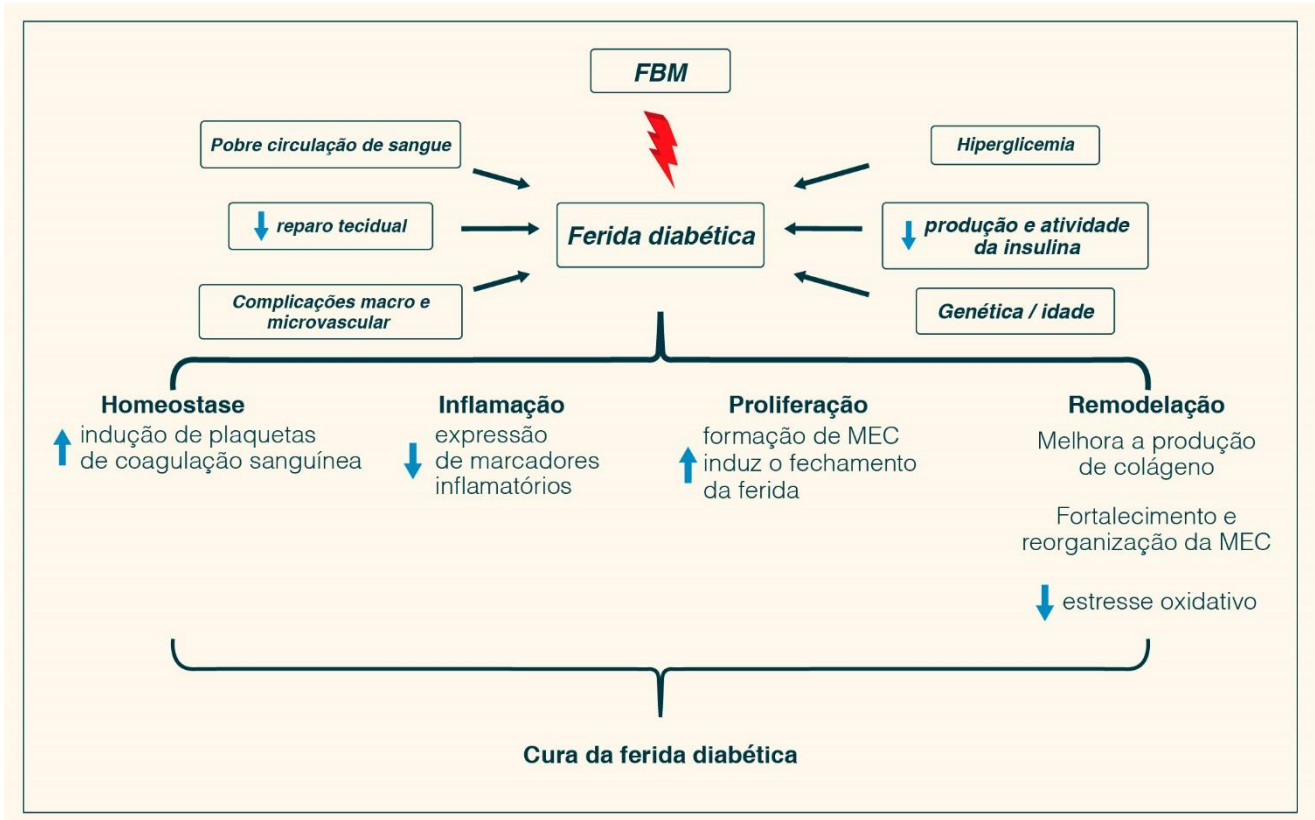


Figura 3: Mecanismo de ação da fotobiomodulação no tratamento de feridas diabéticas (Adaptado de Oyobode et al., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de uma molécula peptídica inibidora de IL-1 β associada ao laser de baixa potência na progressão do processo regenerativo de lesão epitelial em camundongos diabéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a área (cm²) da ferida para avaliar a contração do tecido epitelial nos dias 0 e 6 do tratamento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização;
- Quantificar os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por método ELISA (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-10);
- Quantificar os níveis proteicos do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) por ELISA;
- Avaliar a produção de oxidantes, atividade do sistema antioxidante e os níveis de dano oxidativo;

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DO PEPTÍDEO

Após obtermos a sequência do peptídeo proposto, o mesmo foi sintetizado utilizando um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida conforme descrito por Merrifield (1969) e adaptado por Machado de Ávila et al. (2014), método que consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal e disponível para aplicação após liofilização. O desenvolvimento e síntese do peptídeo inibidor de IL-1B utilizado nesse trabalho, foi realizado e cedido em parceria com o grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada do Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC. A partir de uma revisão bibliográfica associada a análises *in vitro* não publicadas do grupo de pesquisa, a concentração de peptídeo utilizada para o tratamento tópico foi de 1 (um) mg/ml.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Este projeto foi submetido para Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da UNESC sendo aprovado com número de protocolo 05/2021, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7). Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6 (8 a 12 semanas, pesando em torno de 20 g), para atender a demanda proposta no projeto. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, mantidos em temperatura ambiente controlada entre 20 ±22 oC, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum.

Primeiramente, o modelo de indução de DM ocorreu através da aplicação de estreptozitocina (STZ; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) seguindo o modelo experimental mais utilizado e descrito na literatura conforme Furman (2015). No primeiro dia experimental, 4 horas antes da primeira aplicação de STZ, a ração foi removida da gaiola. A primeira aplicação de STZ foi realizada utilizando seringas de 1 ml e agulhas de 25 G, e a solução de STZ foi injetada via i.p. a 50 mg / kg (1,0 ml / 100 g) nos animais dos grupos determinados. Um volume igual de tampão citrato (pH 4,5) i.p. foi injetado nos animais do grupo controle. Os animais foram devolvidos às

suas gaiolas com fornecimento a ração normal e água com 10% de sacarose. A aplicação descrita acima se repetiu nos próximos 4 dias consecutivos, totalizando 5 aplicações de STZ. Seis dias após a primeira aplicação, a água com sacarose foi substituída por água normal. A confirmação do quadro de hiperglicemia foi realizada nove dias depois da última aplicação de STZ e os níveis de glicose no sangue foram maiores que 150 mg/dl e/ou estatisticamente maior que nos camundongos controle.

Quatro semanas após a primeira aplicação de STZ, o modelo de lesão cutânea foi induzido com um molde de 2 cm de comprimento e 2 cm de largura, delimitando a área de lesão na região do dorso entre as duas escápulas. Após a demarcação com o molde, foi realizada a exérese do segmento de pele de espessura total, seguindo modelo de lesão epitelial descrito por Mendes et al. (2020).

Os animais foram distribuídos randomicamente em cinco grupos experimentais (n:12), sendo eles:

- I. Sham + Lesão Epitelial (LE)
- II. DM + LE
- III. DM + LE + Peptídeo Inibidor de IL-1 β
- IV. DM + LE + FBM
- V. DM + LE + FBM-Peptídeo Inibidor de IL-1 β

3.3 TRATAMENTO

O tratamento com FBM e peptídeo de forma tópica, iniciou 12 horas após a lesão epitelial e ocorreu diariamente até o quinto dia de experimento, como demonstrado na figura 3.

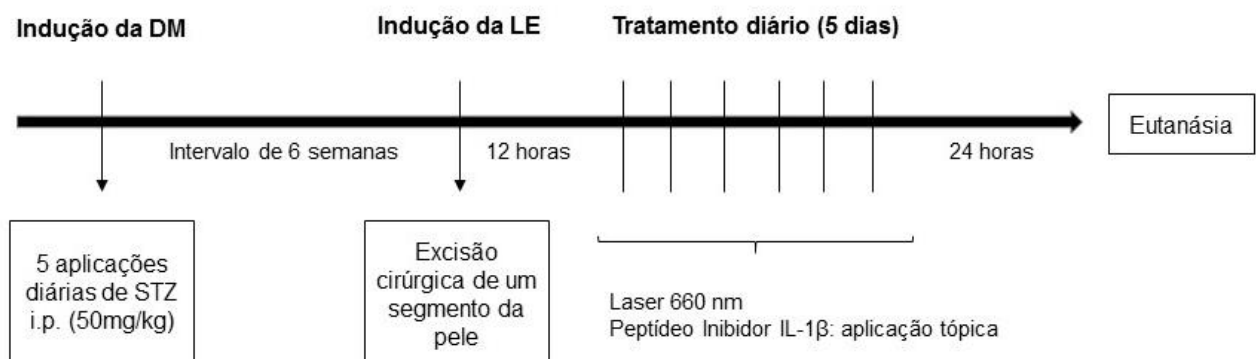


Figura 4: Desenho Experimental.

