UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THIAGO ANTÔNIO MORETTI DE ANDRADE

**Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex
da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização
de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**

Ribeirão Preto

2012

THIAGO ANTÔNIO MORETTI DE ANDRADE

**Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex
da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização
de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**

Versão corrigida. O original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica –
Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE SEJA CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Thiago Antônio Moretti

Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos. Ribeirão Preto, 2012.

185 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Clínica Médica: Investigação Biomédica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani.

1. Cicatrização. 2. Inflamação. 3. Estresse Oxidativo. 4. Diabetes mellitus. 5. *Hevea brasiliensis*. 6. Análise de Imagem Assistida por Computador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDRADE, Thiago Antônio Moretti

Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica.

Aprovado em ____ / ____ / ____

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Instituição: FAEPA HCFMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

Instituição: FM-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior

Instituição: UFC

Assinatura: _____

Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Cristina Foss Freitas

Instituição: HC-FMRP-USP

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Paulo** e à minha mãe **Rita**,
que durante todos os dias de suas vidas dedicaram-se por inteiros, renunciando aos seus próprios sonhos em busca de realizar os meus. Meus queridos pais, por natureza, destino e amor, diante do caráter humano de vocês; as palavras são infinitamente menosprezíveis, as expressões tornam-se insuficientes e os gestos absolutamente dispensáveis. Juntos, as palavras, as expressões e os gestos silenciam em uma emoção ímpar impossível de ser traduzida. O exemplo de vida dado por vocês torna público ao mundo e declara o quanto sou abençoado por chamá-los de pai e mãe. Amo muito vocês.

Às minhas irmãs **Símore** e **Poliana**,
que me transmitiram forças para crescer e ser melhor a cada dia. A pureza do amor de vocês me transformou no melhor que pude ser. Durante a minha dedicação no tempo de execução dessa tese, aprendi algo maior que amar vocês com os olhos: amar com o coração.

"Só, enquanto eu respirar... vou me lembrar de vocês"
Fernando Anitelli

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À meu querido orientador **Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade**, que acreditou e alimentou cada vez mais meu amor pela ciência e pesquisa em cicatrização. Durante todo o período desse trabalho, muito obrigado por ter sido tão paciente e perfeccionista, intercalando momentos de supervisão, participação e críticas com momentos de amizade e suporte. Você me fez perceber que há um detalhe especial muito melhor do que finalizar um trabalho de doutorado: "Amar e valorizar muito o que se faz e o que se é. Se esforçar, dar o máximo sempre! Toda dificuldade faz parte do aprendizado." É o que você ensina para seus alunos! Parabéns!!!

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."
Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, pelo dom da existência e possibilidade de realização desse sonho.

À minha mãe *Rita*, ao meu pai *Paulo* e à minhas irmãs *Simone* e *Poliana*, vocês são as mais brilhantes estrelas da minha vida. Muito obrigada pelo apoio, compreensão e o amor inconstante de vocês.

Ao maior presente da minha vida, meu amor *Camila (Bibi)*, que desde quando começamos nosso amor, em plena disciplina de diabetes do Prof. Foss, compartilhou comigo todos os momentos dessa trajetória, com admiração e respeito, acreditando e fazendo parte da minha capacidade. Muito obrigado por fazer dos nossos dias os mais felizes da minha vida. “Busquei quem sou, você pra mim mostrou que eu não sou sozinho nesse mundo”. Thi amo muito, muito!

Aos meus queridos e amados avô *Walter Moretti* (in memorian), avó *Marietta Moretti*, avô *Waldemar de Andrade* e avó *Claricina de Andrade* (in memorian) pelo grande apoio em minha vida, pelo imenso orgulho em meu trabalho e por sempre quererem me verem bem, superando todas as dificuldades.

Agradeço *à todos* que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu querido orientador *Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade*, pela dedicação inconstante ao longo dessa caminhada. Obrigado pela sabedoria, paciência, apoio, carinho, confiança e credibilidade.

À querida "irmã postiça", amiga e colega *Dra. Daniela Masson*, pelo carinho, força e paciência nas sugestões fundamentais para o aperfeiçoamento desse trabalho. Pela amizade, companheirismo sempre em todos os momentos. Nossa união sempre firme para crescermos juntos! Nunca me esquecerei de nossas discussões sobre métodos, estudando juntos (mesmo que "*em virtude da dificuldade*"). Também sempre me lembrarei de nossas idas todos os dias no biotério para fazermos o curativo diário em nossos ratos. Sempre era um momento de descontração, apesar de tudo!

À querida amiga *Dra. Diane Rassi*, pelo carinho, amizade, companheirismo sempre em todos os momentos e paciência nas sugestões fundamentais para o aperfeiçoamento desse trabalho, sobretudo nos experimentos de citotoxicidade! Muito obrigado! Aprendi muito com você!

Ao querido amigo *Guilherme Caetano*, pela amizade, companheirismo de sempre, parcerias em todos os momentos! Você que chegou no lab. na hora certinha que eu estava precisando de alguém para me ajudar a contar as tantas e tantas imagens de histologia. Obrigado mesmo pela sua compreensão, pela sua força de vontade em aprender, pelo seu esforço, disposição e disponibilidade em me ajudar! É muito bom ensinar para quem quer aprender! Melhor ainda é aprender com quem quer e gosta de ensinar. Sucesso para você, meu amigo! É muito bom também ver o crescimento das pessoas dia-a-dia. Você bem sabe: é "*camelando*" que se aprende!

Ao querido amigo *Dr. Márcio Fronza*, pela amizade e companheirismo. Gaúcho que veio direto da Alemanha para trabalhar conosco e me ajudou muito nos ensinamentos de citotoxicidade pelo método MTT. Muito obrigado mesmo!

Ao querido amigo *MSc. Saulo Nani*, pela amizade, companheirismo, parcerias sempre em todos os momentos. Eu que agradeço por você sempre precisar de mim! Amigo é para essas coisas e estamos juntos sempre! Obrigado também por tudo que você me serviu.

Às queridas amigas *MSc. Cindy Hanna*, *Dra. Débora Minatel* e *MSc. Luisiane Santana* pela amizade, ensinamentos e troca de experiências. É sempre muito bom estar com vocês!

Aos *colegas do laboratório*, pelos dias árduos que convivemos juntos, alguns dos amigos mesmo que distantes ou trabalhando em outros departamentos, sempre estavam disponíveis em me ajudar independente do que eu precisasse. Agradeço muito por vocês terem feito parte de minha vida durante esse período: *Dra. Andreia*, *MSc. Ana Elisa*, *Dra. Flávia*, *MSc. Soraia*, *MSc. Victória Maciel*.

Aos *professores* das disciplinas cursadas na FMRP-USP, durante o curso de doutorado.

Às professoras da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, *Dra. Ana Maria Roselino*, *Dra. Cacilda Silva e Souza*, em especial à *Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss*, pelo carinho, disposição e amizade e às queridas secretárias "*Cris*" e *Wilde*.

Aos *Prof. Dr. Rubens Cecchini*, *Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani* e principalmente para a querida doutoranda *MSc. Vânia Aparecida Terra Malachias* do Laboratório de Radicais Livres em Patologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Obrigado Prof. Rubens e Profa. Alessandra pela amizade, parceria e pelos ensinamentos sobre estresse oxidativo e defesas antioxidantes. Agradeço em especial

à amiga Vânia, pelos seus ensinamentos, pelas conversas a respeito de estresse oxidativo, pelo esforço, dedicação, perfeição e compromisso em tudo que fez, pela paciência em me explicar passo a passo sobre os experimentos e dosagens do estresse oxidativo e defesas antioxidantes, sobre os imensos cálculos para chegar no resultado final da dosagem de NO, TRAP e lipoperóxidos de membranas, bem como a paciência e dedicação em me fazer entender melhor as vias, os elétrons que saem, que entram, os componentes oxidados, reduzidos.... Foi um estresse, mas adorei aprender estresse oxidativo!

Aos *professores da banca examinadora* Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto (FM-USP), Prof. Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior (UFC), Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto (FMRP-USP) e Profa. Dra. Maria Cristina Foss Freitas (HCFMRP-USP) por terem aceitado fazer parte da banca examinadora e por terem analisado a pró-forma com bastante esmero apontado diversas sugestões e críticas para melhoria do trabalho. Muito obrigado!

À técnica *Maria Aparecida Nunes*, do Laboratório de Cultura Celular da Dermatologia da FMRP-USP. Obrigado "Cici" pela grande ajuda com os experimentos e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao técnico *Mário Ignácio*, do Laboratório de Dermatologia da HCFMRP-USP. Obrigado pela amizade, companheirismo e ajuda.

À amiga doutoranda *MSc. Carolina Caliári Oliveira*, do Laboratório de Imunogenética (HLA) no Hemocentro-Ribeirão Preto-SP. Obrigado "Carol Furinho" pela grande ajuda com os experimentos de citometria de fluxo. Muito obrigado mesmo pela sua atenção e disponibilidade. Obrigado também ao *Prof. Dr. Júlio César Voltarelli* por ter permitido que eu fizesse a dosagem.

