



## ARTIGO ORIGINAL

# A inibição de ANGPT2 ativa a autofagia durante a formação de cicatriz hipertrófica por meio da via PI3K/AKT/mTOR ☆,☆☆



Hongxin Cheng  a,b,c, Kai Xu  b,c, Chao Sun  d, Si Gui  b,c, Juanjuan Wu  b,c e Song Wang  a,b,c,\*

<sup>a</sup> Escola de Medicina, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China

<sup>b</sup> Departamento de Queimaduras e Cirurgia Plástica, General Hospital of Central Theater Command of People's Liberation Army, Wuhan, Hubei, China

<sup>c</sup> Hubei Key Laboratory of Central Nervous System Tumor and Intervention, Wuhan, Hubei, China

<sup>d</sup> The Sixth Resignation Cadre Sanatorium of Shandong Province Military Region, Qingdao, China

Recebido em 30 de agosto de 2021; aceito em 28 de dezembro de 2021

### PALAVRAS-CHAVE

Angiopietina-2;  
Autofagia;  
Cicatriz hipertrófica;  
Classe II de fosfatidilinositol 3-quinases;  
Fibroblastos;  
Matriz extracelular;  
Proliferação de células

### Resumo

**Fundamentos:** A cicatriz hipertrófica (CH), alteração fibroproliferativa que corresponde à cicatrização aberrante de feridas após lesões de pele como queimaduras, lacerações e cirurgias, é caracterizada pela proliferação invasiva de fibroblastos e acúmulo excessivo de matriz extracelular (MEC). A desregulação da autofagia é a base fisiopatológica da formação da CH. Anteriormente, descobriu-se que a angiopietina-2 (ANGPT2) era superexpressa em fibroblastos de CH (FCH) em comparação com fibroblastos normais da pele. Entretanto, ainda não está claro se a ANGPT2 participa do processo de formação de CH, bem como os potenciais mecanismos moleculares.

**Objetivo:** O presente estudo mostrou o papel da ANGPT2 e da autofagia mediada por ANGPT2 durante o desenvolvimento da CH.

**Métodos:** RT-qPCR foi usada para detectar a expressão da ANGPT2 em tecidos de CH e FCH. Os FCH foram transfectados com sh-ANGPT2 para reduzir a expressão da ANGPT2 e depois tratados com MHT1485, o agonista de mTOR. Os efeitos de sh-ANGPT2 ou MHT1485 na proliferação, migração, autofagia e acúmulo de MEC de FCH foram avaliados por ensaio CCK-8, ensaio Transwell e *Western blotting*. A expressão de moléculas relacionadas à via PI3K/Akt/mTOR (p-PI3K, p-Akt e p-mTOR) foi avaliada por *Western blotting*.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.12.005>

☆ Como citar este artigo: Cheng H, Xu K, Sun C, Gui S, Wu J, Wang S. Inhibition of ANGPT2 activates autophagy during hypertrophic scar formation via PI3K/AKT/mTOR pathway. *An Bras Dermatol.* 2023;98:26–35.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Queimaduras e Cirurgia Plástica, General Hospital of Central Theater Command of People's Liberation Army, Wuhan, China.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [m13896055663@163.com](mailto:m13896055663@163.com) (S. Wang).

**Resultados:** A expressão de ANGPT2 esteve acentuadamente aumentada em tecidos de CH e FCH. O *knockdown* de ANGPT2 diminuiu a expressão de p-PI3K, p-Akt e p-mTOR. O *knockdown* de ANGPT2 ativou a autofagia e inibiu a proliferação, a migração e o acúmulo da MEC de FCH. Além disso, o tratamento de MHT1485, o agonista mTOR, em FCH com regulação negativa de ANGPT2, reverteu parcialmente a influência do *knockdown* de ANGPT2 em FCH.

**Limitações do estudo:** O estudo necessita de modelos animais *in vivo* mais estáveis de CH para investigar os efeitos da ANGPT2 na formação da CH.

**Conclusões:** A regulação negativa da ANGPT2 inibe o crescimento, a migração e o acúmulo de MEC de FCH por meio da ativação de autofagia pela supressão da via PI3K/Akt/mTOR. O presente estudo indica novo alvo terapêutico potencial para CH.

© 2022 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

A cicatriz hipertrófica (CH), alteração fibroproliferativa que corresponde a uma cicatrização aberrante de feridas após lesões na pele, como queimaduras, lacerações e cirurgia, é caracterizada pelo crescimento invasivo de fibroblastos e acúmulo excessivo de matriz extracelular (MEC).<sup>1</sup> A destruição da estrutura do tecido da pele pode levar a vários graus de disfunção de tecidos ou órgãos, e até mesmo incapacidade, fazendo com que a CH se torne problema de saúde social cada vez maior.<sup>2</sup> De acordo com as estatísticas, a incidência de cicatrizes após a cirurgia em indivíduos chineses é de 70%, e a incidência de cicatrizes em pacientes queimados chega a 90%.<sup>3</sup> Atualmente, a terapia da CH inclui ressecção cirúrgica, tratamento a laser e cobertura com gel de silicone.<sup>4</sup> Entretanto, em decorrência de diferenças individuais, os resultados permanecem insatisfatórios.<sup>5</sup> Portanto, é imperativo identificar os mecanismos moleculares subjacentes à formação de CH para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento das mesmas.

A autofagia é processo fundamental para a renovação de substâncias intracelulares em eucariontes, durante o qual as organelas ou proteínas danificadas são envolvidas por vesículas autofágicas e, em seguida, enviadas para vacúolos ou lisossomos para reciclagem e degradação.<sup>6</sup> A autofagia é uma resposta celular para manter a homeostase da estrutura e a função do tecido<sup>7</sup> e desempenha papel crucial na patogênese de inúmeras doenças.<sup>8</sup> Além disso, foi relatado que a autofagia está fortemente associada à sobrevivência, diferenciação e manutenção de fibroblastos durante o processo de cicatrização de feridas, o que indica que a desregulação da autofagia é a base fisiopatológica da formação de CH.<sup>9,10</sup>

A angiopoietina-2 (ANGPT2), como fator de crescimento, pertence à via angiopoietina/Tie.<sup>11</sup> É uma proteína de 496 aminoácidos com domínio semelhante ao fibrinogênio no terminal COOH, domínio espiralado no terminal NH<sub>2</sub> e peptídeo de sinal de secreção.<sup>12</sup> A ANGPT2 foi identificada como mediadora significativa de fibrose renal e autofagia na nefropatia diabética, cujo *knockdown* aumentou o nível de autofagia e atenuou a fibrose renal por meio da ativação da via MEK/ERK/Nrf-1.<sup>13</sup> Em estudo anterior, a ANGPT2 foi superexpressa (*fold change* > 20) em fibroblastos derivados de tecidos de CH em comparação com fibroblastos de tecidos normais da pele.<sup>14</sup> Entretanto, ainda não está claro se a ANGPT2 participa da autofagia

durante a formação da CH, bem como os potenciais mecanismos moleculares. Além disso, a ANGPT2 demonstrou regular a via de sinalização fosfoinositida 3-quinase (PI3K)/Akt.<sup>15</sup> A via PI3K/Akt é importante modulador *upstream* da quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), um complexo de dois componentes mTOR, mTORC1 e mTORC2, com mTORC1 sendo importante regulador negativo da autofagia.<sup>16</sup> Portanto, a via PI3K/Akt/mTOR foi identificada como intimamente associada à autofagia durante o desenvolvimento de muitas doenças humanas.<sup>17</sup> O presente estudo objetiva descobrir se a ANGPT2 regula a autofagia durante a formação de CH através da via PI3K/Akt/mTOR.