No presente estudo, utilizamos o laser AlGaInP com emissão contínua (comprimento de onda 660 nm; potência de pico 30 mW \pm 20%; tamanho do feixe de 0,06310 cm²; e dose de 1 J/cm² durante 33 segundos) da empresa Laserpulse-lbramed (São Paulo, Brasil). A irradiação foi executada em cinco regiões distintas ao redor da ferida, com a caneta do laser perpendicular à pele numa distância de 0,5 cm por ponto, conforme é descrito por Morrone et al. (1998) demonstrado na figura 4. A primeira sessão iniciou 12 horas após a lesão e foi realizada diariamente até o sexto dia. A aplicação tópica de 1 ml de gel salina ou gel contendo Peptídeo Antagonista IL-1 β foi realizada nos grupos determinados. Todos os animais foram anestesiados durante o tratamento com isoflurano 4% na forma inalatória para assegurar a imobilização e aplicação correta dos tratamentos.

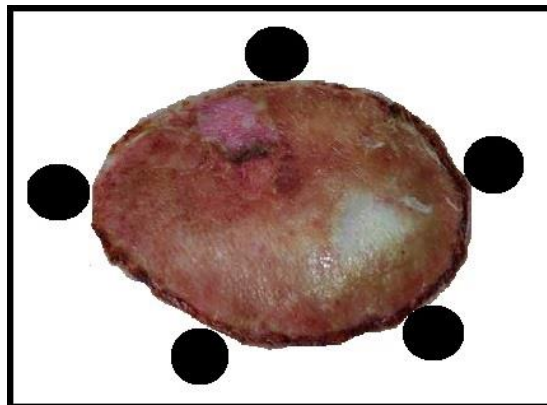


Figura 5: Modelo de irradiação do laser. A figura exemplifica os pontos onde no tratamento foi irradiado o laser, em cinco regiões das bordas da ferida. (Adaptada de Cuttle et al., 2006).

3.4 MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL

O peso corporal dos animais foi mensurado no início do estudo (caracterizada nos gráficos como semana 0), e nas semanas prévias ao tratamento até o fim do experimento.

O sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda dos animais com jejum prévio de 6 horas (Ayala et al., 2010), e a concentração de glicose sanguínea foi mensurada através de um glicosímetro, usando um sistema de monitoramento de glicose no sangue One Touch Basic para garantir a hiperglicemia nos indivíduos expostos ao STZ como descrito por Furmam et al., (2015). Para demonstração e análise dos dados os mesmos foram expostos como dados absolutos de glicose (mg/dL).

No primeiro dia experimental, antes da administração de STZ, a primeira mensuração foi realizada após jejum de todos os camundongos por 6 horas. Este procedimento foi realizado repetidamente nas semanas 3, 4 e 6 após as cinco aplicações de STZ. Quando os camundongos que receberam STZ atingiram níveis de glicose no sangue maiores que 150 mg/dl (8,3 mmol/litro) e/ou estatisticamente maiores do que nos animais controle, os mesmos foram considerados adequados para estudar mecanismos do estado diabético característicos da Diabetes Mellitus tipo I.

3.5 EUTANÁSIA

Vinte e quatro horas após a última sessão de tratamento, a eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical e a borda externa da ferida cirurgicamente removida e imediatamente processada e armazenada em freezer -80 °C para posterior análise.

3.6 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. Imagens digitais das feridas foram captadas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas nos dias 0 e 6 do experimento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho delas (área, comprimento e largura) calculando a variação das áreas das feridas neste período em cm². Essas mensurações foram realizadas pelo mesmo pesquisador, totalizando 5 mensurações de cada ferida e utilizando o valor médio.

3.7 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

Para dosagem das citocinas foi utilizado o método ELISA de captura através do Kit Unconted TNF- α , IL1 β , IL6, IL4, IL10, FGF (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific ELISA). A dosagem foi realizada conforme as instruções da bula. Para isso, foi utilizada uma placa de ELISA, na qual serão adicionados 100 μ L/poço de anticorpo de captura diluído em tampão Coating Buffer (1:250), a placa foi incubada overnight a 4 °C. No dia seguinte, retiramos toda a solução dos poços e realizamos três processos de lavagens com 250 μ L/poço de tampão de lavagem. O bloqueio da placa foi feito com 200 μ L/poço de diluente ELISA/ELISPOT (1X) e a incubação ocorreu por uma hora à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, toda a solução foi retirada e realizamos dois processos de lavagens com 250 μ L/poço de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/poço das amostras (sobrenadante celular) e incubadas overnight a 4 °C, para sensibilidade máxima. No dia seguinte, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250 μ L/poço de tampão de lavagem foram realizados. Feito isso, foram adicionados 100 μ L/poço de anticorpo de detecção diluído em ELISA/ELISPOT (1:250) em todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante uma hora. Passado o período de incubação, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250 μ L/poço de tampão de lavagem foram realizados. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/poço de Streptavidin-HRP e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse período, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250 μ L/poço de tampão de lavagem foram realizados. Adicionamos 100 μ L/poço de Solução TMB 23 (tetrametilbenzidina) (1X) e incubamos em temperatura ambiente por quinze minutos. Por fim, foram adicionados 100 μ L/poço de solução de parada. Em seguida, a placa foi analisada em um leitor de placas por absorbância, no comprimento de onda de 450 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicadas visto que a amostra utilizada foi o homogeneizado da pele retirada. Na mesma placa, foi realizado uma curva de concentração, com a amostra padrão do kit. A realização da curva de calibração, garante a qualidade do teste que está sendo realizado e possibilita que seja realizado os cálculos para dosagens em pg/mL das citocinas.

3.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.8.1 Determinação intracelular de óxido nítrico

Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol Nitrito/mg proteína}$ (Chae et al., 2004).

3.8.2 Marcadores de dano oxidativo

Conteúdo de Sulfidrila

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), mensurado espectrofotometricamente em um aparelho spectramax à 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

Carbonilação de Proteínas

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

3.8.3 Defesas antioxidantes

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada através de uma inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenado de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15ul foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/MG de proteína).

Conteúdo de Proteínas

O teor de proteína a partir do homogenado de tecido epitelial foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). O reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado afim de obter sua interação com o conteúdo proteico; com absorvância lida a 750nm em espectrofotômetro.

3.9 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Como pacote estatístico, o SPSS (StatisticalPackage for the Social Sciences) versão 17.0 foi utilizado.