À amiga doutoranda *MSc. Sílvia Cellone Trevelin* do Laboratório de Dor e Inflamação da FMRP-USP. Obrigado pela amizade, paciência, gentileza, disponibilidade e ajuda na realização da dosagem de MPO. Obrigado também ao *Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha* por ter permitido que eu fizesse a dosagem.

À técnica *Vera Lúcia Epifânio*, do Laboratório de Neuroquímica da FMRP-USP. Obrigado "Verinha" pela grande ajuda, companheirismo e amizade de sempre, principalmente pelo preparo dos géis de carboximetil-celulose utilizados em todo o experimento.

À técnica *Paula Payão*, do Laboratório de Nutrição da FMRP-USP. Obrigado pela amizade, paciência e ajuda nas dosagens de MDA, FOX, proteínas totais e GSH. Obrigado também ao *Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Jr.* pela amizade, cooperação e parceria, e por ter permitido que eu fizesse a dosagem.

Aos técnicos *Kléber Loureiro*, *Gilberto André* e *Edna Moraes* da FORP-USP. Obrigado pelas perfeitíssimas lâminas de imunoistoquímica que vocês fizeram. Obrigado pelo carinho e amizade de vocês!!!

À técnica *Marilena Herédia*, *Rosângela* e *Auristela (Lili)* pelo processamento histológico (HE e tricrômio de Gomori) das biópsias no início do trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da FMRP-USP *Emerson Quirino de Oliveira*. Sempre muito prestativo e eficiente! Muito obrigado pela amizade e colaboração! Obrigado também aos funcionários da Secretaria Geral de Pós-Graduação da FMRP-USP.

Aos funcionários *Renato* e *Marquinhos* do Departamento de Cirurgia e Anatomia no Anexo B (FMRP-USP) que gentilmente me emprestaram um espaço no biotério do Departamento para que eu pudesse não interromper meus experimentos com os ratos diabéticos e não diabéticos, quando o Biotério da Clínica Médica no Anexo A (FMRP-USP) estava em reforma.

Aos *funcionários da Biblioteca Central* do Campus da USP de Ribeirão Preto.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP: *Adalberto, Mauricio* e *Roni*, pela ajuda nos experimentos e no cuidado com os ratos.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (FMRP-USP)* pela oportunidade de crescimento científico e pessoal!

Aos auxílios financeiros concedidos pela *FAPESP, CAPES, CNPq* e *FAEPA* durante a vigência do doutorado.

À todos os *meus amigos e familiares*, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que por ventura não tenham sido mencionado, muito obrigado!

*"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar"*

-Chico Xavier

Que sei eu do que serei, eu que não sei o que sou?
Ser o que penso? Mas penso ser tanta coisa!
E há tantos que pensam ser a mesma coisa que não pode haver tantos! (...)
Eu, que não tenho certeza, sou mais certo ou menos certo? (...)
Quantas aspirações altas e nobres e lícidas (...)
E quem sabe realizáveis (...)
O mundo é para quem nasce para o conquistar
E não para quem sonha que pode conquistá-lo, ainda que tenha razão...
Tabacaria, Fernando Pessoa/Álvaro de Campos

RESUMO

ANDRADE, T. A. M. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos.** 2012. 152 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O diabetes, relacionado ao estresse celular, altera consideravelmente a cicatrização de úlceras cutâneas. O látex da seringueira *Hevea brasiliensis* tem se apresentado como importante indutor da cicatrização especialmente nas ulcerações comprometidas pelo diabetes no qual foi observado clinicamente estímulo do látex à total reepitelização. Foram avaliadas as modificações teciduais e os mecanismos de ação da fração proteica (F1) do látex na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos e não diabéticos. Inicialmente, foi testada a citotoxicidade da F1 em culturas de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos pelo método MTT. Em seguida, foram utilizados 80 ratos Wistar, dos quais 40 foram induzidos ao diabetes (DM) (por streptozotocina 45 mg/Kg) e 40 não-diabéticos (N), submetidos a úlceras dorsais por *punch* (1,5 cm de diâmetro), as quais foram tratadas com gel de carboximetil-celulose (CMC) 4% (DM/N-sham) e CMC+F1 0,01% (DM/N-F1), seguidos por 2, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Após eutanasiados 10 animais/tempo/grupo, biópsias da pele/úlcera/cicatriz foram coletadas para estudo da reepitelização pelo cálculo do índice de cicatrização; histomorfometria (HE e Gomori) para quantificação de infiltrado inflamatório, vasos, fibroblastos e % da área de colágeno; imunoistoquímica para OSM, OSMR- β , iNOS, VEGF, eNOS, TGF- β 1, IGF, e sinalizadores da insulina: IRS, AKT, SHC e ERK; dosagem do estresse oxidativo (NO-óxido nítrico, LPM-lipoperóxidos de membranas, MPO-mieloperoxidase, MDA-malondialdeído, FOX-H₂O₂ e defesas antioxidantes: GSH-glutationa e TRAP-Capacidade Antioxidante Total e citometria de fluxo para CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺. A fração F1 apresentou-se atóxica em relação às culturas de fibroblastos NHI-3T3 e queratinócitos humanos. Além disso, a pele diabética (sem tratamento) apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório (p=0,0001) e estresse oxidativo [NO (p=0,0473) e LPM (p=0,0001)] que a não diabética. No entanto, o DM diminuiu na pele os níveis de angiogênese (p=0,0001), VEGF (p=0,0002) e eNOS (p=0,0206) bem como a sinalização da insulina (IRS-p=0,0001, AKT-p=0,0041, SHC-p=0,0006, ERK-p=0,0002) em relação dos não diabéticos. Quando a proteína F1 foi utilizada no tratamento das úlceras dos ratos diabéticos, houve importante quimiotaxia de células inflamatórias para a úlcera até o 7º dia (p=0,0452), especialmente PMN, com maior estresse oxidativo [OSM, OSMR- β , iNOS, NO, MPO, FOX e LPM (p=0,0001)], além de assemelhar-se à cicatrização normal (grupo N sham). Este estímulo à fase inflamatória e ao estresse oxidativo pareceu favorecer as próximas fases da cicatrização, aumentando a angiogênese, VEGF e eNOS no 14º e 21º dia, o que certamente favoreceu a reepitelização (p=0,0026). Os efeitos da associação F1 x DM também pareceu estimular a fibroplasia no 14º e 21º dia (p=0,0121) e colagênese (p=0,0001). Além disso, F1 associada ao DM permitiu maior expressão de IRS, SHC e ERK diferente do DM sham e também semelhante ao N sham. Sendo assim, o maior recrutamento de células inflamatórias, estímulo à produção de citocinas e fatores de crescimento, o estresse oxidativo desencadeado até o 14º dia, o importante estímulo à fibroplasia e colagênese bem como a importante ativação da sinalização da insulina, outrora diminuída nos diabéticos, foram fatores essenciais que permitiram a total reepitelização das úlceras cutâneas tratadas com F1 nos ratos diabéticos.

Palavras-chave: Cicatrização. Inflamação. Estresse Oxidativo. Diabetes *mellitus*. *Hevea brasiliensis*. Análise de imagem Assistida por Computador.

ABSTRACT

ANDRADE, T. A. M. **Tissue modifications and mechanisms of action of F1-fraction of latex from *Hevea brasiliensis* rubber tree on wound healing in diabetic rats.** 2012. 152 p. Thesis (Doctoral Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Diabetes, stress-related cellular changes considerably the healing of skin ulcers. The latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis* has emerged as an important inducer of healing ulcerations especially in compromised by diabetes in which it was clinically observed stimulation of latex to complete reepithelialization. We evaluated the tissue changes and the mechanisms of action of the protein fraction (F1) of the latex on the healing of cutaneous ulcers in diabetic and nondiabetic rats. Initially, we tested the cytotoxicity of F1 in cultured fibroblasts NIH-3T3 and human keratinocytes by MTT method. Then, we used 80 Wistar rats, of which 40 were induced diabetes (DM) (by streptozotocin 45 mg / kg) and 40 non-diabetic (N), dorsal ulcers underwent punch (1.5 cm diameter) , which were treated with gel of carboxymethyl cellulose (CMC) 4% (MD / N-sham) or CMC 0.01% + F1 (DM/N-F1), followed by 2, 7, 14 and 21 days after injury. After euthanized 10 animals / time / group, biopsies of skin / ulcer / scar were collected for the study of reepithelialization by calculating the rate of healing; histomorphometry (HE and Gomori) for quantification of inflammatory infiltrate, vessels, fibroblasts and collagen% of the area ; immunohistochemistry for OSM, OSMR- β , iNOS, VEGF, eNOS, TGF- β 1, IGF and insulin signaling: the IRS, AKT, ERK and SHC; dose of oxidative stress (NO, nitric oxide, LPM-membrane lipoperoxides, MPO, myeloperoxidase, MDA-malondialdehyde, FOX-H₂O₂ and antioxidant defenses: GSH-glutathione and TRAP-total antioxidant capacity and flow cytometry for CD11b +, CD4 + and CD8 +. fraction F1 presented nontoxic of cultures fibroblast NIH- 3T3 cells and human keratinocytes. In addition, diabetic skin (no treatment) had higher amounts of inflammatory infiltrate (p = 0.0001) and oxidative stress [NO (p = 0.0473) and LPM (p = 0.0001)] than non-diabetic. However, DM skin decreased levels of angiogenesis (p = 0.0001), VEGF (p = 0.0002) and eNOS (p = 0.0206) as well as insulin signaling (IRS P = 0.0001, p = 0.0041 AKT-, -SCH p = 0.0006, ERK-p = .0002) than non-diabetic subjects. When the F1 protein was used in the treatment of ulcers of diabetic rats , there was a significant chemotaxis of inflammatory cells for the ulcer to the 7th day (p = 0.0452), especially PMN with higher oxidative stress [OSM, OSMR- β , iNOS, NO, MPO, FOX and LPM (p = 0 , 0001)], and resemble the normal healing (sham group N). This stimulation of the inflammatory and oxidative stress seemed to favor the next phases of wound healing by increasing angiogenesis, VEGF and eNOS in 14 and 21 days , which certainly favored the re-epithelialization (p = 0.0026). The effects of the combination F1 x DM also appeared to stimulate fibroplasia in 14 and 21 days (p = 0.0121) and collagenesis (p = 0.0001). In addition, F1 associated with DM allowed a greater expression of IRS, SHC and ERK different from sham DM and also similar to N sham. Thus, the increased recruitment of inflammatory cells, stimulate the production of cytokines and growth factors, stress oxidative triggered until the 14th day, the important stimulus to fibroplasia and collagenesis well as the important activation of insulin signaling, once diminished in diabetics, were key factors that allowed total reepithelialization of cutaneous wounds treated with F1 in diabetic rats.