No presente estudo, primeiramente foi detectada a expressão de ANGPT2 em tecidos de CH e fibroblastos de cicatriz hipertrófica (FCH) em comparação com tecidos normais e fibroblastos de pele normal. Autofagia, crescimento e migração de FCH e acúmulo de MEC foram avaliados após a regulação negativa de ANGPT2 para investigar o papel da ANGPT2 na formação de CH, e o mecanismo regulatório detalhado também foi explorado posteriormente. Os achados do presente estudo podem indicar novo alvo terapêutico potencial para CH.

## Materiais e métodos

### Coleta de tecidos

Tecidos de CH foram obtidos 1, 3, 6 e 12 meses após queimadura profunda de segundo e terceiro grau, bem como tecidos de pele normal adjacente de 40 pacientes adultos que foram diagnosticados com CH por exames anatomopatológicos de rotina e que foram submetidos à excisão cirúrgica no General Hospital of Central Theater Command of People's Liberation Army. Todos os pacientes (faixa etária, 23 a 59 anos; proporção de gênero, 1:1) eram asiáticos com cor da pele amarela. Entre os 40 casos, havia 16 casos de escaldadura hidrotérmica, 13 casos de queimadura por chama, oito casos de escaldadura por vapor e três casos de lesão por queimadura elétrica. Os casos envolviam várias partes do corpo, incluindo membros superiores (n=15), membros inferiores (n=12), tórax (n=8) e abdome (n=5). Antes da excisão dos tecidos de CH, a pele foi higienizada com peróxido de hidrogênio a 3% e, em seguida, depilada com lâmina descartável (BIC® Twin Lady Sensitiv, Société BIC, França) e espuma de barbear. Durante a cirurgia, os tecidos de CH

foram completamente excisados e os tecidos de pele normal foram obtidos após essa excisão. Todos os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior preparação de RNA total e lisados de proteína total.

Pacientes com CH identificadas por médicos foram incluídos neste estudo. Nenhum paciente recebeu qualquer tratamento local com laser, medicamento ou outro tratamento da cicatriz, bem como qualquer medicação hormonal, nos três meses anteriores à cirurgia. Pacientes com quaisquer outras doenças infecciosas, imunológicas ou de pele foram excluídos. Antes da cirurgia, todos os pacientes foram informados sobre o objetivo e os procedimentos do estudo e concordaram em oferecer seus tecidos excisados. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes. Todos os protocolos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do General Hospital of Central Theater Command of People's Liberation Army.

### Cultura de células

FCH e fibroblastos normais adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram incubados em meio de Eagle Dulbecco modificado (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco). Todas as células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Transfecção celular

Os FCH foram semeados em placas de seis poços e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  até 80% de confluência antes da transfecção celular. O RNA *hairpin* curto (shRNA) direcionado contra ANGPT2 (sh-ANGPT2) e um shRNA controle negativo *scramble* (sh-NC) foram sintetizados pela GenePharma (Xangai, China). Em seguida, eles foram transfectados em FCH usando lipofectamine 3000 (Invitrogen). Vinte e quatro horas após a transfecção, sua eficiência foi avaliada por RT-qPCR.

### Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR).

O RNA total foi extraído de tecidos de CH e FCH usando o reagente TRIzol (Invitrogen). Em resumo, 500 ng de RNA total foram transcritos de forma reversa em cDNA usando um kit de transcrição reversa de cDNA (Takara, Japão). A amplificação do cDNA foi realizada com um kit SYBR Green PCR (Takara) no sistema ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster, CA). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) serviu como referência interna para normalizar a expressão dos genes alvo. Os níveis de expressão do gene alvo foram quantificados usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . As sequências de primers para PCR foram as seguintes: GAPDH *forward*, 5'-TCATTCCTGGTATGACAACGA-3' e *reverse*, 5'-GTCTTACTCCTTGGAGGCC-3'; ANGPT2 *forward*, 5'-CAATTATTCAGCGACGTGAG-3' e *reverse*, 5'-AAGGGTTACCAATCCCAC-3'.