4. RESULTADOS

4.1 MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE E PESO CORPORAL

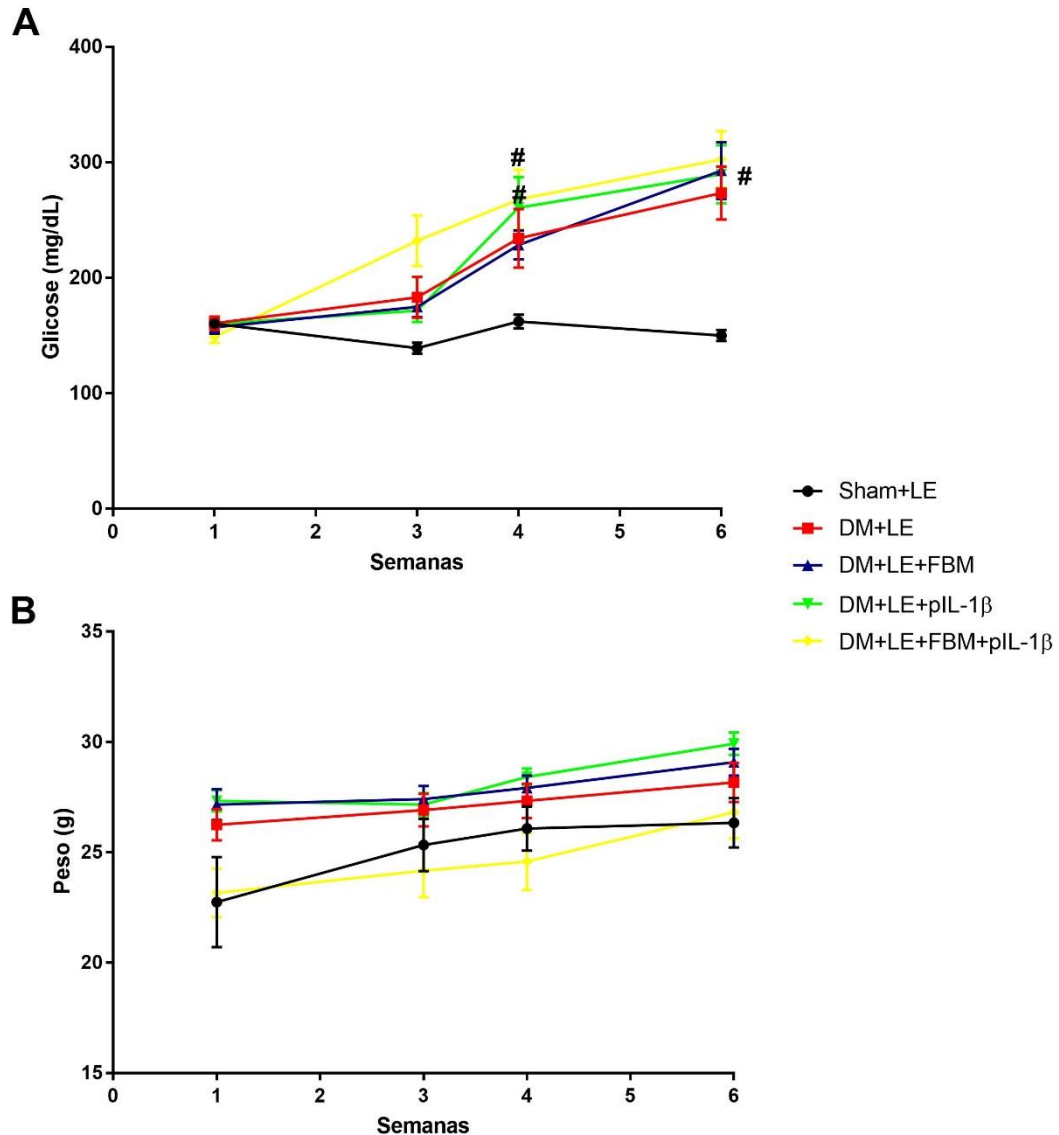


Figura 6: Representação esquemática da evolução temporal da diabetes induzida por STZ (A). Os camundongos foram expostos a injeção de STZ (50 mg/kg) ou PBS (Sham+LE) por 5 dias consecutivos, mudanças típicas nos níveis de glicose no sangue são ilustradas. Peso corporal total (B) mensurado ao longo das semanas. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Afim de confirmar o quadro de hiperglicemia causada pelo modelo experimental de DM tipo I, a figura 6 (A) representa o monitoramento dos níveis de glicose no sangue dos camundongos C57BL/6 após aplicação de STZ. É possível observar que os animais expostos ao STZ apresentam níveis estatisticamente elevados de glicose em mg/Dl quando comparados ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$) a

partir da quarta semana após a finalização das aplicações de STZ, confirmando o quadro de hiperglicemia. Quanto à análise do peso corporal, não houve diferença estatística entre os grupos.

4.2 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E FATOR DE CRESCIMENTO

Na figura 7 estão representados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α (figura 7 A e 7 B). Observou-se que os níveis de TNF- α em todos os grupos tratados apresentaram uma diminuição significativa comparados aos grupos Sham+LE e DM+LE (valor de $p < 0,05$), assim como a redução estatística do grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β ($***p < 0,001$). Com relação aos níveis de IL-1 β , o grupo DM+LE apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$). Já os grupos tratados com as terapias isoladas (DM+LE+FBM e DM+LE+pIL-1 β) apresentaram redução significativa de IL-1 β com relação ao grupo DM+LE, mas somente o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β apresentou uma redução estatisticamente relevante ($**p < 0,01$).

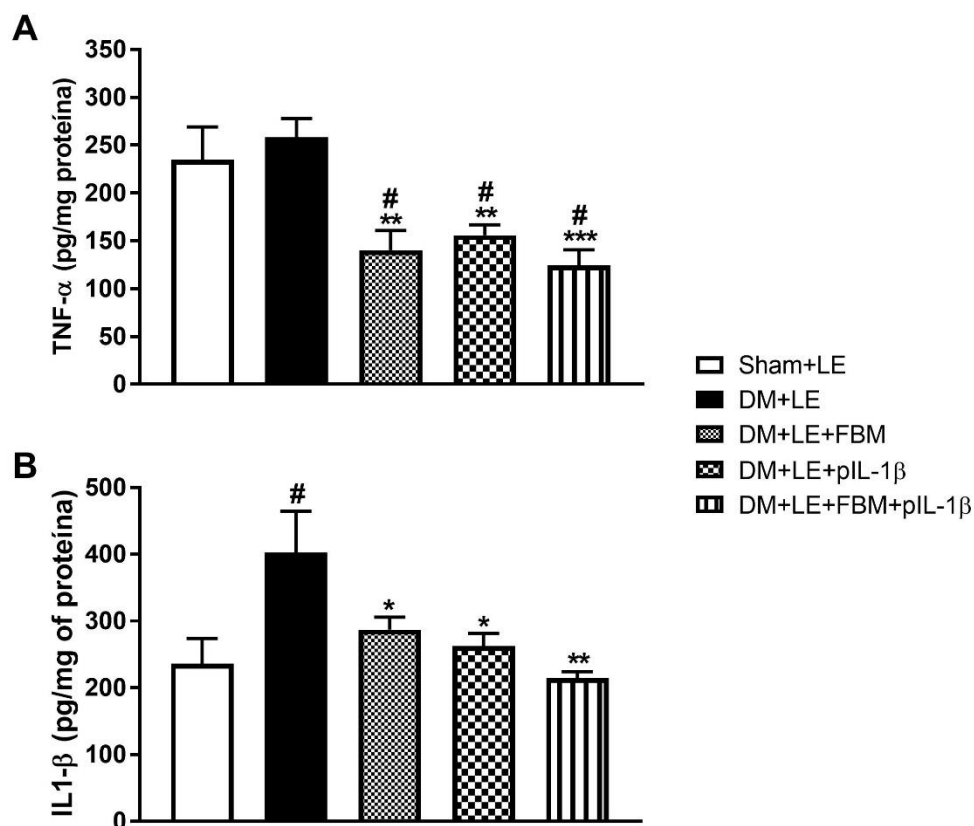


Figura 7: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis proteicos de interleucinas pró inflamatórias: IL1 β , TNF α em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Quanto aos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias, é possível observar na figura 8 que os grupos DM+LE e DM+LE+FBM apresentaram redução significativa de IL-4 quando comparados ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$). Apenas o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β apresentou aumento significativo nos níveis de IL-4 quando comparado ao grupo DM+LE ($p < 0,05$). Com relação aos níveis de IL-10, o grupo DM+LE demonstrou redução significativa quando comparado ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$). Os grupos tratados de forma isolada (DM+LE+FBM e DM+LE+pIL-1 β) não apresentaram níveis proteicos estatisticamente diferentes; já o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β , apresentou aumento significativo de IL-10 quando comparado ao grupo DM+LE ($p < 0,05$). Ao analisarmos o fator de crescimento TGF- β , observa-se uma redução significativa dos níveis proteicos no grupo DM+LE quando comparado ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$). Porém, no grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β há um aumento nos níveis de TGF- β quando comparado ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$) e quando comparado ao grupo DM+LE ($p < 0,0001$); enquanto os grupos tratados isoladamente não apresentaram diferença significativa (figura 8).