Keywords: Wound Healing. Inflammation. Oxidative Stress. Diabetes *mellitus*. *Hevea brasiliensis*. Image Processing, Computer-Assisted.

LISTA DE SIGLAS

BLN	biomembrana de látex natural
CAT	catalase
CD4⁺	Linfócito T CD4 ⁺
CD8⁺	Linfócito T CD8 ⁺
CD11b⁺	Macrófagos
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epitelial
eNOS	NO sintase endotelial
ePTFE	Politetrafluoretileno
F1	Fração proteica F1
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FITC	fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOX	<i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HUVEC	Cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana
ICU	Índice de cicatrização das úlceras
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IgG	Imunoglobulina
iNOS	NO sintase induzida
IRS-1-4	Substratos do receptor de insulina

KDF-2	Fator de crescimento derivado de queratinócitos
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido Nítrico
O₂⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSM	Oncostatina M
OSMR-β	Receptor de oncostatina M
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PE	Ficoeritrina
PKC	Proteína quinase
RNS	Espécies reativas do nitrogênio
RO₂[·]	Radical peroxila
RO	Radical alcoxila
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SHC	Src homology collagen
SOD	Superoxido dismutase
TBA	Tiobarbitúrico
TGF-β1	Fator transformador de crescimento beta
TMB	3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine
TNF-α	Fator de necrose tumoral
XO	Xylenol-orange

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>Úlceras cutâneas</i>	21
1.2	<i>Cicatrização de úlceras</i>	23
1.2.1	Hemostasia	23
1.2.2	Fase inflamatória	25
1.2.2.1	Estresse celular e mecanismos de defesas antioxidantes	30
1.2.2.1.1	Marcadores do estresse celular e dos mecanismos de defesas antioxidantes	34
1.2.3	Fase de proliferação tecidual	36
1.2.4	Fase de remodelagem tecidual	39
1.3	<i>Diabetes mellitus</i>	41
1.3.1	Tipos de diabetes	41
1.3.2	Epidemiologia do diabetes	42
1.3.3	Sinalização da insulina	43
1.3.4	Fisiopatologia e complicações do diabetes	44
1.4	<i>Tratamento de úlceras</i>	47
1.5	<i>Estudos do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização</i>	48
2	OBJETIVOS	53
2.1	<i>Objetivos gerais</i>	53
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1	<i>Avaliação da citotoxicidade da F1 em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos</i>	55
3.1.1	Fonte de queratinócitos	55
3.1.2	Coleta de material	55
3.1.3	Processamento da pele e cultivo	56
3.1.4	Cultura celular	56
3.1.5	Avaliação da viabilidade celular	57

3.2	<i>Animais</i>	59
3.3	<i>Indução do diabetes</i>	59
3.4	<i>Animais não diabéticos</i>	60
3.5	<i>Procedimento cirúrgico: confecção de úlceras cutâneas dorsais</i>	60
3.6	<i>Extração do látex natural e obtenção de F1 a partir do soro total</i>	61
3.7	<i>Produção do gel de carboximetil-celulose incorporado com a fração F1 do látex da seringueira H. brasiliensis</i>	63
3.8	<i>Padronização dos grupos</i>	63
3.9	<i>Eutanásia e dias de seguimento das avaliações</i>	64
3.10	<i>Seguimento clínico-experimental: captura de imagens</i>	64
3.11	<i>Análise de imagens: avaliação do índice de cicatrização das úlceras pelo ImageJ</i>	65
3.12	<i>Coleta do material para estudo</i>	68
3.13	<i>Estudo histopatológico (histomorfometria)</i>	69
3.13.1	<i>Avaliação quantitativa por imagem do infiltrado inflamatório e fibroblastos e vasos sanguíneos</i>	69
3.13.2	<i>Avaliação quantitativa por imagem da colagênese</i>	74
3.14	<i>Estudo imunoistoquímico</i>	77
3.15	<i>Citometria de fluxo</i>	80
3.16	<i>Estudo do estresse celular e defesas antioxidantes</i>	82
3.16.1	<i>Quantificação de NO: reação de quimiluminescência induzida por H₂O₂-luminol</i>	82
3.16.2	<i>Dosagem de mieloperoxidase (MPO)</i>	83
3.16.3	<i>Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS- "Thiobarbituric Acid Reactive Substances")</i>	84
3.16.4	<i>Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)</i>	85
3.16.5	<i>Análise da formação de lipoperóxidos de membranas por quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil hidroperóxido</i>	85
3.16.6	<i>Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por quimiluminescência</i>	86

3.16.7	Determinação da glutathiona reduzida (GSH)	88
3.16.8	Determinação das proteínas totais	88
3.17	<i>Análise dos resultados</i>	89
4	Resultados	92
4.1	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	92
4.2	<i>Confirmação do estado diabético</i>	93
4.3	<i>Diferenças entre a pele dos ratos diabéticos e dos não diabéticos</i>	95
4.3.1	Células inflamatórias, proteínas totais, OSM e OSMR- β	96
4.3.2	Estresse celular (iNOS, NO, MPO, MDA, FOX e lipoperóxidos de membranas) e defesas antioxidantes (TRAP e GSH)	98
4.3.3	Vasos sanguíneos, VEGF e eNOS	100
4.3.4	Fibroblastos, colágeno, TGF- β 1 e IGF	100
4.3.5	Marcadores da sinalização da insulina (IRS, AKT, SHC e ERK)	103
4.4	<i>Diferenças entre a pele dos ratos diabéticos e dos não diabéticos tratados e não tratados nas úlceras cutâneas com F1</i>	104
4.4.1	Estudo da fase inflamatória da cicatrização	104
4.4.1.1	Estresse celular	116
4.4.1.2	Defesas antioxidantes	123
4.4.2	Estudo da angiogênese	125
4.4.3	Estudo da reepitelização, fibroplasia e colagênese	132
4.4.4	Marcadores da sinalização da insulina	142
5	DISCUSSÃO	152
6	CONCLUSÕES	168
	REFERÊNCIAS	171
	ANEXOS	184

Introdução

"A confusão começa a aparecer quando começamos a colocar tudo em ordem."
_ Paulo Coelho

"Toda glória deriva da ousadia para começar."
_ Eugene F. Ware

1 INTRODUÇÃO

1.1 Úlceras cutâneas

Úlceras cutâneas são definidas como um rompimento da continuidade anatômica da pele (envolvendo derme e/ou epiderme) e de sua funcionalidade (DIEGELMNN; EVANS, 2004; KOKANE, 2009; SCHMIDT et al., 2009). Várias doenças de base como insuficiência vascular arterial e venosa, insuficiência nutricional, perda de mobilidade, imunodeficiência e exacerbação de comorbidades como diabetes, insuficiência cardíaca e infecção, prejudicam a integridade cutânea tornando propício o desenvolvimento de úlceras. Uma vez que a pele é rompida, a lesão pode progredir rapidamente à úlcera profunda e extensa (JAUL, 2009).

O aumento da expectativa de vida e o rápido incremento da população idosa têm sido apontados como determinantes sociais da crescente prevalência de condições crônicas de saúde. Neste contexto, as úlceras cutâneas assumem importância, visto que podem estar relacionadas a doenças crônico-degenerativas associadas à idade, como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e artrite reumatóide. Projeções publicadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que a população idosa aumente cerca de sete a oito vezes até o ano 2025 (LIMA; COSTA et al., 2000).