### Western blotting

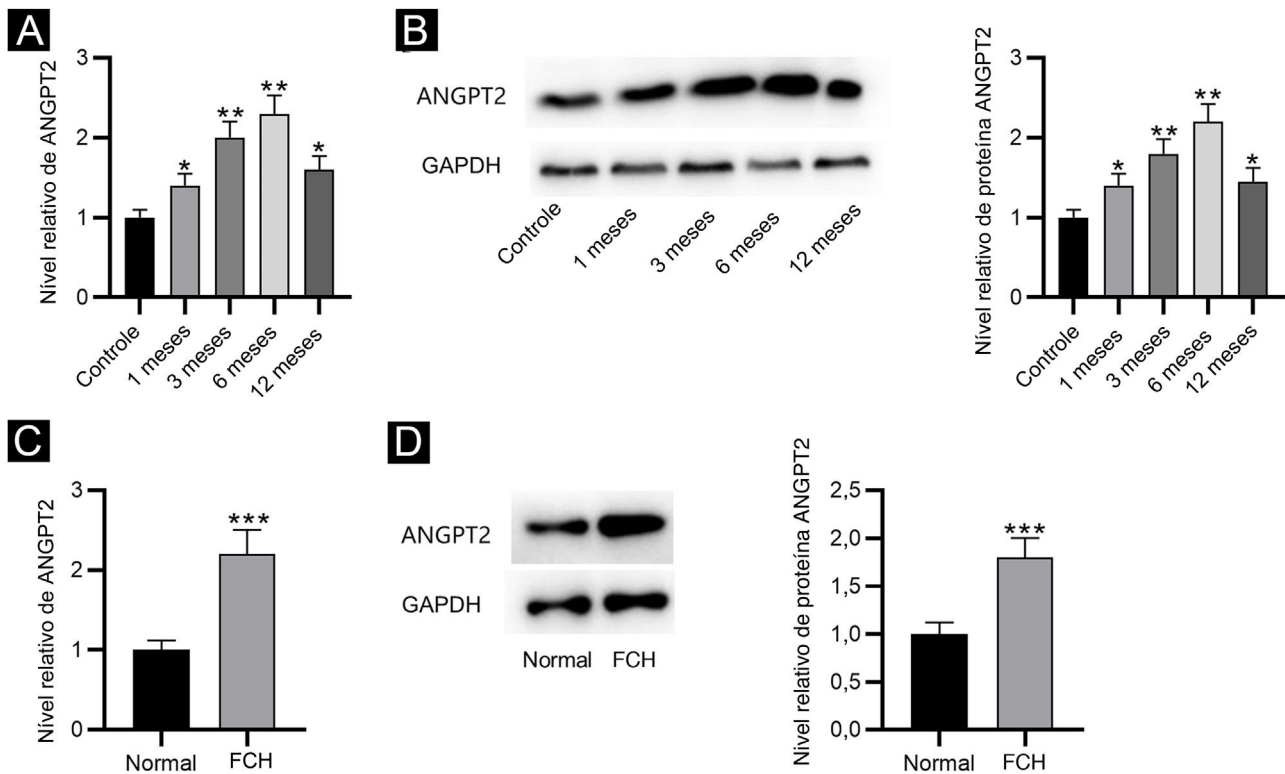
Os níveis de proteína de ANGPT2 em tecidos de CH e FCH, bem como os níveis de proteína dos marcadores da via PI3K/AKT/mTOR (PI3K, fosfo-PI3K  $\text{p-PI3K}$ , Akt, fosfo-Akt [p-Akt], mTOR, fosfo-mTOR [p-Mtor]), marcadores de migração celular (matriz metaloproteínas 2 [MMP2, MMP9]), marcadores de MEC (actina alfa de músculo liso [ $\alpha$ -SMA], colágeno tipo 1 [Col 1 e Col 3]) e marcadores de autofagia (LC3B, P62, Beclin-1 e proteína 5 relacionada à autofagia [ATG5]) em FCH foram medidos utilizando-se *Western blotting*. A proteína total foi extraída de tecidos de CH ou FCH usando tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (Beyotime) contendo inibidores de protease (Beyotime). A concentração de proteínas foi determinada usando um kit de ensaio de proteína de ácido bicinonínico (Beyotime). Em seguida, quantidades iguais de proteínas extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e depois transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA, EUA). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% por 1 hora, seguido de incubação com anticorpo primário contra ANGPT2 (1:1000, ab199133), PI3K (1:1000, ab191606), p-PI3K (1:1000, ab138364), Akt (1:2000, ab32505), p-Akt (1:1000, ab38449), mTOR (1:10000, ab134903), p-mTOR (1:1000, ab109268), MMP2 (1:1000, ab92536), MMP9 (1:1000, ab76003), Col 1 (1:1000, ab275746), Col 3 (1:5000, ab7778),  $\alpha$ -SMA (1:10000, ab124964), LC3B (1:2000, ab192890), P62 (1:1000, ab155686), Beclin-1 (1:2000, ab207612), ATG5 (1:1000, ab108327) and GAPDH (1:10000, ab181602) a  $4^{\circ}\text{C}$  por uma noite, todos adquiridos de Abcam (Cambridge, Reino Unido). No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com TBST e depois incubada com anticorpos secundários conjugados com HRP à temperatura ambiente durante 2 horas. As bandas de proteína foram detectadas utilizando-se um kit de detecção ECL (Thermo Fisher Scientific).

### Ensaio do kit-8 de contagem de células (CCK-8)

O ensaio CCK-8 foi empregado para avaliar a capacidade de proliferação celular. Após 48 horas de transfecção com sh-NC ou sh-ANGPT2, os FCH foram semeados em placas de 96 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço). Vinte e quatro horas depois, 10  $\mu\text{L}$  de solução de CCK-8 (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. Após 2 horas de incubação, a proliferação de FCH foi avaliada medindo-se a absorvância em diferentes momentos (24, 48 e 72 horas) utilizando um leitor de microplacas a 450 nm.

### Ensaio de migração Transwell

A câmara Transwell (8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, Corning) foi usada para medir a capacidade de migração celular. A câmara inferior foi preenchida com 500  $\mu\text{L}$  de meio FBS a 20%. Após 48 horas de transfecção, os FCH foram colhidos, lavados com PBS e ressuspensos em DMEM sem FBS. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de suspensão de células ( $1 \times 10^5$  células) foram colocados na câmara superior e depois cultivados por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . As células que não migraram foram removidas cuidadosamente com um cotonete. As células



**Figura 1** Expressão de ANGPT2 em tecidos de CH e FCH. (A-B) A expressão de ANGPT2 em tecidos de CH versus tecidos normais da pele foi avaliada por RT-qPCR e *Western blotting*. (C-D) A expressão de ANGPT2 em FCH em comparação com fibroblastos normais foi avaliada por RT-qPCR e *Western blotting*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

migratórias foram coradas com cristal violeta a 0,5% após fixação com metanol a 100% e observadas em microscópio invertido.

### Análise estatística

Os dados de pelo menos três experimentos independentes são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O software SPSS 20.0 (IBM, Chicago, IL, EUA) foi utilizado para análise estatística. A análise estatística dos dados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk mostrou que todos os dados tinham uma distribuição normal. Portanto, as comparações estatísticas contendo dois ou mais grupos foram realizadas por meio do teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) unidirecional seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## Resultados

### A ANGPT2 é regulada positivamente em tecidos de CH e FCH

Primeiro, os resultados de RT-qPCR e *Western blotting* revelaram que a expressão e os níveis de proteína da ANGPT2 estavam gradualmente elevados nos tecidos de CH em um, três e seis meses após a queimadura e foram parcialmente recuperados em 12 meses (fig. 1A-B). Além disso, a ANGPT2 também apresentou expressão e níveis de proteína