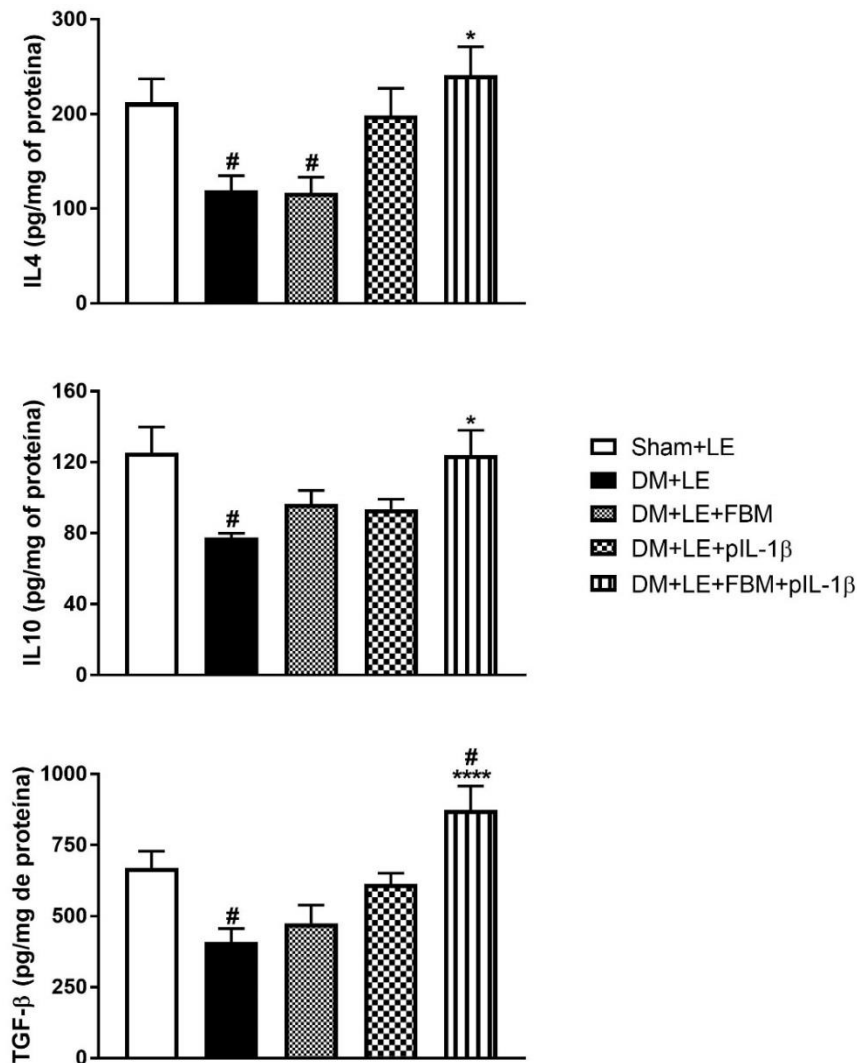


Figura 8: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis proteicos de interleucinas anti-inflamatórias: IL-4 e IL-10 e níveis do fator de crescimento TGF- β em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

4.3 MARCADORES DE ERN, DANO OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Como marcador secundário à produção de óxido nítrico, os níveis de nitrito foram avaliados e demonstrados na figura 9 (A), onde o grupo DM+LE apresentou aumento quando comparado ao grupo Sham+LE; enquanto os grupos DM+LE+FBM e DM+LE+FBM+pIL-1 β apresentaram redução significativa quando comparado ao grupo DM+LE. Ao avaliar o dano oxidativo através dos níveis de carbonil (figura 9 B), observa-se aumento significativo no grupo DM+LE quando comparado ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$), enquanto todos os grupos tratados

apresentaram redução nos níveis de carbonil quando comparado ao grupo DM+LE ($p < 0,01$). Quanto ao conteúdo de grupamento tióis (figura 9 C), os grupos DM+LE, DM+LE+FBM e DM+LE+pIL-1 β demonstraram redução significativa quando comparados ao grupo Sham+LE, já o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β não apresentou diferença estatística entre os grupos. A análise de defesa antioxidante realizada através da atividade enzimática da superóxido dismutase (figura 9 D), demonstra uma redução significativa de SOD nos grupos DM+LE e DM+LE+FBM quando comparados ao grupo Sham+LE ($p < 0,05$); enquanto os grupos DM+LE+pIL-1 β e DM+LE+FBM+pIL-1 β não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

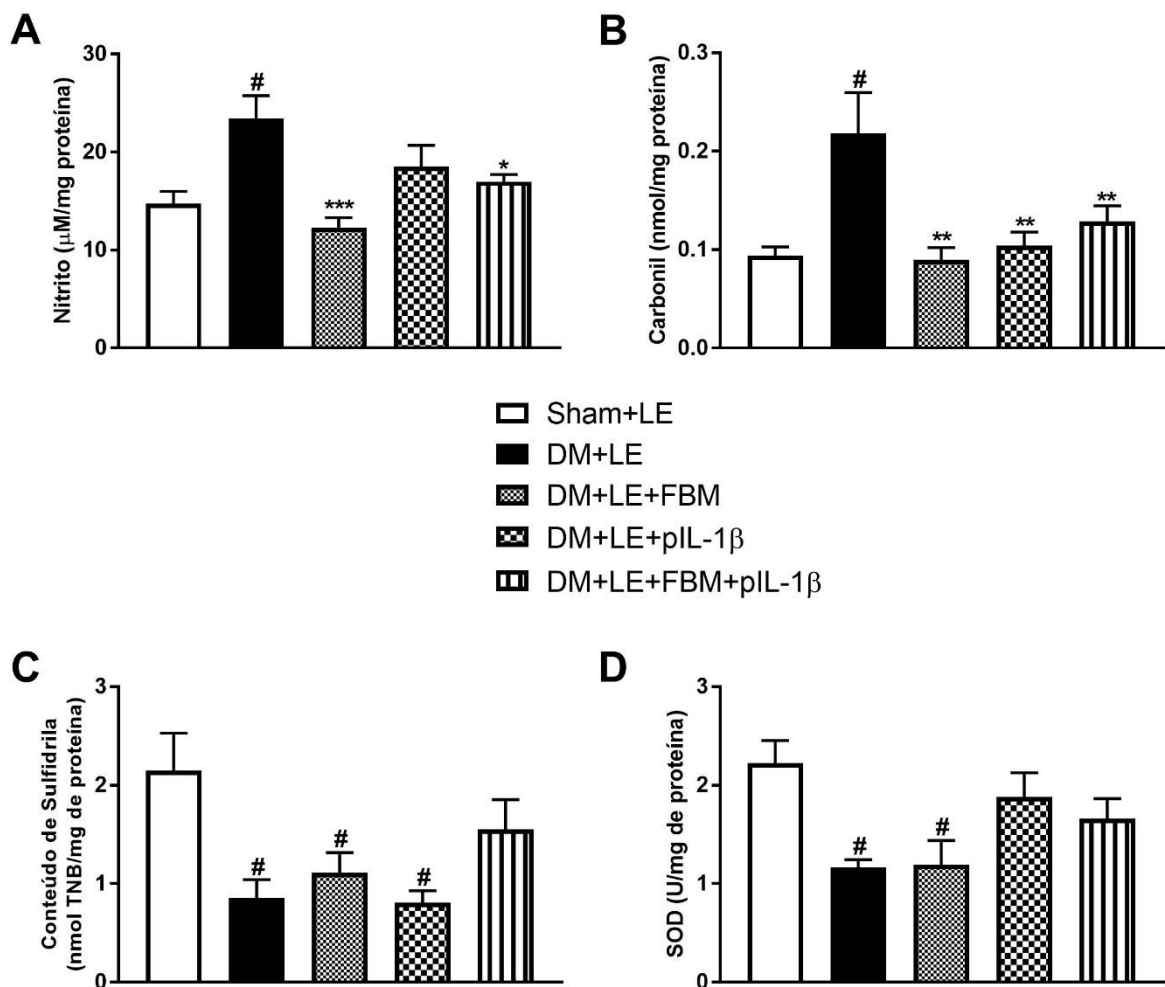


Figura 9: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre níveis de nitrito (A), marcadores de dano oxidativo: Carbonil (B) e Sulfidrilas (C) e de defesa antioxidante: SOD (D) em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

4.4 ANÁLISE DO TAMANHO DA ÁREA DAS FERIDAS

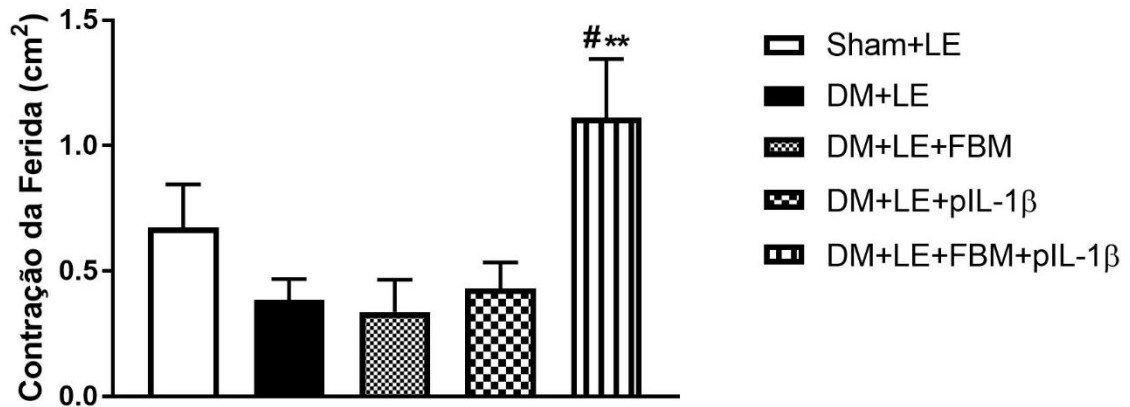


Figura 10: Efeitos do tratamento com FBM e/ou Peptídeo Inibidor de IL-1 β sobre parâmetros de redução da área das feridas em camundongos diabéticos. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo DM+LE; ** $p < 0,01$ v.s Grupo DM+LE; *** $p < 0,001$ v.s Grupo DM+LE; **** $p < 0,0001$ v.s Grupo DM+LE; # $p < 0,05$ v.s Grupo Sham+LE (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey).