A maioria das úlceras é causada por isquemia secundária a estase venosa, pressão e diabetes *mellitus*. Úlceras que não cicatrizam, principalmente em pacientes idosos, podem tornar-se crônicas por anos ou mesmo levar estes pacientes a óbito (JAUL, 2009; MENKE et al., 2007).

Nos EUA aproximadamente 600.000 indivíduos têm úlceras venosas, com custo médio de dez mil dólares por indivíduo, outros 1,4 milhões têm úlceras por

pressão. O custo total do tratamento para estes dois grupos tem sido estimado em 8 milhões de dólares anualmente (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007).

Em 2003 uma pesquisa avaliou que o mercado americano de produtos para o cuidado de úlceras, incluindo curativos biológicos e sintéticos, é maior que 1,7 bilhões de dólares e estimou um aumento significativo conforme a população envelhece (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007).

Estudos realizados na União Européia têm estimado uma prevalência para úlceras de pé e perna de 1,48/1000 habitantes e com o avanço da idade, estes números aumentam (36/1000 habitantes com mais de 65 anos de idade). A prevalência anual de úlceras venosas de perna tem sido estimada em 1,69% para indivíduos com 65 anos de idade ou mais (HOWELL-JONES et al., 2005).

Tais resultados evidenciam a importância da doença úlcera cutânea na vida dos pacientes, tendo em vista os aspectos socioeconômicos e psicológicos. Um paciente com uma úlcera que não cicatriza tem diminuição da qualidade de vida devido ao desconforto, mau odor, presença de secreção, além de dano à imagem corporal, a qual resulta em isolamento social (JAUL, 2009). Outras complicações de úlceras crônicas incluem limitações funcionais (como dificuldade de locomoção), dor crônica, infecções (celulite, formação de abscessos, osteomielite e mesmo sepse) e amputação (MENKE et al., 2007).

Nos últimos séculos e nas décadas recentes inúmeros avanços trouxeram mudanças significantes no conhecimento científico sobre o processo cicatricial, que influenciaram as abordagens atualmente aceitas no tratamento de úlceras cutâneas (SHAI; MAIBACH, 2005).

Muitos curativos naturais e sintéticos, assim como métodos baseados em fototerapia (LEITE et al 2011, MINATEL et al 2009) têm sido alvos frequentes na busca de estratégias eficazes da estimulação do processo cicatricial, destacando dezenas de curativos impregnados com diferentes substâncias, desde vaselina a fatores de crescimento geneticamente produzidos e disponíveis comercialmente (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006a).

1.2 Cicatrização de úlceras

A cicatrização é um processo biológico complexo e multifatorial no qual há interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos levando à reconstituição e restauração da integridade tecidual. Embora os eventos no processo cicatricial ocorram de maneira sobreposta, características distintas são observadas e desta forma o processo pode ser didaticamente dividido em: **hemostasia**, **inflamação**, **proliferação** e **remodelamento tecidual** (DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; JAUL, 2009; MENKE et al., 2008; STOJADINOVIC et al., 2008; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

1.2.1 Hemostasia

O processo normal de cicatrização começa no momento que o tecido é lesado. Após a lesão e rompimento de vasos sanguíneos, ocorre extravasamento de sangue, que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares (plaquetas), ocorre aumento da permeabilidade vascular com liberação de proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina), aminas vasoativas e outros mediadores.

As aminas vasoativas aumentam a permeabilidade vascular permitindo que células efetoras (plaquetas, neutrófilos, monócitos e linfócitos) e proteínas do plasma atinjam o local lesado. Uma vez que os componentes do sangue extravasam para o local da lesão, as plaquetas entram em contato com colágeno exposto e outros elementos da matriz extracelular (MEC), agregam-se e são ativadas, liberando fatores da coagulação e citocinas (DIEGELMANN; EVANS, 2004; MONACO; LAWRENCE, 2003).

As plaquetas se aderem às fibras de colágeno expostas no endotélio lesado por meio de receptores específicos (glicoproteínas - GPIb/IX/V). A ativação plaquetária resulta na liberação do seu conteúdo granular e estimula a ativação local dos fatores da coagulação plasmática. Estes fatores estimulam a polimerização da fibrina resultando no depósito de um coágulo de fibrina no local da lesão, também conhecido como “tampão plaquetário”, levando à hemostasia. A trombina desempenha função central na coagulação convertendo o fibrinogênio em fibrina e induzindo a degranulação plaquetária, com liberação de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento epitelial (EGF) e fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) (BAUM; ARPEY, 2005; BEANES et al., 2003; FRADE, 2003; GURTNER et al., 2008; MANKAD; CODISPOTI, 2001; STOJADINOVIC et al., 2008; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

O coágulo age como uma barreira temporária prevenindo o sangramento excessivo e limitando a disseminação de patógenos para a corrente sanguínea. Inicialmente o coágulo é composto de plaquetas, fibrina e fibronectina, e serve como uma matriz provisória ou suporte para a migração celular (como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais) e agregação plaquetária, que irão liberar fatores de crescimento no tecido circunjacente durante os eventos subsequentes do processo cicatricial (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007; DIEGELMANN; EVANS, 2004; KARUKONDA et al., 2000; MONACO; LAWRENCE, 2003; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A remoção desta matriz provisória dificulta severamente o reparo da lesão (BEANES et al., 2003).

As plaquetas liberam não apenas os fatores da coagulação necessários para controlar o sangramento e perda de fluido e eletrólitos, mas também moléculas sinalizadoras (citocinas e fatores de crescimento), que iniciam a resposta cicatricial. Os dois fatores mais importantes são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento-beta (TGF- β).

O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, células de músculo liso e fibroblastos. Além disso, estimula a mitogênese de fibroblastos e células de músculo liso. TGF- β adiciona outro sinal importante para o início da cascata da cicatrização por atrair macrófagos e os estimular a secretar citocinas adicionais incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, TNF- α e IL-1 β (DIEGELMANN; EVANS, 2004; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). Células inflamatórias são quimiotaticamente atraídas ao reservatório de moléculas armazenadas no coágulo, o que inicia a inflamação, a próxima etapa na sequência do processo de cicatrização (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

1.2.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória é caracterizada pelos sinais típicos do processo inflamatório localizado, como dor, rubor, calor e edema, resultado da vasodilatação e da permeabilidade capilar aumentada (BAUM; ARPEY, 2005; MONACO; LAWRENCE, 2003). As principais células envolvidas são os neutrófilos e os macrófagos, e a principal função desta fase é preparar o local afetado para o crescimento do novo tecido (ABREU; MARQUES, 2005).

O processo de inflamação acontece para conter ou neutralizar o agente causador da lesão. O ambiente no qual se inicia a inflamação é uma mistura de tecido lesado, componentes do coágulo (plaquetas, células sanguíneas vermelhas, fibrina), proteínas extravasadas do plasma e material estranho introduzido no momento em que houve a lesão (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Os neutrófilos são as primeiras células a responder imediatamente após a formação do coágulo. Eles migram para o local lesionado como resposta aos quimioatraentes liberados pelas plaquetas, assim como quimiocinas presentes nas membranas das células endoteliais; bactérias também liberam sinais químicos,

atraindo neutrófilos que irão fagocitá-las. Conforme os mediadores inflamatórios se acumulam e prostaglandinas são produzidas, os vasos sanguíneos próximos ao local da lesão dilatam, estimulados por IL-1 β , TNF- α , TGF- β , e produtos bacterianos, para permitir o aumento do recrutamento de células inflamatórias para a área lesada, inicialmente, os neutrófilos (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; DIEGELMANN; EVANS, 2004).

O receptor PSGL-1 dos leucócitos se liga a P-selectina expressa nas plaquetas e células endoteliais (marginação). A baixa afinidade da ligação leva os neutrófilos livres a rolares pelo endotélio vascular (rolamento) e rapidamente se aderem às células endoteliais. O receptor de neutrófilo ligado a quimiocinas ativa integrinas, que ligam os neutrófilos as células endoteliais (adesão). Subsequentemente, o neutrófilo extravasa através da parede vascular para o leito da úlcera (diapedese).

No leito da úlcera os neutrófilos, muito importantes pela sua atividade microbicida, liberam enzimas proteolíticas (tal como a mieloperoxidase – MPO) para a digestão de restos celulares e contribuem para a morte de bactérias por meio de fagocitose, produção de superóxido ou peróxido de hidrogênio (espécies reativas derivadas do oxigênio – ROS) e óxido nítrico (NO) (DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; MONACO; LAWRENCE, 2003; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009; FIERRO et al., 1996; FIERRO et al., 1999)

Os principais agentes microbicidas de neutrófilos são as enzimas proteolíticas estocadas especialmente em grânulos azurofílicos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) onde estão presentes, principalmente, lisozimas, mieloperoxidase, elastase, catepsinas, hidrolases ácidas, lactoferrina, etc (SWAIN et al., 2002) e ROS, geradas pela ativação do sistema enzimático oxidativo, acoplado a membrana plasmática, responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo conhecido como NADPH oxidase ou simplesmente “burst” respiratório. Este é um sistema transportador de elétrons que transfere elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido (O₂⁻) (SWAIN et al., 2002), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e estes, a radicais livres

hidroxilas, denominados genericamente de intermediários reativos do oxigênio (MALECH; GALLIN, 1987).