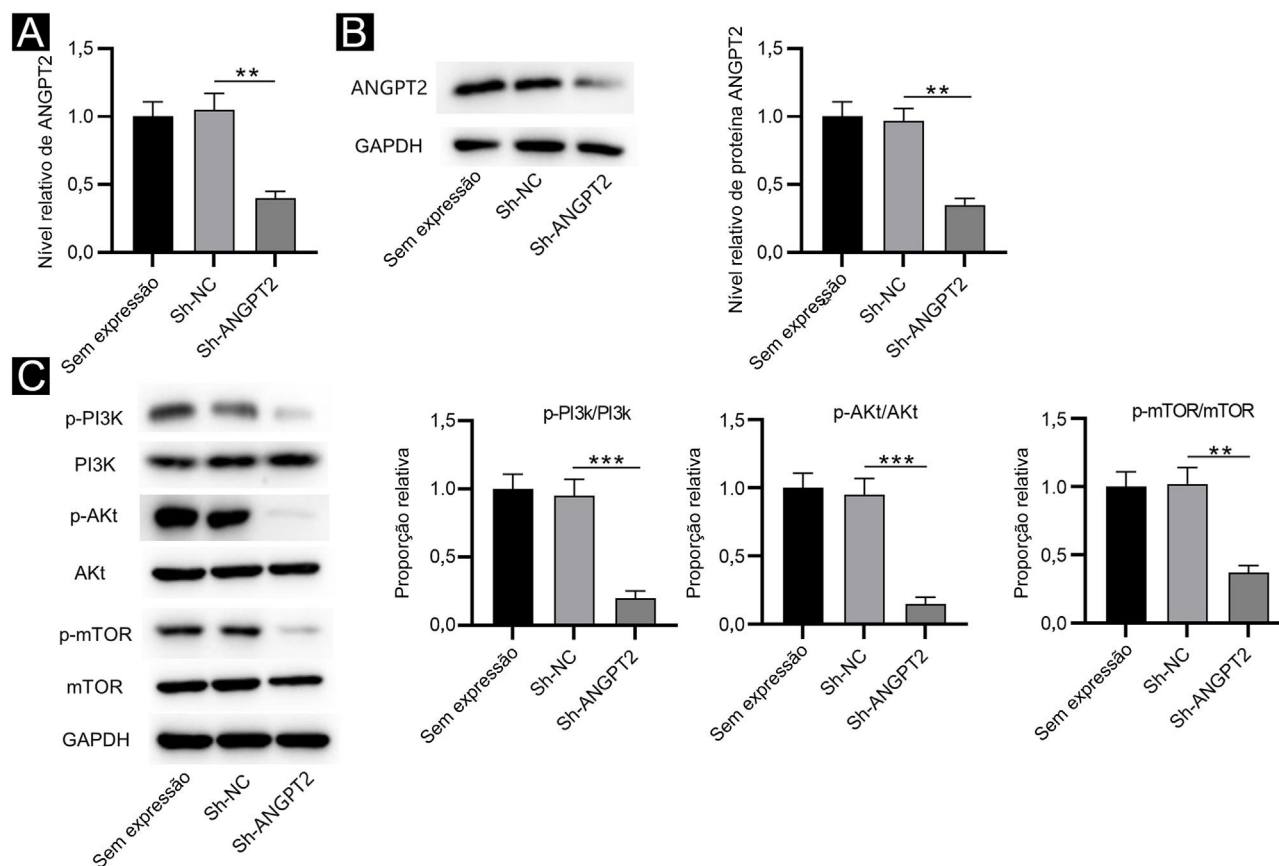
notavelmente regulados positivamente em FCH *versus* fibroblastos normais (fig. 1C-D). Portanto, a ANGPT2 é regulada positivamente em tecidos de CH e FCH.

### A inibição da ANGPT2 inativa a via PI3K/Akt/mTOR em FCH

RT-qPCR e *Western blotting* mostraram que a expressão de ANGPT2 estava significativamente reduzida em FCH transfectados com sh-ANGPT2 *versus* grupo sh-NC (fig. 2A-B). O *knockdown* da ANGPT2 reduziu drasticamente os níveis de proteína de p-PI3K, p-Akt e p-mTOR em FCH *versus* o grupo sh-NC (fig. 2C). Esses dados indicaram que a regulação negativa de ANGPT2 inativa a via PI3K/Akt/mTOR em FCH.

### A inibição da ANGPT2 ativa a autofagia através da supressão da via PI3K/Akt/mTOR

Como mostrado por *Western blotting*, os níveis de proteína de LC3B I e P62 estavam acentuadamente reduzidos, enquanto os níveis das proteínas de LC3B II, Beclin-1 e ATG5 estavam acentuadamente elevados em FCH após a regulação negativa de ANGPT2. Observou-se que a proporção de LC3B I e LC3B II estava obviamente aumentada após o *knockdown* de ANGPT2 (fig. 3A). Além disso, também foi observado que o tratamento com MHY1485, um ativador de mTOR, reverteu a influência da regulação negativa de ANGPT2 nos níveis de proteína dos marcadores de



**Figura 2** Efeitos do *knockdown* de ANGPT2 na via PI3K/Akt/mTOR em FCH. (A-B) A expressão da ANGPT2 em FCH transfectados com sh-ANGPT2 ou sh-NC foi medida por RT-qPCR e *Western blotting*. (C) Os níveis de proteínas relacionadas à via PI3K/Akt/mTOR em FCH após a regulação negativa de ANGPT2 foram medidos por *Western blotting*. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

autofagia acima mencionados em FCH (fig. 3A-E). Portanto, concluímos que a inibição de ANGPT2 ativa a autofagia por meio da repressão da via PI3K/Akt/mTOR em FCH.

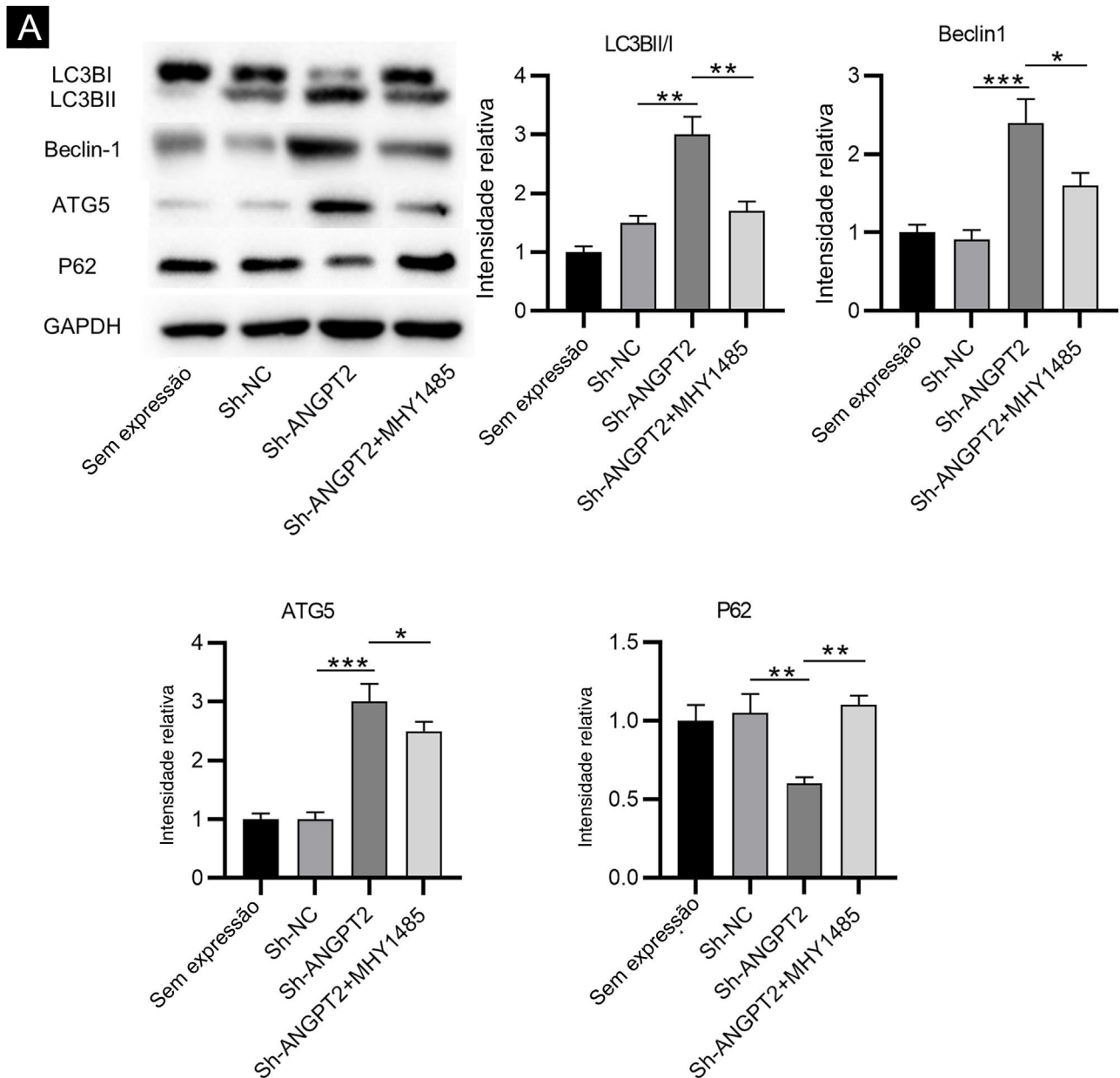
### A inibição de ANGPT2 melhora a disfunção celular por meio da supressão da via PI3K/Akt/mTOR