Ao avaliarmos o tamanho da área da ferida, representada pela redução da área (figura 10), somente o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β demonstrou aumento na redução da área quando comparado ao grupo Sham+LE e quando comparado ao grupo DM+LE. Enquanto os grupos DM+LE+FBM e DM+LE+pIL-1 β não demonstraram diferença significativa quando comparados ao grupo Sham+LE e quando comparado ao grupo DM+LE.

5 DISCUSSÃO

Diversas respostas fisiológicas prejudicadas estão envolvidas na patogênese da ferida diabética e de forma conjunta, são responsáveis por paralisar o processo regenerativo. Dentre eles, o quadro de estresse oxidativo e a inflamação sustentada com níveis elevados de citocinas pró inflamatórias, correspondem aos mecanismos com maior complexidade que levam à diferenciação e migração celular prejudicadas. Evitar que o processo cicatricial ocorra de forma lenta e incompleta é um dos maiores desafios no tratamento de lesões epiteliais; a longa duração da fase inflamatória é uma das principais causas por impedir a formação do tecido de granulação, prologando a exposição tecidual a infecções (Zhao et al., 2016). Devido a isto, o propósito deste estudo busca desenvolver terapias capazes de suprimir o processo inflamatório e atuar em diversas fases da regeneração tecidual.

Neste estudo, os animais dos grupos experimentais com DM apresentaram confirmação do quadro de hiperglicemia através do monitoramento de glicose no sangue (figura 6 A), que demonstra um aumento crescente da glicemia durante a fase experimental, com níveis maiores que 150 mg/dL (8,3mmol/litro) e significativamente maiores nos grupos que receberam STZ quando comparado ao Sham+LE; fato que caracteriza o modelo de DM tipo I (Furman, 2015). Associado ao aumento de marcadores que corroboram com os mecanismos clássicos da fisiopatologia da ferida diabética, com características do quadro de estresse oxidativo e de inflamação sustentada observados nas figuras 7 e 9.

Na ferida diabética os estímulos nocivos são multifatoriais e frequentes, o que amplifica a resposta inflamatória e provoca uma infiltração excessiva de neutrófilos no local da lesão (Zhao et al., 2016). Este excesso de fagocitose promove aumento na produção de EROs, dano direto à MEC, senescência celular prematura e principalmente, perturba o equilíbrio entre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e seus inibidores (Eming et al., 2007). Assim como os neutrófilos, macrófagos com fenótipo pró inflamatório induzem a produção de IL-1 β e TNF- α , citocinas que aumentam a produção de MMP e reduzem os níveis dos seus inibidores teciduais (TIMPs) (Mast, 1996). Este desequilíbrio aumenta a degradação de MEC, prejudica a migração celular e reduz a proliferação de fibroblastos, formando produtos que desencadeiam cascatas de sinalização inflamatória e alimentam um processo inflamatório capaz de se perpetuar (Zhao et al., 2016).

Neste estudo, a exposição aguda ao tratamento da lesão epitelial com FBM e com inibidor de IL-1 β promoveram redução significativa dos níveis de IL-1 β , com diferença estatística relevante no grupo com associação das duas terapias quando comparado ao grupo DM+LE ($p < 0,01$). Houve também redução dos níveis de TNF- α nos grupos com aplicação das intervenções isoladas, porém com diferença estaticamente maior no grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β ($p < 0,001$). Dados que demonstram a eficácia das terapias no controle da produção de marcadores pró inflamatórios.

Quanto à avaliação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, somente o grupo em que as terapias foram associadas (DM+LE+FBM+pIL-1 β) apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo DM+LE. Percebe-se que apenas a associação da atenuação da sinalização de IL-1 em conjunto com a FBM foi capaz de promover a redução de citocinas pró inflamatórias com concomitante aumento de citocinas anti-inflamatórias, demonstrando a eficácia da associação das terapias em romper com ciclo vicioso característico da resposta aguda. A presença destas interleucinas anti-inflamatórias caracteriza o início da fase de reparo, com estímulos à proliferação e diferenciação celular pelas células satélites, à deposição de colágeno e à angiogênese (Tidball e Villalta, 2010), e é considerado indicador de troca fenotípica, sinalizando macrófagos M2, os quais estão presentes em fases posteriores do processo de regeneração, provendo remodelação tecidual com síntese de MEC (Chazaud, 2016) e liberação de fatores de crescimento (Arnold et al., 2007).

De forma sinérgica e persistente, a hipóxia e a hiperglicemia provocam eventos que aumentam significativamente a produção de citocinas pró inflamatórias. Estudos demonstram que a hiperglicemia induz de forma específica a produção de IL-1 β em células endoteliais, monócitos, células das ilhotas pancreáticas e macrófagos. A IL-1 β é produzida pela clivagem da pró-IL-1 β pela caspase-1, uma cisteína protease ativada por um complexo proteico denominado inflamassoma e sua via de sinalização é descrita como parte de um ciclo de feedback positivo que sustenta o fenótipo pró-inflamatório dos macrófagos e desta forma impede a finalização da inflamação. Uma vez no meio extracelular, a IL-1 β interage com seu receptor IL-1R e inicia respostas inflamatórias por meio da transdução de sinal semelhante a sinalização ativada pelos receptores Toll-like, resultando na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e p38 MAPK. Por sua vez, a ativação de NF- κ B por IL-1 começa com a formação de um

complexo entre MyD88, adaptador de quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK) e IRAK-2 e possui por fim, a expressão de genes inflamatórios; em particular os que codificam IL-8, proteína quimioatraente de monócito 1 e ciclooxigenase 2 (Weber, 2010; O'Neill, 2000). Em adição, ocorre ativação das proteínas quinases ativadas por estresse como p38, JNKs, quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) e proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) (Kaneko et al., 2019). Segundo Tan et al. (2021), a sinalização de IL-1R é um fator chave que impede o fechamento da ferida na condição diabética que nos leva a explorar a inibição desta via por meio de um peptídeo antagonista.

A partir destas cascatas, a IL-1 liberada serve como um sinal parácrino à produção de colagenase pelos fibroblastos para produzir prostaglandinas e colagenase, expressar selectinas e orientar a quimiotaxia contínua de linfócitos em direção ao local da lesão (Dinarello e Wolff, 1993). Estes fatores explicam a importância de romper com um ciclo pró inflamatório vicioso desencadeado pela IL-1 β e que devido a sua ação pleiotrópica, o controle dos receptores de membrana foi alvo terapêutico deste estudo e corresponde a um dos três níveis principais de intervenção para atenuar suas atividades (Weber, 2010).

Segundo Mirza et al. (2013), o excesso nos níveis de TNF- α e IL-1 β está diretamente relacionado ao infiltrado excessivo e persistente de macrófagos M1 na ferida diabética, que falham em regular positivamente os fatores associados à cura. A aplicação de um anticorpo neutralizante de IL-1 β em cultura de macrófagos demonstrou capacidade de inibir a expressão de marcadores como MMP-9, TNF- α e romper com o feedback positivo de produção de IL-1, que por sua vez regula negativamente o fenótipo de macrófago pró inflamatório (Mirza et al., 2013). Desta forma, a redução destes marcadores encontradas neste estudo sugerem a redução do infiltrado inflamatório e a modificação dos macrófagos em direção a um fenótipo anti-inflamatório.

Com proposta semelhante à presente pesquisa, o estudo de Tan et al. (2021), através do uso de uma proteína recombinante do antagonista de IL-1R1 em um sistema de liberação controlado demonstrou maiores concentrações nos níveis de citocinas anti-inflamatórias, atribuído a um maior número de macrófagos M2 capazes de estimular a expressão de fatores de crescimento e promover o fechamento da lesão. Doses extremamente altas de Anakinra, antagonista de IL-1, demonstraram modulação do processo inflamatório e fechamento acelerado de feridas diabéticas

(Perrault et al., 2018), contudo sua administração repetitiva pode levar a efeitos colaterais como imunogenicidade e infecções (Ramirez et al., 2018; Cabral et al., 2016).

Associado à atenuação da via de sinalização desencadeada pela IL-1 β , estudos descrevem a FBM como uma terapia capaz de modular o processo inflamatório agudo com redução da secreção de citocinas pró inflamatórias in vitro em fibroblastos humanos com DM, o que corrobora com os resultados in vivo encontrados neste estudo (Layegh et al., 2020). Segundo Rocha et al. (2012), esta redução de marcadores pró inflamatórios é atribuída à capacidade da FBM em modular a expressão da COX2; ademais um estudo clínico relatou o efeito do laser 660nm em feridas diabéticas na redução da expressão gênica de citocinas inflamatórias, contribuindo para contração epitelial (Ruh et al., 2018). Além disso, segundo Houeild et al. (2010), a irradiação com laser de baixa potência desempenha melhora na viabilidade e proliferação celular, além de aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias em linhagem celular de fibroblastos. Este estímulo da FBM ao crescimento celular ocorre através da regulação da expressão de genes envolvidos na proliferação, migração e remodelação celular (Mokoena et al., 2020); a modulação da via de sinalização PI3K / AKT é de extrema importância no processo de reparo dos tecidos, envolvida na migração de queratinócitos (Squarize et al., 2010).