Outra substância altamente reativa utilizada por neutrófilos para exercer sua função microbicida é o óxido nítrico (NO). Foi demonstrado que a produção de NO por neutrófilos de ratos através da indução da enzima iNOS foi capaz de causar a destruição de fungos e bactérias (FIERRO et al., 1996; FIERRO et al., 1999). Benjamim et al., (2000) demonstraram que a inibição da iNOS através da aminoguanidina foi capaz de reduzir drasticamente a atividade bactericida de neutrófilos de camundongos. Entretanto, enzimas proteolíticas e espécies ativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos ativados em excesso podem, em certas instâncias, serem liberadas no meio extracelular causando lesão tecidual (SWAIN et al., 2002). Por outro lado, há estudos em que baixos níveis de H_2O_2 são importantes para a eficácia da angiogênese na cicatrização (ROY et al., 2006).

Assim, as principais funções dos neutrófilos são: remover material estranho, bactérias e células não funcionais, e componentes danificados da MEC que podem estar presentes no local da úlcera (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Se a descontaminação da úlcera é completa, os neutrófilos entram em apoptose dentro de 48 horas. À medida que o número de neutrófilos diminui, estes são repostos por monócitos recrutados da circulação sanguínea por TGF- β e PDGF, que quando aderidos à matriz se transformam em macrófagos ativados e diferenciados, continuando o trabalho dos neutrófilos (BEANES et al., 2003; CHETTIBI; FERGUSON, 1999; FRADE, 2003; HARDING; PATEL, 2002; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A presença de mastócitos no tecido lesado também contribui para a resposta inflamatória por liberarem histamina e serotonina para melhorar a permeabilidade capilar e promover a migração de macrófagos (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Os macrófagos ativados são altamente fagocíticos, sendo também responsáveis pela remoção de células não funcionais, neutrófilos preenchidos com bactérias, MEC danificada, corpos estranhos, restos celulares e qualquer bactéria remanescente no leito da úlcera, participando ativamente da fase inflamatória por

meio do desbridamento tecidual, liberação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a fase de formação e reepitelização tecidual, atuando na fibroplasia e angiogênese (Figura 1).

Acredita-se que os macrófagos são mais importantes que os neutrófilos para a resolução satisfatória da inflamação. Em estudos onde os neutrófilos são depletados, o reparo não foi prejudicado, mas quando os macrófagos foram removidos, houve limpeza limitada do tecido necrótico no local da lesão, resultando em processo de cicatrização prolongado e demora da proliferação de fibroblastos com subsequente fibrose da úlcera. (BAUM; ARPEY, 2005; BEANES et al., 2003; DIEGELMANN; EVANS, 2004; GURTNER et al., 2008; STRONCEK, 2009; LEIBOVICH; ROSS, 1975).

A ativação dos macrófagos se dá inicialmente pela liberação de fatores provenientes dos grânulos plaquetários, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ além dos produtos da fagocitose de detritos celulares, como fibronectina ou colágeno (CHETTIBI; FERGUSON, 1999). Em seguida, são os linfócitos T CD4⁺ que passam a ser fonte importante das citocinas IL-1 β , IL-2, TNF- α , EGF e TGF- β que vão principalmente aumentar o recrutamento de monócitos para o leito da úlcera além de tornar os macrófagos cada vez mais ativados e com maior poder fagocítico (MONACO; LAWRENCE, 2003). É a última célula a entrar no leito da úlcera no final da fase inflamatória (72 horas após a lesão) e são recrutados pela ação da IL-1 β , componentes do sistema complemento e imunoglobulinas (IgG) (VELNAR; BAILEY, 2009). No sangue periférico normal, 70% a 80% é constituído por linfócitos T maduros. Os linfócitos T CD4⁺ imunoglobulinas (IgG estão presentes no leito da úlcera em concentração máxima do 5º ao 7º dia após a lesão sob influência da IL-2 e vários outros fatores imunomoduladores (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Figura 1 – Diversidade funcional dos macrófagos na resolução do processo cicatricial e inflamatório. Após migrarem para os tecidos, os monócitos transformam-se em macrófagos proporcionando praticamente a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares pela geração de inflamação, *burst* respiratório e fagocitose (produção de ROS – O_2^- , H_2O_2 , NO); apresentação de antígenos para ativação da resposta imune; eliminação de imunocomplexos e regulação da resposta inflamatória; estímulo à cicatrização pela produção de citocinas e fatores de crescimento favorecendo a produção do tecido de granulação e também reabsorção óssea pelos osteoblastos

Fonte: CHAWLA (2010)

Dentre as várias citocinas que atuam no processo inflamatório da cicatrização, destaca-se também a oncostatina M (OSM). É uma citocina pleiotrópica, produzida por linfócitos, monócitos e polimorfonucleares e tem apresentando propriedades sobre a resposta inflamatória (WALLACE et al., 1999) tais como na regulação do crescimento, diferenciação, expressão gênica e sobrevida de vários tipos celulares e também contribuindo para o processo de inflamação e remodelagem teciduais (TANAKA, MIYAJIMA, 2003,). Essa citocina é estruturalmente e funcionalmente relacionada a IL-6, que também influencia a resposta imune. As atividades biológicas da OSM são mediadas através da ligação com a subunidade β de seu receptor específico (OSMR- β) o qual pertence aos receptores de transdução de sinal para IL-6 (HEINRICH et al., 2003). O OSMR- β é largamente expresso por vários tipos celulares e tecidos incluindo célula epitelial, fibroblastos e tecidos da pele

(MOSLEY et al., 1996). A OSM exerce potente função na pele como citocina estimulando resposta mitogênica nos fibroblastos, células endoteliais (IHN, TAMAKI, 2000; VASSE, et al., 1999) e extravasamento de polimorfonucleares após aplicação na pele (MODUR et al., 1997). Inúmeras atividades têm sido atribuídas à OSM *in vitro*, incluindo a diferenciação de megacariócitos, inibição do crescimento de células tumorais, indução de peptídeos neurotróficos e efeito na medula óssea.

1.2.2.1 Estresse celular e mecanismos de defesas antioxidantes

A pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Estas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, sendo que há um equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando assim ao chamado estresse oxidativo (RASILAINEN et al., 2002) (Figura 2).

Neste contexto, fica claro que a pele, por sua importância, é um órgão cujas células possuem mecanismos enzimáticos de resposta rápida, bem como moléculas antioxidantes de baixo peso molecular para contrabalançar o efeito deletério causado por um estresse oxidativo (RASILAINEN et al., 2002), como apresentado na Figura 2.

Figura 2 – (A) O estresse oxidativo existe quando há um excesso de radicais livres sobre as defesas antioxidantes. Como consequência, os radicais atacam e oxidam outros componentes celulares principalmente os lipídeos (particularmente os poli insaturados), proteínas e ácidos nucleicos. Isso leva a uma lesão tecidual e, em alguns casos, o influxo de células inflamatórias para o local da lesão (KELLY, 2003) **(B)** Fontes de espécies reativas na pele e mecanismos de defesa.

Fonte: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICCOLO, 2007

Dentre as ROS formadas na pele, podemos destacar os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), os radicais peroxila e alcoxila ($\text{RO}_2^\bullet$ e $\text{RO}^\bullet$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (BEAK et al., 2004; KING BA; OH DH, 2004; WEI et al., 1998) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH). Além das ROS, também estão envolvidas em processos redox outras espécies intermediárias, as RNS, tais como $^\bullet\text{NO}$ e espécies reativas de enxofre, com importância biológica significativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

O equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies citadas pode sofrer ação de agentes exógenos ou endógenos, induzindo um estado de estresse oxidativo. Este, por sua vez, pode ser restabelecido pelos sistemas antioxidantes presentes no tecido cutâneo.

O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997). A CAT e a GPx são as principais responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 . A GPx, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada (GSSG) (ROVER-JR; KUBOTA; HÖEHR, 2001).

Os antioxidantes não enzimáticos, ou de baixo peso molecular também contribuem com a manutenção do balanço redox celular. Nesta classe inclui-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com as ROS/RNS (BIALY et al., 2002).

Dentre as substâncias endógenas podemos destacar alguns hormônios, como estradiol e estrógeno que apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina E, devido, provavelmente, à sua porção fenólica, comum a ambas as moléculas (KVAM; DAHLE, 2003) e à melatonina, reguladora do relógio biológico nos mamíferos, que também apresenta atividade antioxidante, além de induzir a síntese de antioxidantes enzimáticos *in vivo*, como a glutathione peroxidase (REITER, 1997; SLOMINSKI et al., 2002). Destacam-se também o ácido lipóico, um cofator essencial em vários complexos enzimáticos que apresenta atividade antioxidante e que pode atuar como regenerador de formas oxidadas de glutathione, ascorbato e α -tocoferol (PODDA et al., 2001); bem como a melanina, um pigmento formado pela oxidação e polimerização da tirosina, com papel protetor contra a radiação UV, que também

possui papel antioxidante, protegendo a pele principalmente contra $O_2^{\bullet-}$ e RO_2 (SERGEEV; UKHINA; SHIMANOVSKIĬ, 1999).