O ensaio CCK-8 demonstrou que a proliferação de FCH foi inibida após a regulação negativa de ANGPT2, enquanto o tratamento com MHY1485 reverteu parcialmente essa alteração (fig. 4A). O *knockdown* de ANGPT2 também reprimiu a migração de FCH, que foi parcialmente restaurada após o tratamento com MHY1485 (fig. 4B-C). Os níveis de MMP2 e MMP9 foram reduzidos após a regulação negativa de ANGPT2, e foram restaurados após o tratamento subsequente com MHY1485 (fig. 4D). Além disso, uma diminuição significativa nos níveis das proteínas  $\alpha$ -SMA, Col 1 e Col 3 foi observada em FCH transfectados com sh-ANGPT2. Entretanto, a adição de MHY1485 atenuou a influência inibitória do *knockdown* de ANGPT2 nos níveis de  $\alpha$ -SMA, Col 1 e Col 3 (fig. 4E). Em conclusão, o *knockdown* de ANGPT2 alivia a proliferação, a migração e o acúmulo de MEC anormais em FCH durante a formação de CH por meio da supressão da via PI3K/Akt/mTOR.

### Discussão

A CH é uma complicação prevalente durante o processo de cicatrização de feridas, que traz grande desconforto aos pacientes.<sup>18</sup> A terapia atual para CH, incluindo ressecção cirúrgica, terapia a laser, terapia com malhas compressivas e o uso de medicamentos para melhorar a aparência das cicatrizes, como gel de silicone, geralmente apresenta limitações e o resultado não é satisfatório.<sup>19</sup> Desse modo, o presente estudo pretende explorar os mecanismos moleculares subjacentes ao processo de formação de CH, descobrindo assim potenciais alvos para o tratamento das mesmas. O presente estudo demonstrou que a ANGPT2, que estava regulada positivamente no tecido de CH e FCH, ativou a autofagia por meio da inibição da via PI3K/Akt/mTOR. Além disso, o *knockdown* de ANGPT2 atenuou o crescimento excessivo, a migração e o acúmulo de MEC por meio da inibição da via PI3K/Akt/mTOR, o que atenuou a formação de CH.

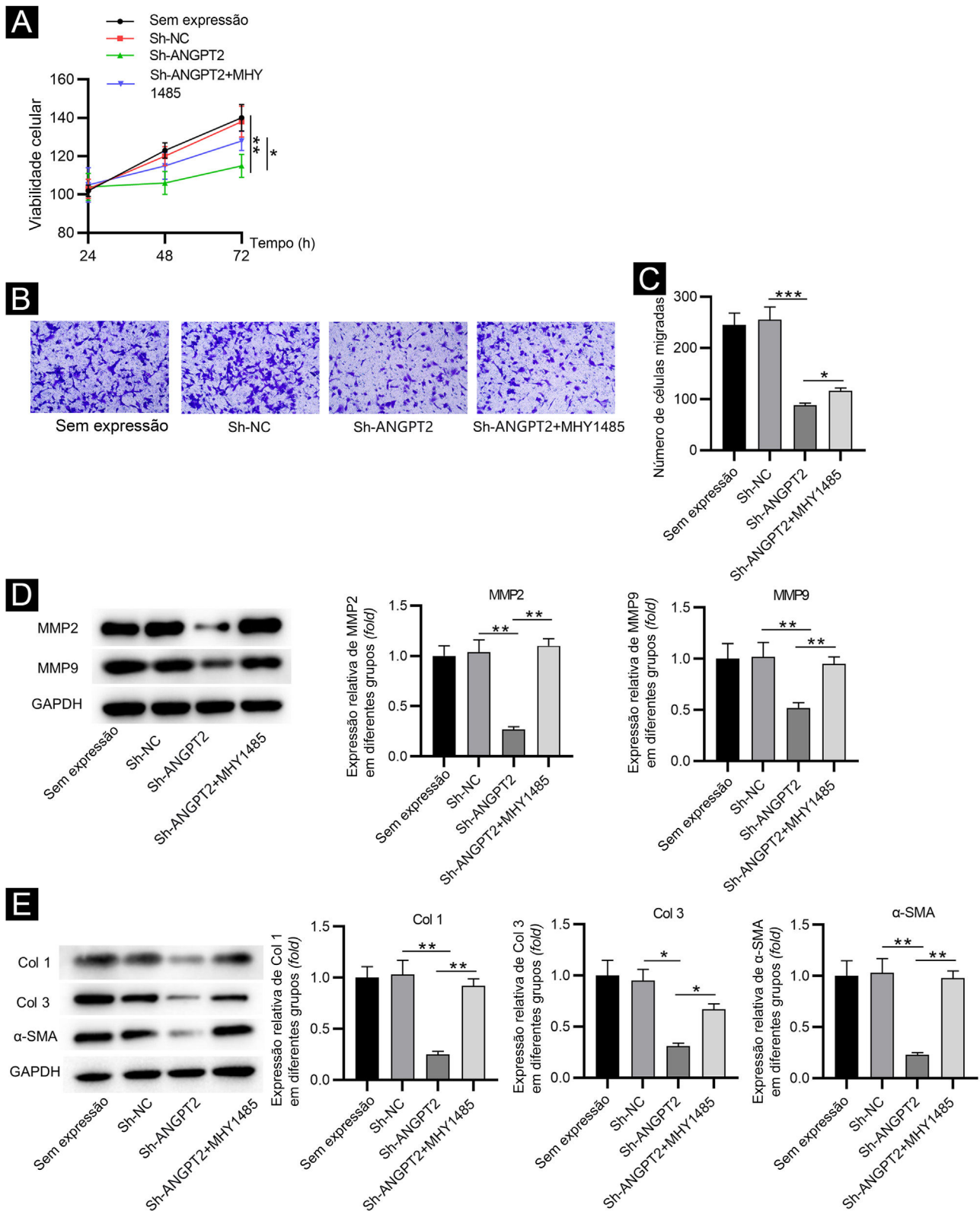
A formação de CH é causada principalmente pela proliferação e migração aberrantes de FCH, bem como deposição excessiva de MEC.<sup>20</sup> Anteriormente, muitos estudos relataram que a formação de CH poderia ser atenuada pela supressão do crescimento anormal de FCH e deposição excessiva de MEC. Por exemplo, miR-519d reduz a proliferação e induz a apoptose de FCH e reprime a