Desta forma, a FBM atua de forma conjunta na modulação da inflamação e no estímulo à fase proliferativa, com expressão de fatores de crescimento, incluindo o TGF- β , responsável por regular a estimulação de crescimento e diferenciação celular no processo de cicatrização de feridas (Oyobode et al., 2021). Neste estudo, somente o grupo irradiado com FBM em conjunto com o peptídeo inibidor de IL-1 β apresentou aumento significativo de TGF- β quando comparado aos grupos Sham+LE e DM+LE, indicando o início da fase proliferativa seis dias após a lesão. O TGF- β por sua vez, atua na indução da produção de colágeno em fibroblastos da pele por meio de transição de fibroblasto para miofibroblasto, principalmente por ativar a via intracelular SMAD (Dang et al. 2011). Estudos in vitro mostram que o TGF- β estimula a formação de tecido de granulação por aumentar a expressão de genes associados à formação de MEC, incluindo fibronectina e o receptor de fibronectina (Greenwel et al., 1997), e promover a regulação positiva do fator de crescimento angiogênico VEGF (White et al., 2000; Goldberg et al., 2007). Estudos, como o de Merwin et al. (1991); Tyrone et al. (2000) e Meckmongkol et al. (2007) mostraram que o TGF- β desempenha um papel

importante na contração da ferida, facilitando a contração de fibroblastos da matriz de colágeno, estimulando a migração de queratonócitos e sendo considerado potente estimulante da neovascularização e do rearranjo vascular (Merwin et al., 1991). Além disso, os genes que codificam MMP têm um elemento inibidor dependente de TGF- β na região promotora, que infrarregula a expressão gênica e impede a degradação excessiva de colágeno (Patel et al., 2019).

Além de uma relação diretamente proporcional entre a resposta inflamatória sustentada e a geração de espécies reativas (Supinski e Callahan, 2007), na DM o estresse oxidativo desempenha papel importante na complicação do processo cicatricial (Patel et al., 2019). Fatores secundários a DM como a hipóxia tecidual causada pela glicação da hemoglobina e a interação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) com receptores na superfície endotelial, provocam o aumento na produção de espécies reativas e tornam a ferida um ambiente altamente oxidante (Deng et al., 2021). Como resposta à estes estímulos, neutrófilos geram radicais livres durante a fagocitose (Smith et al., 2008) e provocam danos celulares secundários, como a lesão à membrana da célula com consequente disfunção mitocondrial e escape de elétrons através da cadeia de transporte (CTE), eventos considerados fonte de elevada produção de EROS envolvidos em uma série de mecanismos de morte celular (Dröse e Brandt, 2012). A nível nuclear, a resposta inflamatória irregular provoca a expressão gênica aumentada de ATF-3 e iNOS, diretamente relacionados com estresse oxidativo e aumento na atividade das caspases-3 e 9 responsáveis pela diferenciação celular prejudicada e fase de remodelação no processo de cicatrização (Patel et al., 2019).

Ademais, segundo Dworzanski et al. (2020), indivíduos com DM tipo 2 apresentam reduções significativas na atividade de enzimas antioxidantes a longo prazo; fato atribuído ao NrF2, um fator de transcrição chave na expressão gênica de agentes antioxidantes que possui função prejudicada na DM (Teena et al., 2020). Nos resultados obtidos pela presente pesquisa é possível identificar estas características de desregulação redox através dos níveis elevados de nitrito, elevados níveis de dano proteico e aos grupamentos tióis, associado à baixa atividade antioxidante no grupo DM+LE. Porém quando interpretados em conjunto, o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β apresentou tendência à regulação do estado redox através da reversão dos parâmetros descritos anteriormente.

A redução nos níveis de nitrito, com redução dos parâmetros de dano oxidativo demonstra a capacidade das terapias associadas em reduzir o ambiente altamente oxidativo da ferida diabética; desta forma, sugere-se redução do dano em macromoléculas, incluindo componentes da MEC, e redução do distúrbio no funcionamento de fibroblastos e queratinócitos (Rajendran, 2021). Este equilíbrio redox observado corrobora com os achados deste estudo acerca da atenuação do processo inflamatório agudo, com conseqüente redução da atividade de células inflamatórias e produção de oxidantes. Em conjunto com a inibição de IL-1 β , estudos demonstram a capacidade da FBM em reduzir espécies reativas do nitrogênio e otimizar o sistema antioxidante, principalmente nos estágios iniciais do processo de reparo tecidual (Mendes et al., 2020).

Ao mensurar e quantificar a área total da lesão em cm², os resultados desta pesquisa demonstram que apenas o grupo DM+LE+FBM+pIL-1 β apresentou maior contração da ferida quando comparado aos grupos Sham+LE e DM+LE. Este achado indica que apesar da FBM atuar de forma importante na redução da área através de seus efeitos bioestimulatórios, apenas a irradiação não foi capaz de reduzir o tamanho da ferida; assim como somente a aplicação tópica do peptídeo não demonstrou contração epitelial significativa. Isto se deve à complexidade de eventos celulares simultâneos que ocorrem na fisiopatologia da ferida diabética, o que torna necessário o desenvolvimento de abordagens com combinações terapêuticas capazes de agir em diferentes fases do processo regenerativo (Patel et al., 2019).

Através da atenuação da sinalização da IL-1 β associada a irradiação com FBM, foi possível modular a fase inflamatória, o que permite a transição e entrada na fase proliferativa vinculada a deposição de fibroblastos e formação de MEC. Um estudo de Tan et al. (2021), ressaltou que a expressão de CD206 foi maior nas feridas tratadas com uma plataforma contendo um antagonista de IL-1, o que indica a polarização de macrófagos em direção a um fenótipo anti-inflamatório e conseqüentemente, expressão de fatores de crescimento, angiogênese e fechamento da ferida. Além disso, macrófagos M1 e a IL-1 β ativam cascatas que provocam a senescência de fibroblastos dérmicos, um dos principais obstáculos na formação de novo tecido, contribuindo para a cronicidade da lesão epitelial (Krzyszczczyk et al., 2018). Em conjunto com os mecanismos da FBM, que além de

desempenhar efeitos sob parâmetros inflamatórios já descritos, age em mecanismos que promovem o estímulo a fase proliferativa com a migração de células-tronco epidérmicas, fibroblastos e queratinócitos (Khadra et al., 2004). Dados semelhantes foram reportados por Silveira et al. (2009) em que o LBP auxiliou na cicatrização e redução do tamanho da ferida 3 e 10 dias após a indução da lesão epitelial.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é possível observar que apenas a associação das terapias foi capaz de favorecer o processo de regeneração tecidual, acelerando a contração epitelial e deposição de tecido. A contração epitelial significativa é consequência dos mecanismos de ação das intervenções terapêuticas acerca do processo inflamatório ao evitar a sua estagnação, bem como ao estimular a produção de marcadores anti-inflamatórios e fator de crescimento que proporcionam a progressão da regeneração, além de evitar o dano oxidativo a macromoléculas que de forma secundária, atuam na inflamação ao desencadear a morte celular por necrose. Observa-se o potencial terapêutico no desenvolvimento de um peptídeo capaz de promover atenuação da resposta desencadeada pela IL-1 β , através de uma tecnologia acessível e com boa reprodutibilidade, associado a terapia por FBM no tratamento de feridas diabéticas.

6 CONCLUSÃO

A associação da aplicação tópica de um peptídeo inibidor de IL-1 β com a FBM provocou simultaneamente a redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias, aumento de TGF- β e manutenção do estado redox celular com conseqüente redução no tamanho da ferida em cm² seis dias após a lesão; desta forma, ocorreu aceleração da reepitelização por romper o ciclo vicioso do processo inflamatório característico da DM. Destacamos que o desenvolvimento desta nova molécula através da biotecnologia peptídica representa uma intervenção tecnológica com boa acessibilidade e estabilidade, com potencial de impactar o sistema econômico e social.

Contudo, mais estudos são necessários acerca da toxicidade, efeitos adversos e afinidade do peptídeo utilizado com seu receptor *in vitro* e *in vivo*, afim de fundamentar os dados encontrados; assim como análise de expressão genica e histomorfológica do tecido formado em diferentes prazos de análise.