Além de todo o sistema antioxidante endógeno exemplificado, a pele conta ainda com um eficiente mecanismo de reparo, caso os danos já tenham ocorrido, envolvendo enzimas e substâncias de baixo peso molecular (ICHIHASHI et al., 2003). Por exemplo: lesões oxidativas em DNA podem ser identificadas por enzimas específicas, removidas e reparadas (KROKAN et al., 1997), ou ainda, substâncias que sofreram ataque de radicais podem ser restauradas pela doação de hidrogênio de outras moléculas (ICHIHASHI et al., 2003).

A aplicação tópica ou oral de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, buscam-se novas substâncias com ação antioxidante, bem como substâncias que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes. Alguns antioxidantes fundamentais são normalmente adquiridos pela dieta, como por exemplo, as vitaminas C e E, os carotenóides e substâncias fenólicas derivadas de plantas. A vitamina E, ou α -tocoferol, além de estabilizar as bicamadas lipídicas no estrato córneo, é um dos mais importantes inibidores da peroxidação lipídica em animais, por capturar $RO_2^{\bullet}$ (BURTON et al., 1998).

Também para restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, bem como para prevenção ou tratamento de patologias causadas por estresse oxidativo, são utilizadas muitas classes de substâncias antioxidantes provenientes de produtos naturais. Muitos extratos são veiculados em formulações para uso tópico, tendo sua eficácia comprovada. Além disso, inúmeras são as formas orais de suplementação, como a ingestão de chás, cápsulas, decotos, entre outros. Diversos estudos descritos na literatura abordam o uso de antioxidantes oriundos de produtos naturais. A eficácia de antioxidantes desta origem é extensamente investigada (ALEXIS et al., 1999; CORDOVA et al., 2002; GOMES et al., 2001; KATYAR et al., 1999; ROPKE et al., 2003).

Uma planta muito utilizada, por exemplo, é o *Ginkgo biloba*, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e antioxidantes, e vem sendo clinicamente testada em desordens cutâneas (KIM et al., 1997; KIM et al., 2001;).

1.2.2.1.1 Marcadores do estresse celular e dos mecanismos de defesas antioxidantes

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo. É o principal indicador da peroxidação lipídica determinado por titulação contra o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é indicador de dano celular. O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm e fluorescência em 553 nm. Associado com esse indicador, a mieloperoxidase é envolvida não somente na geração de ROS, mas também na ativação da atividade inflamatória (VASCONCELOS et al., 2007).

O método de *Ferrous Oxidation-Xylenol Orange* (FOX) foi originalmente desenvolvido para determinar o nível hidropéroxido lipídico em sistemas biológicos. O íon ferroso (Fe^{2+}) é oxidado pelo hidropéroxido (oxidante) para formar o íon férrico (Fe^{3+}). Este é, em seguida, tratado com o reagente *xylenol-orange* (XO) formando o complexo $\text{Fe}^{3+} - \text{XO}$ (cor azul violeta) que é detectado por espectrofotômetro a 550 nm. Esse método é utilizado para determinar a formação ou presença de hidropéroxido na amostra biológica, atividade da lipoxigenase bem como o estudo da peroxidação lipídica. É menos reativo ou não reage a endopéroxidos (JIANG et al., 1992; MOON; SHIBAMOTO, 2009)

A oxidação de lipídeos, processo conhecido como peroxidação lipídica, pode iniciar-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna das mitocôndrias. A peroxidação lipídica traz consequências homeostáticas graves para

as membranas atacadas, principalmente na perda de sua integridade devido a alteração na sua permeabilidade a íons e pequenas moléculas e perda nas suas características de fluidez (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989). Esta agressão acaba por interferir em mecanismos celulares importantes, incluindo sistemas enzimáticos, expressão gênica, entre outros. (CREMONESE et al., 2001),

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativa do oxigênio, porém as membranas biológicas (retículo endoplasmático, membranas mitocondriais ou plasmáticas) são as mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, podendo acarretar alterações na organização estrutural, funcional, enzimática e na permeabilidade das membranas celulares (CECHINI, 1990; MELLO FILHO; HOFFMAN; MENEHINI, 1983).

O uso da técnica de quimiluminescência permite a quantificação do estresse oxidativo na pele. Em circunstâncias normais, os processos fisiológicos levam à formação de radicais, resultando em emissão de fótons (na ordem de 20 a 40 contagens por segundo), contudo essas quantidades são muito baixas para serem detectadas pelos métodos atualmente empregadas. No estresse oxidativo, os níveis de radicais são geralmente aumentados, permitindo assim sua detecção através da emissão de fótons produzidos (GUARATINI et al., 2007).

Os sistemas de defesa antioxidante nas células incluem compostos como a glutathione (GSH): tiol mais abundante envolvido no sistema de defesa antioxidante ativado diretamente para remoção de ROS (FEOLI et al., 2006). Há também enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S transferase (GST). A GSH e essas enzimas servem como biomarcadores para a defesa antioxidante devido às suas habilidades de eliminar e atenuar os efeitos das ROS.

Enfim, a fase inflamatória da cicatrização tem como objetivo o recrutamento de células inflamatórias e produção de radicais livres que atuam no o desbridamento tecidual e produção de fatores de crescimento essenciais para a fase de proliferação tecidual.

1.2.3 Fase de proliferação tecidual

A fase proliferativa da cicatrização envolve angiogênese, formação de matriz provisória e reepitelização (STOJADINOVIC et al., 2008). Citocinas e fatores de crescimento liberados por células inflamatórias atraem fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais e queratinócitos para a úlcera iniciando a fase proliferativa da cicatrização (SCHMIDT et al., 2009). Esta fase é caracterizada pelo aumento da proliferação celular, brotamento capilar e síntese de matriz extracelular, com a deposição de colágeno, fibronectina e outros componentes proteicos para preencher o tecido danificado, restabelecendo a integridade da epiderme e derme (ABREU; MARQUES, 2005; BEANES et al., 2003; STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Devido à alta atividade metabólica no local da úlcera, existe uma demanda aumentada para oxigênio e nutrientes. Fatores locais no microambiente da úlcera, tais como, baixo pH, tensão de oxigênio reduzida e níveis aumentados de lactato, não apenas refletem perfusão tecidual inadequada secundária ao rompimento de capilares sanguíneos, como iniciam a liberação de fatores necessários para trazer um novo suprimento sanguíneo (BAUM; ARPEY, 2005; MONACO; LAWRENCE, 2003). Este processo é denominado angiogênese e é estimulado principalmente por VEGF, além de outros fatores de crescimento como bFGF e TGF- β .

Células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais produzem estes fatores, que estimulam a migração e proliferação das células endoteliais dos vasos sanguíneos (ABREU; MARQUES, 2005; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b). Macrófagos (via IL-1 β e TNF- α) e fibroblastos (via fator de crescimento de queratinócitos (KGF-2) e TGF- β mediam angiogênese por meio de VEGF, que é regulado por óxido nítrico e é um importante promotor da proliferação endotelial e angiogênese (GURTNER et al., 2008; STOJADINOVIC et al., 2008). Conforme novos

vasos entram na área da úlcera a tensão de oxigênio retorna ao nível normal (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Diante disto, destaca-se a enzima eNOS (NO sintase endotelial), localizada na célula endotelial dos vasos sanguíneos. Camundongos *knock-out* para eNOS demonstraram demora na cicatrização. O fluido extraído dessas úlceras induziu resposta angiogênica menor em modelos de angiogênese na córnea do que nos controles, ressaltando a importância de eNOS para a neoangiogênese durante a cicatrização (LEE et al., 1999).

O tecido de granulação, que recebe esta denominação devido ao aspecto granular gerado pelos capilares neoformados no local da lesão, composto por células inflamatórias (principalmente macrófagos), células endoteliais, neovasculatura, fibroblastos e miofibroblastos, em uma matriz frouxamente agregada, que precede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro (BAUM; ARPEY, 2005; BEANES et al., 2003; CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007). A migração de capilares no leito da úlcera é crítica para a cicatrização apropriada (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

A formação do tecido de granulação e a deposição tecidual requerem nutrientes fornecidos pelos capilares sanguíneos. A falência deste processo resulta em uma úlcera cronicamente não cicatrizada (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b). Novos capilares fornecem as necessidades metabólicas para a migração e proliferação dos fibroblastos (fibroplasia), assim como para a produção de proteínas da MEC.

Os fibroblastos são células-chave na produção da MEC. Migram para o local da úlcera a partir do tecido circunjacente, tornam-se ativados, ligam-se a filamentos da matriz provisória de fibrina e começam a sintetizar colágeno e proliferar. PDGF e EGF, liberados principalmente por plaquetas e macrófagos, são os principais sinais para a ativação dos fibroblastos.