**Figura 3** Efeitos do *knockdown* de ANGPT2 na autofagia em FCH. (A) *Western blotting* foi utilizado para avaliar os níveis das proteínas LC3B I LC3B II, Beclin-1, ATG5 e p62 relacionadas à autofagia em FCH transfectados com sh-NC, sh-ANGPT2 ou sh-ANGPT2+MHY1485. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

expressão de genes relacionados à MEC, inibindo assim a formação de CH.<sup>21</sup> A regulação negativa de p75NTR suprime o crescimento, a migração e o acúmulo de MEC de FCH, atenuando assim a formação de CH.<sup>22</sup> A ANGPT2 é uma proteína secretada e um membro da família da angiopoi-etina, sendo fator-chave representativo para angiogênese e remodelação vascular.<sup>23</sup> A angiogênese tem papel crucial no processo de cicatrização de feridas, e relatos demonstram que cicatrizes hipertróficas contêm mais microvasos do que a derme normal.<sup>24</sup> Até agora, a terapia antiangiogênica foi confirmada como estratégia eficaz para a intervenção precoce em CH e foi utilizada para atenuar a formação de CH.<sup>25</sup> A ANGPT2 foi superexpressa de maneira significativa em fibroblastos derivados de tecidos de CH em comparação

com fibroblastos de tecidos normais da pele em estudo anterior,<sup>14</sup> o que sugere que a mesma pode participar do processo de formação de CH. No presente estudo, primeiro verificou-se que a expressão de ANGPT2 era maior em tecidos de CH e FCH do que em tecidos de pele normal e fibroblastos de pele normal. Então a ANGPT2 foi regulada negativamente em FCH, e verificou-se que a proliferação e migração anormais foram suprimidas. Foi relatado que as MMPs desempenham papéis significativos em vários estágios do processo de cicatrização de feridas, entre as quais MMP2 e MMP9 que estão intimamente relacionadas à migração de fibroblastos.<sup>26</sup> Utilizando *Western blotting*, verificou-se também que os níveis de MMP2 e MMP9 em FCH estavam reduzidos após o *knockdown* de ANGPT2. Além disso,



**Figura 4** Efeitos do *knockdown* de ANGPT2 sobre a proliferação e migração de FCH, bem como no acúmulo de MEC. (A) O ensaio CCK-8 foi realizado para avaliar a proliferação de FCH nos grupos Sem expressão, sh-NC, sh-ANGPT2 e sh-ANGPT2+MHY1485. (B-C) O ensaio Transwell foi realizado para avaliar a migração de FCH nos quatro grupos acima. (D) Os níveis de proteínas relacionadas à migração nos quatro grupos acima foram medidos por *Western blotting*. (E) *Western blotting* foi realizado para avaliar a expressão de proteínas relacionadas à MEC nos quatro grupos acima. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

como sabemos, a deposição excessiva de MEC resultará na fibrose do órgão, incluindo a pele, o maior órgão do corpo humano.<sup>27</sup> O colágeno é o componente mais importante da MEC.<sup>28</sup> Também foi demonstrado que a expressão de  $\alpha$ -SMA aumenta à medida que o grau de fibrose do órgão aumenta.<sup>29</sup> Demonstrou-se que Col 1, Col 3 e  $\alpha$ -SMA estão visivelmente aumentadas em CH e tem participação vital durante a formação do ambiente de MEC fibrótica.<sup>30</sup> Assim, foram detectados os níveis de  $\alpha$ -SMA, Col 1 e Col 3 em FCH após a regulação negativa de ANGPT2 utilizando *Western blotting*, o que indicou que o *knockdown* de ANGPT2 reduziu os níveis das proteínas  $\alpha$ -SMA, Col 1 e Col 3. Portanto, verificou-se que a inibição de ANGPT2 suprime o crescimento, a migração e o acúmulo de MEC em FCH, o que atenua o desenvolvimento de CH.

Autofagia refere-se ao processo pelo qual a membrana de dupla camada liberada da zona de fixação no ribossomo do retículo endoplasmático rugoso envolve parte do citoplasma e as organelas e proteínas que precisam de degradação na célula para formar autofagossomos.<sup>31</sup> Como processo fisiológico fortemente modulado, a autofagia é importante para o desenvolvimento, a diferenciação e a manutenção celular.<sup>32</sup> Foi relatado que a ativação da autofagia induz a supressão da proliferação, a migração celular e o acúmulo de MEC.<sup>33,34</sup> Em estudo anterior, uma capacidade autofágica reduzida dos fibroblastos foi associada à patogênese da CH.<sup>35</sup> Então, o presente estudo também investigou a influência do *knockdown* da ANGPT2 na autofagia de FCH. A ATG5, proteína estrutural composta por uma região de feixe  $\alpha$ -helicoidal (HBR, *helical bundle region*) e dois domínios de dobra semelhante à ubiquitina (UFDs, *ubiquitin-like-fold domains*), faz parte do complexo ATG12-ATG5 envolvido na formação ou alongamento de autofagossomos, agindo como enzima semelhante a E3 na lipidação de LC3.<sup>36</sup> Durante o processo de autofagia, LC3I é acoplada com fosfatidiletanolamina (PE) na presença de ATG5/ATG12 para formar LC3II, localizada nas membranas interna e externa da autofagia.<sup>37</sup> A presença de LC3 II é considerada símbolo da formação do autofagossomo.<sup>38</sup> A p62 é uma proteína adaptadora multifuncional que geralmente é selecionada como substrato da autofagia.<sup>39</sup> Na autofagia intacta, p62 tem uma região de interação curta com LC3 que promove interação direta com LC3 e faz com que a p62 seja especificamente degradada pela autofagia.<sup>40</sup> O nível de p62 tem sido utilizado como marcador para inibição de autofagia ou defeitos na degradação autofágica.<sup>41</sup> Beclin-1, como proteína de autofagia com autofagossomo maduro em mamíferos, também é um fator importante na regulação da autofagia.<sup>42</sup> Em estudos anteriores, a alteração nos níveis de LC3B I, LC3B II, p62, ATG5 e Beclin-1 foi avaliada para investigar a autofagia.<sup>43-45</sup> No presente estudo, os níveis dessas proteínas associadas à autofagia em FCH também foram avaliados após a regulação negativa de ANGPT2. Descobriu-se que o *knockdown* de ANGPT2 reduziu os níveis de LC3B I e P62 e aumentou os níveis de LC3B II, ATG5 e Beclin-1, o que demonstrou a ativação da autofagia. Portanto, os autores concluíram que a influência inibitória da ANGPT2 no crescimento, migração de FCH e acúmulo de MEC foi alcançada por meio da ativação da autofagia.