REFERÊNCIAS

Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004, 20(3):319-25.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302(2):141-145.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015; 33: 183–4.

Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Effects of low-level laser therapy on wound healing. *Rev Col Bras Cir*. 2014; 41(2): 129-133.

Andreev VP. Cytoplasmic electric fields and electroosmosis: possible solution for the paradoxes of the intracellular transport of biomolecules. *PLoS One*. 2013. 16;8(4):e61884.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Rooijen NV, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(5):1057–1069.

Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. 2010; 3(9–10): 525-534.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 2006; 32:279-312.

Barker AT, Jaffe LF, Venable JW Jr. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am J Physiol* 1982; 242(3): R358–R366

Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2001;14(2):101-14

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci*. 2012; in press.

Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005; 31: 674-86.

Bhattacharya S, Aggarwal R, Singh VP, Ramachandran S, Datta M. Downregulation of miRNAs during Delayed Wound Healing in Diabetes: Role of Dicer. *Mol Med*. 2016 Mar;21(1):847-860.

Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol*. 2013, 15;25(6):394-407.

Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1219-22.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 117(7):12-34.

Cabral, V. P., Andrade, C. A., Passos, S. R., Martins, M. F. & Hokerberg, Y. H. Severe infection in patients with rheumatoid arthritis taking anakinra, rituximab, or abatacept: a systematic review of observational studies. *Rev. Bras. Reumatol. Engl. Ed.* 56, 543–550 (2016).

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomater Sci.* 2004;25(5); 843-850.

Chalk JB, McCombe PA, Smith R, Pender MP. Clinical and histological findings in proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the lewis rat. Distribution of demyelination differs from that in EAE induced by other antigens. *J Neurol Sci.* 1994;123(1-2):154-61.

Chazaud B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: Application to exercise-induced muscle damage management. *Immunology and Cell Biology.* 2016;94(2):140–145.

Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE.* 2011; 6(7):22453.

Clark RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol.* 1990; 128S–134.

Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF (ed) *The molecular and cellular biology of wound repair.* Plenum Press. 1996; 3–35.

Da Silva JP, Da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1):17-21.

Dang Y, Liu B, Liu L, et al. The 800-nm diode laser irradiation induces skin collagen synthesis by stimulating TGF- β /Smad signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2011;26(6):837-843.

Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med.* 1993 Jan 14;328(2):106-13. doi: 10.1056/NEJM199301143280207. Erratum in: *N Engl J Med* 1993 Mar 11;328(10):744. PMID: 8439348.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018, 281(1):8-27.

Dong J, Sulik KK, Chen, S. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett.* 2010; 193(1):94-100.

Dröse S, Brandt U. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145–169.

- Dworzański J, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Kielczykowska M, Dworzańska A, Drop B, Polz-Dacewicz M. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus. *PLoS One*. 2020 Mar 25;15(3).
- Eming SA, Krieg T., Davidson JM Inflammation no reparo de feridas: Molecular and celular engines. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127 : 514–525.
- Evans DH, Abrahamse H. A review of laboratory-based methods to investigate second messengers in low-level laser therapy (LLLT). *Med Laser App.* 2009;24(3):201-215
- Foulds IS, Barker AT. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br J Dermatol* 1983; 109(5):515–522
- Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015; 1:70(5).1-5.
- Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 2645–55.
- Gonçalves RV, Novaes RD, do Carmo Cupertino M, Moraes B, Leite JPV, Peluzio MdCG. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):383–390.
- Gooyit M, Peng Z, Wolter WR, Pi H, Ding D, Heseck D, Lee M, Boggess B, Champion MM, Suckow MA, Mobashery S, Chang M. A chemical biological strategy to facilitate diabetic wound healing. *ACS Chem Biol.* 2014 Jan 17;9(1):105-10.
- Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of alpha2 (I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem.* 1997; 272:19738–45.
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(2):619-624.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18:2714-2723
- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89(3):219–229.
- Gurtner GC. Wound healing: normal and abnormal. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2007;15-22.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-226.
- Hourelid N, Sekhejane P, Abrahamse H. Low intensity laser irradiation stimulates healing in stressed models. *8th International Congress*

of World Association of Laser Therapy Held in Bergen, Norway; 2010;1: 23-26.

Hourelid NN. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *Sci World J.* 2014; 2014:1-13.

Icli B, Nabzdyk CS, Lujan-Hernandez J, Cahill M, Auster ME, Wara AK, Sun X, Ozdemir D, Giatsidis G, Orgill DP, Feinberg MW. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 Feb;91:151-9.

Ishida Y, Kondo T, Kimura A, Matsushima K, Mukaida N. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappaB activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. *J Immunol.* 2006, 1:176(9):5598-606.

Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol.* 2013;58(11):R37-R61.

Jere SW, Hourelid NN, Abrahamse H. Photobiomodulation at 660 nm stimulates proliferation and migration of diabetic wounded cells via the expression of epidermal growth factor and the JAK/STAT pathway. *J Photochem Photobiol B.* 2018;179:74-83.

Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T. *et al.* The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regener.* 2019; 12 (39).

Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *ActaMedica (Hradec Kralove).* 2011; 54(3):97-101.

Karba R, Šemrov D, Vodovnik L. DC electrical stimulation for chronic wound healing enhancement Part 1. Clinical study and determination of electrical field distribution in the numerical wound model. *Bioelectrochem Bioenerg* 1997; 43(2):265–270

Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010; (28):159-160.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol.* 1999; (49):1-17.

Karu TI, Afanaseva NI, Kol'iakov SF, Piatibrat LV. Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation. *DoklAkadNauk.* 1998; 360: 267-270.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *PhotochemPhotobiol Sci.* 2004; (3):211-16.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(6):593-9.

Kavitha KV, Tiwari S, Purandare VB, Khedkar S, Bhosale SS, Unnikrishnan AG. Choice of wound care in diabetic foot ulcer: A practical approach. *World J Diabetes*. 2014; 15;5(4):546-56.

Khadra M, Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Jun;15(3):325-32..

Khorami SH, Movahedi A, Huzwah K, Sokhini A. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *AMBS*. 2015;1(2):46-55.

Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A. & Berthiaume, F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front. Physiol.* 9, 419 (2018)
Kumar, Vinay. *Patologia Básica*. São Paulo: Elsevier, 2013.

Layegh ER, Fathabadi FF, Lotfinia M, et al. Photobiomodulation therapy improves the growth factor and cytokine secretory profile in human type 2 diabetic fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*. 2020; 210:111962.

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004; 18(7):816–827

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478.

Li G, Feng X, Wang S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. *Physiol Res*. 2005; 54:193–99.

Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol*. 2002 Mar;81(3):153-60.

Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmolliere A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2002; 10(2):86-92.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med*. 2001; 40:346-358.

Machado-de-Ávila RA, Velloso M, Oliveira D, Stransky S, Flor-Sá A, Schneider FS, Neshich G, Chávez-Olórtegui C. Induction of Neutralizing Antibodies against Mutalysin-II from *Lachesis muta muta* Snake Venom Elicited by a Conformational Bcell Epitope Predicted by Blue Star Sting Data Base. *Immunome Research*. 2014;11:1-6.

Machado-de-Ávila RA, Velloso M, Oliveira D, Stransky S, Flor-Sá A, Schneider FS, Neshich G, Chávez-Olórtegui C. Induction of Neutralizing Antibodies against

Mutalysin-II from *Lachesis muta muta* Snake Venom Elicited by a Conformational Bcell Epitope Predicted by Blue Star Sting Data Base. *Immunome Research*. 2014;11:1-6.

Mandelbaum SH, Santis EPD, Mandelbaum, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *AnbrasDermato*. 2003; 78(4): 393-410.

McLaughlin S, Poo MM. The role of electro-osmosis in the electric-field-induced movement of charged macromolecules on the surfaces of cells. *Biophys J*. 1981 ;34(1):85-93.

Mast BA, Schultz GS Interações de citocinas, fatores de crescimento e proteases em feridas agudas e crônicas. *Regen de reparo de feridas*. 1996; 4 : 411–420.

Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGFbeta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360: 709–14.

Mendes C, Dos Santos Haupenthal DP, Zaccaron RP, de Bem Silveira G, Corrêa MEAB, de Roch Casagrande L, de Sousa Mariano S, de Souza Silva JI, de Andrade TAM, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Effects of the Association between Photobiomodulation and Hyaluronic Acid Linked Gold Nanoparticles in Wound Healing. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020; 14;6(9):5132-5144.

Mercola, JM, Kirsch DL. The basis for microcurrent electrical therapy in conventional medical practice. *Journal of Advancement in medicine*. 1995: 8(2); 107-120.

Merrifield RB. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1969; (32):221-296.