Em resposta ao PDGF, os fibroblastos começam a sintetizar a matriz provisória composta de glicosaminoglicanas e colágeno tipo III, contribuindo para a

aquisição da resistência tensora ou da cicatriz (BEANES et al., 2003; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; DIEGELMANN; EVANS, 2004; MONACO; LAWRENCE, 2003; SCHMIDT et al., 2009). Os fibroblastos são a única fonte de colágeno e fibronectina, principais proteínas que constituem o tecido conjuntivo na derme (CORSETTI et al., 2009).

O colágeno é a proteína mais abundante no reino animal, representa 30% do total de proteínas do corpo humano e 50% do conteúdo protéico da cicatriz. Em tecidos normais, o colágeno proporciona força, integridade e estrutura. Quando os tecidos são rompidos após uma lesão, o colágeno é necessário para reparar o defeito e restaurar sua estrutura anatômica e função.

Se excesso de colágeno for depositado no local da lesão, a estrutura anatômica normal da pele será perdida e ocorrerá fibrose. Por outro lado, se uma quantidade insuficiente de colágeno for depositada, a úlcera e consequentemente a cicatriz, serão frágeis e a úlcera pode tornar-se deisciente. A síntese adequada de colágeno é fundamental para a cicatrização de úlceras cutâneas (CORSETTI et al., 2009; DIEGELMANN; EVANS, 2004; MONACO; LAWRENCE, 2003).

Gradualmente, parte dos fibroblastos, estimulados principalmente por TGF- β 1, alteram seu fenótipo migratório para pró-fibrótico diferenciando-se em miofibroblastos. Estas células são caracterizadas por possuírem um sistema actina e miosina e gerar força contrátil, similar àquela encontrada em células de músculo liso. Desta forma, conduzirão à contração do leito aproximando as margens da úlcera, ou seja, reduzindo a área exposta da úlcera para que ocorra a formação da cicatriz. O leito aberto da úlcera finalmente fecha por contração e migração de células epiteliais a partir da borda da lesão. Contração reduzida pode levar ao retardamento da cicatrização, enquanto um excesso e/ou contração prolongada pode resultar em perda de função e cicatriz hipertrófica. Após o fechamento da úlcera, os miofibroblastos desaparecem por apoptose (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; FRADE, 2003; GURTNER et al., 2008; SCHMIDT et al., 2009; STOJADINOVIC et al., 2008).

Se a membrana basal permanece intacta, as células epiteliais migram para a superfície em um padrão normal e as camadas normais da epiderme são restauradas. Se a membrana basal foi destruída, as células epiteliais localizadas na borda da úlcera começam a proliferar e enviam projeções para restabelecer a função barreira protetora contra perda de fluidos e invasão bacteriana adicional. EGF, TGF- β , TGF- α , produzidos principalmente por plaquetas ativadas e macrófagos, estimulam a proliferação epitelial. Citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- α estimulam fibroblastos a sintetizar e secretar KGF-1, KGF-2 e IL-6, os quais estimulam a migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; MONACO; LAWRENCE, 2003; STOJADINOVIC et al., 2008). Este processo é bastante estimulado por IGF – fator de crescimento semelhante à insulina, que estimula a proliferação de fibroblastos e células endoteliais além de estimular a reepitelização.

A migração dos queratinócitos juntamente com a contração da úlcera, resulta em reepitelização e fechamento (HARDING; PATEL, 2002). O resultado final da fase proliferativa é vitalmente importante para a cicatrização, porque estabelece o suporte necessário para manter e reconstruir o tecido danificado (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

1.2.4 Fase de remodelagem tecidual

Uma vez que houve o fechamento da úlcera, inicia-se o remodelamento da cicatriz pelos próximos meses ou anos, com a redução progressiva da vascularização e do conteúdo celular no tecido cicatricial, aumento da força tensora e reorientação das fibras colágenas (ABREU; MARQUES, 2005; HARDING; PATEL, 2002). A matriz provisória, composta por colágeno tipo III, proteoglicanos e fibronectina é reposta por uma matriz mais espessa, resistente e organizada, composta por colágeno tipo I

(DOUGHTY; SPARKSD-eFRIESE, 2012; GURTNER et al., 2008). TGF- β é o mediador predominante na maturação e remodelamento da úlcera, regulando a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), e no remodelamento do colágeno (STOJADINOVIC et al., 2008).

Clinicamente, a fase de remodelamento e maturação seja talvez a mais importante (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b). A fase de remodelamento tecidual tem início durante a homeostase entre síntese e degradação de colágeno e tem por objetivo restaurar a estrutura tecidual (ABREU; MARQUES, 2005; CORSETTI et al., 2009).

As fibras de colágeno gradualmente se espessam e tornam-se orientadas paralelamente no leito da úlcera e se alinham às linhas de tensão da pele, resultando na aparência de tecido cicatricial estriado, oposto ao padrão de cesta entrelaçada observado no tecido dérmico normal. O novo tecido também caracteriza-se pela ausência de elastina, o que proporciona certa dureza à cicatriz quando comparada ao tecido normal (DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). Estas alterações também são acompanhadas por força tensora aumentada, indicativa de uma correlação positiva entre espessura e orientação das fibras colágenas e força tensora. O colágeno presente na cicatriz (mesmo após um ano de maturação) nunca será organizado como o colágeno encontrado na pele intacta. A força tensora da pele do local ulcerado também nunca retorna a 100%.

Várias são as doenças que interferem negativamente no processo de cicatrização, como o diabetes, e também a desnutrição, anemia, esclerose sistêmica, doenças crônicas, entre outras. Muitas também são as condições que tornam este processo de difícil resolução, impedindo ou retardando uma completa restauração (KUMAR et al., 2005).

1.3 Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado por uma síndrome crônica e evolução degenerativa causada por alteração na secreção de insulina e/ou resistência periférica à insulina com inadequada resposta secretora das células β ("deficiência relativa de insulina"). Dessa forma, é produzida uma série de alterações metabólicas caracterizada clinicamente pela hiperglicemia (MARBLE et al., 1985).

1.3.1 Tipos de diabetes

O diabetes é classificado como tipo 1 e tipo 2:

O diabetes tipo 1 é presente em 5% à 10% dos casos, e é resultado da destruição de células β -pancreáticas com consequente deficiência de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição de células β é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática de diabetes tipo 1. A taxa de destruição de células beta é variável, sendo em geral mais rápida em crianças. Os pacientes podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina, dependem de insulina exógena e geralmente apresentam-se magros (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

O diabetes tipo 2 é a forma presente em 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos são presentes quanto a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes apresenta sobrepeso ou obesidade, cetoacidose raramente se desenvolve de modo espontâneo. O DM2 pode acontecer em qualquer idade mas geralmente é diagnosticada após os 40 anos. Os pacientes não dependem

de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

1.3.2 Epidemiologia do diabetes

Uma epidemia de diabetes está em curso. Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevivência de pacientes com DM (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

Quanto às internações hospitalares, o DM e as complicações cardiovasculares causadas por essa doença responderam por 7,9% das internações em 13 ambulatórios públicos investigados em oito cidades brasileiras (GOMES et al., 2006). Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) mostram que o diabetes *mellitus* é a quinta indicação de hospitalização no Brasil e está entre as dez maiores causas de mortalidade no país (BRASIL, 2010).

Estudo que investigou a magnitude das hospitalizações por DM na rede pública de saúde brasileira, de 1999 a 2001, estimou 327.800 internações em pessoas com diagnóstico principal de DM. A região sudeste apresentou maior número de óbitos hospitalares/1.000.000 habitantes, a partir dos 20 anos de idade e letalidade

hospitalar de 13,3%, em indivíduos com 75 anos e mais, para o sexo masculino, respectivamente. O custo médio por internação foi equivalente a 150,59 dólares, sendo maior para o sexo masculino (ROSA et al., 2007).

1.3.3 Sinalização da insulina

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese protéica e inibe sua degradação (CARVALHEIRA et al., 2002).

A ligação da insulina ao seu receptor inicia uma cascata complexa de sinalização de fosforilação e desfosforilação protéica, culminando nos efeitos metabólicos e mitogênicos. O receptor de insulina pertence à família dos receptores de membrana que possuem capacidade tirosina-quinase intrínseca. Ele é composto de duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrana, ligadas por pontes dissulfeto (SALTIEL; KAHN, 2001).

A insulina se liga à subunidade α do receptor, provocando uma mudança conformacional na subunidade β , que leva a sua auto-fosforilação em tirosina e ativa sua capacidade tirosina-quinase. Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles os substratos do receptor de insulina (IRS-1-4), SHC (*Src homology collagen*) e JAK-2 (VELLOSO et al., 1998; SALTIEL; KAHN, 2001). Essas proteínas, uma vez fosforiladas, recrutam e ativam

diversos efetores intracelulares, com diversas funções celulares diferentes (SALTIEL; KAHN, 2001). A via da ERK está principalmente envolvida no controle do crescimento e da mitogênese, enquanto a ativação da PI-3 quinase pelo IRS-1 está preferencialmente ligada às ações metabólicas da insulina (SALTIEL; KAHN, 2001; ARAUJO et al., 2005), como a ativação do transportador GLUT4 (glicose4) (Figura 3).