Muitas vias estão envolvidas na autofagia, entre as quais a via PI3K/Akt/mTOR tem sido amplamente investigada.<sup>46</sup>

Foi relatado em estudos anteriores que durante o desenvolvimento de múltiplas doenças, a autofagia celular é ativada por meio da supressão da via PI3K/Akt/mTOR. Por exemplo, PSORI-CM02 induz a autofagia por meio da inibição da via PI3K/Akt/mTOR, aliviando assim o desenvolvimento da psoríase, doença inflamatória da pele.<sup>47</sup> O sulfeto de hidrogênio exógeno restringe o desenvolvimento do melanoma da pele humana, facilitando a autofagia nas células de melanoma por meio da repressão da via PI3K/AKT/mTOR.<sup>48</sup> Além disso, durante a formação de CH, foi relatado que o silenciamento de p75NTR ativa a autofagia inibindo a via PI3K/Akt/mTOR.<sup>22</sup> Portanto, foi avaliado se o *knockdown* de ANGPT2 exerce efeitos sobre a autofagia durante o processo de formação de CH por meio da mediação da via PI3K/Akt/mTOR. Inicialmente, os níveis de proteína de p-PI3K, p-Akt e p-mTOR foram detectados em FCH, que mostraram uma redução significativa após a regulação negativa da ANGPT. Isso sugeriu que a via PI3K/Akt/mTOR foi restringida pela regulação negativa da ANGPT. Posteriormente, para confirmar o mecanismo regulatório da ANGPT2, o agonista de mTOR MHY1485 foi usado para ativar essa via. Foi observado que o tratamento com MHY1485 reduziu a atividade da autofagia em FCH com regulação negativa de ANGPT2 *versus* células somente com regulação negativa da ANGPT2. De maneira similar, a inibição da regulação negativa de ANGPT2 no crescimento, migração e acúmulo de MEC de FCH foi parcialmente restaurada após o tratamento com MHY1485. Coletivamente, a regulação negativa de ANGPT2 reprimiu o crescimento, migração e acúmulo de MEC de FCH pela ativação da autofagia através da inibição da via PI3K/Akt/mTOR.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a inibição de ANGPT2 ativou a autofagia por meio da supressão da via PI3K/Akt/mTOR. Além disso, o *knockdown* da ANGPT2 inibiu ainda mais a proliferação, migração e acúmulo de MEC em FCH por meio do mecanismo mencionado acima. Esses resultados indicam que a ANGPT2 pode representar um novo alvo potencial para atenuar a formação de CH.

## Suporte financeiro

Esse estudo recebeu suporte financeiro da Natural Science Foundation da Província de Hubei (n° 2020CFB210).

## Contribuição dos autores

Hongxin Cheng: Concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados; análise estatística; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica do manuscrito; aprovação da versão final do manuscrito.

Kai Xu: Concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados; análise estatística; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica do manuscrito; aprovação da versão final do manuscrito.

Chao Sun: Obtenção, análise e interpretação dos dados; revisão crítica da literatura; aprovação da versão final do manuscrito.



Si Gui: Coleta, análise e interpretação dos dados; Revisão crítica da literatura; Aprovação da versão final do manuscrito.

Juanjuan Wu: Obtenção, análise e interpretação dos dados; revisão crítica da literatura; aprovação da versão final do manuscrito.

Song Wang: Participação efetiva na orientação da pesquisa; obtenção, análise e interpretação dos dados; análise estatística; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica do manuscrito; aprovação da versão final do manuscrito.

## Conflito de interesses

Nenhum.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os membros do laboratório envolvidos neste estudo.