Merwin JR, Roberts A, Kondaiah P, Tucker A, Madri J. Vascular cell responses to TGF-beta 3 mimic those of TGFbeta 1 in vitro. *Growth Factors*. 1991; 5: 149–58.

Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2579-87. doi: 10.2337/db12-1450. Epub 2013 Mar 14.

Mirza RE, Fang MM, Weinheimer-Haus EM, Ennis WJ, Koh TJ. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes*. 2014;63(3):1103-14.

Mokoena DR, Houreld NN, Dhilip Kumar SS, Abrahamse H. Photobiomodulation at 660 nm stimulates fibroblast differentiation. *Lasers Surg Med*. 2020;52(7):671-681.

Moura J, Madureira P, Leal EC, Fonseca AC, Carvalho E. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing. *Clin Immunol*. 2019 Mar;200:43-54.

Naik S, Larsen SB, Gomez NC, Alaverdyan K, Sendoel A, Yuan S, Polak L, Kulukian A, Chai S, Fuchs E. Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature*. 2017 Oct 26;550(7677):475-480.

Neshich G, Rocchia W, Mancini AL, Yamagishi MEB, Kuser PR, Fileto R, Baudet C, Pinto IP, Montagner AJ, Palandrani JF, Krauchenco JN, Torres RC, Souza S, Togawa

- RC, Higa RH. JavaProtein Dossier: a novel web-based data visualization tool for comprehensive analysis of protein structure. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:595-601.
- Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. [Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice]. *Mol Biol (Mosk).* 2019 Sep-Oct;53(5):741-754.
- O'Neil. The Interleukin-1 Receptor/Toll-like Receptor Superfamily: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense. *Science's stke.* 2000; 44.
- Oliveira KMC, Barker JH, Berezikov E, Pindur L, Kynigopoulos S, Eischen-Loges M, Han Z, Bhavsar MB, Henrich D, Leppik L. Electrical stimulation shifts healing/scarring towards regeneration in a rat limb amputation model. *Sci Rep.* 2019; 7:9(1):11433
- Osborn DP, Wright CA, Levy G, King MB, Deo R, Nazareth I. Relative risk of diabetes, dyslipidaemia, hypertension and the metabolic syndrome in people with severe mental illnesses: systematic review and metaanalysis. *BMC Psychiatry.* 2008;25;8:84.
- Oyebode O, Houreld NN, Abrahamse H. Photobiomodulation in diabetic wound healing: A review of red and near-infrared wavelength applications. *Cell Biochem Funct.* 2021 Jul;39(5):596-612.
- Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004; 187:11-6.
- Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and nonmitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B.* 2014;140:344-358.
- Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother.* 2019; 112:108615.
- Perrault DP, Bramos A, Xu X, Shi S, Wong AK. Local Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist Improves Diabetic Wound Healing. *Ann Plast Surg.* 2018 May;80:S317-S321.
- Perrault, D. P., Bramos, A., Xu, X., Shi, S. & Wong, A. K. Local administration of interleukin-1 receptor antagonist improves diabetic wound healing. *Ann. Plast. Surg.* 80, S317–S321, 2018.
- Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Ja JR, Aimbire F, Albertini r. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci.* 2011; 26(1):85-94.
- Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med.* 2011;11(57):154-159.
- Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am AcadDermatol.* 2012; 66(1):1-10.

- Rajendran ST, Huszno K, Dębowski G, Sotres J, Ruzgas T, Boisen A, Zór K. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine. *Bioelectrochemistry*. 2021; 138:107720.
- Ramirez, J. & Canete, J. D. Anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: a safety evaluation. *Expert Opin. Drug Saf.* 17, 727–732 (2018).
- Rocha CV, Rocha Júnior AM, Aarestrup BV, Aarestrup FM. Inibição da expressão de ciclooxigenase 2 em feridas cutâneas de camundongos NOD submetidos à terapia a laser de baixa intensidade. *J Vasc Bras*. 2012;11(3):175-181.
- Ruh AC, Frigo L, Cavalcanti MF, et al. Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(1):165-171.
- Santana-Blank L, Rodríguez-Santana E, Santana-Rodríguez K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(1):41-52.
- Schwartz L, da Veiga Moreira J, Jolicoeur M. Physical forces modulate cell differentiation and proliferation processes. *J Cell Mol Med*. 2018;22(2):738-745.
- Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 95(2):89-92.
- Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2011; (26):125-31.
- Silveira PC, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS, Paula MM. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Materials Science and Engineering: C*. 2014; 44: 380-385.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341(10):738–746.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: Illuminating complexities. *Sports Medicine*. 2008;38(11):947–969.
- Squarize CH, Castilho RM, Bugge TH, Gutkind JS. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One*. 2010;5(5):e10643
- Steiner, Bethina Trevisol. Biotecnologia Peptídica Aplicada ao Desenvolvimento De Uma Molécula Com Potencial Analgésico Em Modelo De Dor Do Câncer a Partir Da

Toxina Ph α 1 β do Veneno da Aranha Phoneutria Nigriventer. 2019. 73 F. Dissertação (Mestrado) - Curso De Ciências Da Saúde, Unesc, Criciúma, 2019.

Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *Journal of Applied Physiology*. 2007;102(5):2056–2063.

Tan JL, Lash B, Karami R, Nayer B, Lu YZ, Piotto C, Julier Z, Martino MM. Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Commun Biol*. 2021; 26:4(1):422.

Tan, J.L., Lash, B., Karami, R. *et al*. Restoration of the healing microenvironment in diabetic wounds with matrix-binding IL-1 receptor antagonist. *Commun Biol* 4, 422 2021.

Teena R, Dhamodharan U, Ali D, Rajesh K, Ramkumar KM. Gene Expression Profiling of Multiple Histone Deacetylases (*HDAC*) and Its Correlation with *NRF2*-Mediated Redox Regulation in the Pathogenesis of Diabetic Foot Ulcers. *Biomolecules*. 2020 Oct 21;10(10):1466.

Thomay AA, Daley JM, Sabo E, Worth PJ, Shelton LJ, Harty MW, Reichner JS, Albina JE. Disruption of interleukin-1 signaling improves the quality of wound healing. *Am J Pathol*. 2009;174(6):2129-36.

Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2010;298(5):1173-1187.

Tyrone JW, Marcus JR, Bonomo SR, Mogford JE, Xia Y, Mustoe TA. Transforming growth factor beta3 promotes fascial wound healing in a new animal model. *Arch Surg*. 2000; 135: 1154–9.

Van WW. The fibroblast in wound healing. *SurgGinecolObstet* 1967; 124:369

Vijayakumar V, Samal SK, Mohanty S, Nayak SK. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *Int J Biol Macromol*. 2019; 1;122:137-148.

Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Processing Pathway. *Immunology*. 2010; 105 (3).

White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259–68.

World Health Organization, Facts and Figures About Diabetes, Available at: (2014). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.2014.

Xiao W, Tang H, Wu M, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep*. 2017;37(6):1-11.

Yan C, Gao N, Sun H, Yin J, Lee P, Zhou L, Fan X, Yu FS. Targeting Imbalance between IL-1 β and IL-1 Receptor Antagonist Ameliorates Delayed Epithelium Wound Healing in Diabetic Mouse Corneas. *Am J Pathol.* 2016 Jun;186(6):1466-80.

Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *PhotochemPhotobiol.* 1997; (66):866-71.

Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, Bui HH, Buus S, Frankild S, Greenbaum J, Lund O, Lundegaard C, Nielsen M, Ponomarenko J, Sette A, Zhu Z, Peters B. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res.* 2008;1(36):513-518.

Zhao R, Ling H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 2085.

Zhao S, Mehta AS, Zhao M. Biomedical applications of electrical stimulation. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(14):2681-2699.

ANEXO



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 09/03/2021.

Título do projeto	Biocologia peptídica aplicada ao desenvolvimento de uma molécula mimetizante do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) administrada via iontoforese em lesão cutânea excisional de camundongos diabéticos.
Project title	Peptide biotechnology applied to the development of a molecule mimicking the macrophage migration inhibition factor (MIF) administered via iontophoresis in an excisional skin lesion in diabetic mice.
Número do protocolo Protocol number	05/2021
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Carolini Mendes, Maria Eduarda Anastácio Borges Correa, Laura de Roch Casagrande, Gustavo de Bem Silveira, Ligia Millanez Venturini, Rubya Pereira Zaccaron, Germano Duarte Porto, Lariani Tamires Witt Tietbohl, JOÃO VITOR SILVANO BITTENCOURT.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2021 a 01/09/2021
Espécie/Inhagem/raça	Camundongo heterogênico / C57BL/6
Idade/Peso	8/12semanas / 20g
Número de animais	60 masculino
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Josiane Budni

Crilúma-SC, 09 de março de 2021