## Referências

- Diegidio P, Hermiz S, Hibbard J, Kosorok M, Hultman CS. Hypertrophic Burn Scar Research: From Quantitative Assessment to Designing Clinical Sequential Multiple Assignment Randomized Trials. *Clin Plast Surg*. 2017;44:917–24.
- Song J, Li X, Li J. Emerging evidence for the roles of peptide in hypertrophic scar. *Life Sci*. 2020;241:117174.
- Li-Tsang CWP, Lau JCM, Chan CCH. Prevalence of hypertrophic scar formation and its characteristics among the Chinese population. *Burns*. 2005;31:610–6.
- Zhang J, Li Y, Bai X, Li Y, Shi J, Hu D. Recent advances in hypertrophic scar. *Histol Histopathol*. 2018;33:27–39.
- Ogawa R, Dohi T, Tosa M, Aoki M, Akaishi S. The Latest Strategy for Keloid and Hypertrophic Scar Prevention and Treatment: The Nippon Medical School (NMS) Protocol. *J Nippon Med Sch*. 2021;88:2–9.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221:3–12.
- Kim KH, Lee MS. Autophagy a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:322–37.
- Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:460–73.
- Qiang L, Yang S, Cui YH, He YY. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing. *Autophagy*. 2021;17:2128–43.
- Zeng T, Wang X, Wang W, Feng Q, Lao G, Liang Y, et al. Endothelial cell-derived small extracellular vesicles suppress cutaneous wound healing through regulating fibroblasts autophagy. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133:CS20190008.
- Scholz A, Plate KH, Reiss Yvonne. Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1347:45–51.
- Akwii RG, Sajjib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*. 2019;8:471.
- Huang H, Ni H, Ma K, Zou J. ANGPTL2 regulates autophagy through the MEK/ERK/Nrf-1 pathway and affects the progression of renal fibrosis in diabetic nephropathy. *Am J Transl Res*. 2019;11:5472–86.
- Tu L, Huang Q, Fu S, Liu D. Aberrantly expressed long noncoding RNAs in hypertrophic scar fibroblasts in vitro: A microarray study. *Int J Mol Med*. 2018;41:1917–30.
- Wang K, Liu W, Song Y, Wu X, Zhang Y, Li S, et al. The role of angiopoietin-2 in nucleus pulposus cells during human intervertebral disc degeneration. *Lab Invest*. 2017;97:971–82.
- Shao Q, et al. The Chinese herbal prescription JZ-1 induces autophagy to protect against herpes simplex Virus-2 in human vaginal epithelial cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Ethnopharmacol*. 2020;254:112611.
- Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal*. 2014;26:2694–701.
- Yan D, Zhao H, Li C, Xia A, Zhang J, Zhang S, et al. A clinical study of carbon dioxide lattice laser-assisted or microneedle-assisted 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for the treatment of hypertrophic acne scars. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2022;38:53–9.
- Li P, Li-Tsang CWP, Deng X, Wang X, Wang H, Zhang Y, et al. The recovery of post-burn hypertrophic scar in a monitored pressure therapy intervention programme and the timing of intervention. 2018;44:1451–67.
- Xu S, Dong W, Shi Y. LncRNA PICSAR binds to miR-485-5p and activates TGF- $\beta$ 1/Smad to promote abnormal proliferation of hypertrophic scar fibroblasts (HSFs) and excessive deposition of extracellular matrix (ECM). 2021;54:337–45.
- Zhou X, Xi Y, Xiao H, Deng X, Wang Y, Jliang L, et al. MicroRNA-519d inhibits proliferation and induces apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts through targeting Sirtuin. 2018;100:184–90.
- Shi W, Wu Y, Bian D. p75NTR silencing inhibits proliferation, migration, and extracellular matrix deposition of hypertrophic scar fibroblasts by activating autophagy through inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021;99:349–59.
- Endo Y, Obayashi Y, Ono T, Serizawa T, Murakoshi M, Ohyama M. Reversal of the hair loss phenotype by modulating the estradiol-ANGPT2 axis in the mouse model of female pattern hair loss. *J Dermatol Sci*. 2018;9:43–51.
- van der Veer WM, Niessen FB, Ferreira JA, Zwiers PJ, Jong EH, Middelkoop E, et al. Time course of the angiogenic response during normotrophic and hypertrophic scar formation in humans. 2011;19:292–301.
- Wang P, Jiang LH, Xue B. Recombinant human endostatin reduces hypertrophic scar formation in rabbit ear model through down-regulation of VEGF and TIMP-1. 2016;16:542–53.
- Elkhider A, Wei J, Al-Azab M, Tang Y, Walana W, Li W, et al. IL-34 modulates rheumatoid synovial fibroblasts proliferation and migration via ERK/AKT signalling pathway. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38:479–87.
- Sun J, Jin T, Su W, Guo Y, Niu Z, Guo J, et al. The long non-coding RNA PFI protects against pulmonary fibrosis by interacting with splicing regulator SRSF1. *Cell Death Differ*. 2021;28:2916–30.
- Li A, Wei Y, Hung C, Vunjak-Novakovic G. Chondrogenic properties of collagen type XI, a component of cartilage extracellular matrix. *Biomaterials*. 2018;173:47–57.
- Salhab A, Amer J, Lu Y, Safadi R. Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide as target therapy for liver fibrosis. *Gut*. 2022;71:1373–85.
- Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26:141–52.
- Vats S, Manjithaya R. A reversible autophagy inhibitor blocks autophagosome-lysosome fusion by preventing Stx17 loading onto autophagosomes. 2019;30:2283–95.
- Zhang Z, Shao Z, Xiong L, Yang S. Inhibition of autophagy enhances cisplatin-induced apoptosis in the MG63 human osteosarcoma cell line. *Oncol Lett*. 2015;10:2941–6.

33. Patergnani S, Guzzo S, Mangolini A, dell'Atti L, Pinton P, Aguiari G. The induction of AMPK-dependent autophagy leads to P53 degradation and affects cell growth and migration in kidney cancer cells. 2020;395:112190.
34. Xu J, Chen Y, Xing Y, Ye S. Metformin inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation, inflammation, and ECM expression through the SIRT1-FOXO1-autophagy axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46:813–20.
35. Shi JH, Hu DH, Zhang ZF, Bai XZ, Wang HT, Zhu ZZ, et al. Reduced expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 in hypertrophic scars. *Arch Dermatol Res*. 2012;304:209–15.
36. Lin TY, Chan HH, Chen SH, Sarvagalla S, Chen PS, Coumar MS, et al. BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. *Autophagy*. 2020;16:1296–313.
37. Agrotis A, Pengo N, Burden JJ, Ketteler R. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*. 2019;15:976–97.
38. Hwang JY, Gertner M, Pontarelli F, Court-Vazquez B, Bennett MVL, Ofengeim D, et al. Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell death and differentiation*. 2017;24:317–29.
39. Jeong SJ, Zhang X, Rodriguez-Velez A, Evans TD, Razani B. p62/SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. 2019;31:458–71.
40. Shrestha BK, Rasmussem MS, Abudu YP, Bruun JA, Larsen KB, Alemu EA, et al. NIMA-related kinase 9-mediated phosphorylation of the microtubule-associated LC3B protein at Thr-50 suppresses selective autophagy of p62/sequestosome 1. *J Biol Chem*. 2020;295:1240–60.
41. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 2016;64:1994–2014.
42. Liang N, Liu X, Zhang S, Sun H. The role of Beclin-1 in IR-induced crosstalk between autophagy and G2/M cell cycle arrest. *Cell Signal*. 2019;62:109353.
43. Shi J, Xiao H, Li J, Zhang J, Li Y, Zhang J, et al. Wild-type p53-modulated autophagy and autophagic fibroblast apoptosis inhibit hypertrophic scar formation. 2018;98:1423–37.
44. Xia T, Zhang J, Zho C, Li Y, Duan W, Zhang B. et al., 20(S)-Ginsenoside Rh2 displays efficacy against T-cell acute lymphoblastic leukemia through the PI3K/Akt/mTOR signal pathway. *J Ginseng Res*. 2020;44:725–37.
45. Xiong Z, Xu J, Liu X. Oxymatrine exerts a protective effect in myocardial ischemia/reperfusion-induced acute lung injury by inhibiting autophagy in diabetic rats. *Mol Med Rep*. 2021;23:183.
46. Zhu S, Zhou J, Sun X, Zhou Z, Zhu Q. ROS accumulation contributes to abamectin-induced apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway in TM3 Leydig cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34:e22505.
47. Yue L, Ailin W, Jinwei Z, Leng L, Jianan W, Li L, et al. PSORI-CM02 ameliorates psoriasis in vivo and in vitro by inducing autophagy via inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Phytomedicine*. 2019;64:153054.
48. Xiao Q, Ying J, Qiao Z, Yang Y, Dai X, Xu Z, et al. Exogenous hydrogen sulfide inhibits human melanoma cell development via suppression of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Dermatol Sci*. 2020;98:26–34.