Figura 3 – Via de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, SHC e Cbl. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário

Fonte: Saltiel e Kahn (2001)

1.3.4 Fisiopatologia e complicações do diabetes

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma síndrome auto-imune envolvendo produção de auto-anticorpos contra as células β -pancreáticas das Ilhotas de Langerhans, causando a deficiência absoluta de insulina (EISENBARTH, 1986). Tem um curso

crônico envolvendo alterações degenerativas que afetam o sistema nervoso, cardiovascular, olhos e também a pele. O significado do fator patológico do diabetes é causado pela macroangiopatia e microangiopatia, embora em certos tecidos a patogênese esteja relacionada ao mau funcionamento metabólico (KUMAR et al., 2005).

As ulcerações em indivíduos com diabetes são uma das principais causas de admissões em hospitais nos países desenvolvidos e é a principal comorbidade associada ao diabetes, muitas vezes causando dor, sofrimento e menor qualidade de vida. São estimados ocorrerem ulcerações em 15% dos indivíduos com diabetes e em 84% das amputações relacionadas à membros inferiores são de indivíduos com diabetes (BREM; TOMIC-CANIC, 2007).

Vários são os fatores fisiológicos que contribuem para deficiência na cicatrização de lesões em diabéticos. Estes incluem diminuição ou baixo estímulo da produção de fatores de crescimento (GALKOWSKA et al., 2006), da angiogênese (FALANGA, 2005; GALIANO et al., 2004), da função macrofágica (MARUYAMA et al., 2007), da colagênese, da epitelização e formação do tecido de granulação (FALANGA, 2005), da migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos (GIBRAN et al., 2002), da cicatrização óssea e balanço entre síntese e degradação dos componentes da MEC na fase de remodelagem realizado pelas metaloproteinases (LOBMANN et al., 2002).

Nas ulcerações em indivíduos diabéticos os queratinócitos apresentam ausência de migração, hiperproliferação e diferenciação incompleta. Fibroblastos apresentam mudança no fenótipo e diminuição na migração e proliferação.

O estado de hiperglicemia do diabetes promove metabolismo da glicose e gera ROS nos tecidos pela ativação de múltiplas vias, tais como respiração oxidativa mitocondrial, auto-oxidação da glicose, formação de produtos glicosados (AGE) e ativação da proteína quinase C (PKC). O estresse celular está envolvido com danos nas membranas das organelas dentro das células, levando a uma diminuição da ativação celular e diminuição do metabolismo da célula. Assim, o estresse celular

acaba afetando vários órgãos no indivíduo com diabetes. As principais complicações incluem doenças do coração, cardiomiopatia, retinopatia, nefropatia do sistema nervoso periférico, além de agravar substancialmente ulcerações cutâneas quando também associadas às micro e macroangiopatias (LIM et al., 2009).

O efeito patogênico da hiperglicemia, possivelmente em conjunto com a liberação de ácidos graxos livres, é mediado pelo aumento da produção de ROS. Além de sua capacidade de causar danos diretamente em macromoléculas, ROS indiretamente leva a danos nos tecidos pela ativação de um número de células sensíveis às vias do estresse celular. O estresse oxidativo pode diminuir a sensibilidade à insulina e danificar as células β pancreáticas, produtoras de insulina. (CHEN et al. 2005; LEPORE et al., 2004).

Além disso, o estresse oxidativo também modifica as vias de sinalização podendo levar à resistência à insulina. Um estudo mostra que a hiperglicemia apresentou diminuição significativa na captação de glicose em ratos diabéticos, aumento significativo no conteúdo da proteína muscular carbonil (usado como um indicador de estresse oxidativo) além de elevados níveis de malondialdeído e 4-hidroxinonenal como indicador da peroxidação lipídica (HABER et al., 2003). Estes marcadores biológicos do estresse oxidativo bem como a resistência à insulina foram normalizados durante a aplicação do antioxidante N-acetil-cisteína ou taurina sugerindo que o estresse oxidativo contribui para a patogênese da hiperglicemia induzida por resistência insulínica (HABER et al., 2003; MAIESE et al., 2007).

Como resultado, é possível que a ativação de vias de estresse oxidativo desempenham um papel fundamental no desenvolvimento não só das complicações tardias em DM1 e DM2, mas também resistência à insulina.

Diante disso, a complexidade do processo cicatricial está relacionada à patogênese das úlceras, bem como sua extensão, características físicas e funcionais das estruturas envolvidas e à resposta do indivíduo a agressão local (LINARES, 1996).

As úlceras constituem um dos principais problemas das pessoas com diabetes além de ser um problema de saúde pública. São de difícil cicatrização

devido a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos (FALANGA, 2005), principalmente quando na fase crônica, agravando ainda mais a doença e diminuindo a qualidade de vida dessas pessoas (GARY-SIBBALD, WOO, 2008).

Diante dos grandes avanços na compreensão dos fenômenos envolvidos no processo cicatricial, a incidência de úlceras cutâneas de difícil cicatrização ainda se mantém alta, repercutindo em custos elevados e consequências sociais aos pacientes, tornando relevante o estudo científico para melhor compreensão dos fatores envolvidos e novas possibilidades terapêuticas, sobretudo nas úlceras cutâneas acarretadas pelo diabetes.

1.4 Tratamento de úlceras

O tratamento tópico de úlceras consiste em restaurar o ambiente fisiológico no leito da úlcera, visando umidade adequada, controle de temperatura, regulação de pH e controle da carga bacteriana. Estas condições uma vez ajustadas irão colaborar para o reparo e restauração da função tecidual. Nenhum tratamento tópico será eficaz se a condição patológica do paciente não for corrigida (ROLSTAD; BRYANT; NIX, 2012).

A terapêutica implica não apenas no conhecimento dos produtos (medicamentos, curativos) utilizados para promover a cicatrização, mas primeiramente no entendimento da fisiopatologia do processo cicatricial, pois a cada estágio do processo de reparo, a úlcera requer condições diferentes para progredir em direção à próxima etapa. Nem todos os tratamentos e curativos são indicados ou apropriados para serem usados continuamente até o fechamento da úlcera. A maioria das úlceras requer numerosas modificações conforme suas características se alteram ao longo do seguimento/tratamento. O tratamento deve

ser reavaliado e readequado baseado nas características da úlcera e na resposta do paciente (ABREU; MARQUES, 2005; ROLSTAD; BRYANT; NIX, 2012).

Produtos destinados ao tratamento de úlceras cutâneas devem apresentar certas propriedades como: facilidade de aplicação e remoção, conforto ao paciente, manutenção de umidade adequada no leito da úlcera (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A busca de agentes específicos como fatores de crescimento que possam acelerar a cicatrização tem sido intensamente investigada. Existe grande interesse em acelerar esse processo, com o intuito de evitar as complicações muito comuns com infecções e amputações, principalmente em indivíduos com diabetes e/ou imunodeprimidos.

Dentre eles, Saad (2007 - dados não publicados – apresentação oral), relatou a utilização de uma pomada de insulina aplicada em úlceras na região dorsal de ratos Wistar induzidos ao diabetes por streptozotocina, a qual estimulou o rápido fechamento das lesões, por aumentar a expressão dos receptores e sinalizadores intracelulares para a insulina (AKT, IRS-1, IRS-2, SHC, ERK).

Dentre as alternativas para o tratamento e/ou otimização do processo cicatricial, muitas plantas medicinais têm demonstrado possuir potencial terapêutico e entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, estão as plantas do gênero *Copaifera spp* (MASSON et al., 2010).

1.5 Estudos do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização

Outro agente cicatrizante é a biomembrana de látex natural (BLN) da seringueira *Hevea brasiliensis* desenvolvida no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP desde 1994, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto. Suas propriedades físicas,

microarquitetura e biocompatibilidade foram determinadas inicialmente em modelos animais (MRUÉ et al., 2004). Encontra-se hoje, em fase de utilização em humanos e as investigações bioquímicas sobre a estrutura do látex natural e seus componentes ativos constituem-se em objetos de estudo dos pesquisadores envolvidos com o biomaterial.

Mendonça, 2004 (MENDONÇA, 2004; MENDONÇA, et al., 2010) realizaram cromatografia de DEAE-celulose do látex e obtiveram 3 frações. A fração 1 (F1) foi incorporada em gel de carboximetilcelulose 4% (Bayer – São Paulo, SP) em 3 concentrações diferentes: 0,01%, 0,1% e 1% e aplicou-as sobre as úlceras dérmicas em orelhas de coelhos. A concentração 0,01% foi a mais eficiente por estimular o fechamento da lesão em menor tempo.

Maurício 2006 (MAURÍCIO, 2006; MENDONÇA et al., 2010), após purificação do soro do látex por cromatografia em DEAE-celulose realizou o teste de Miles para avaliação do aumento da permeabilidade vascular. Injetaram-se as frações subcutaneamente no dorso de coelhos. Das 3 frações obtidas pela cromatografia, apenas a F1 apresentou maior atividade no estímulo à cicatrização relacionada às demais. Para estudo da atividade angiogênica, as respectivas frações foram colocadas na membrana cório-alantóica de ovos de galinha *Gallus domesticus*, sendo a F1 a que demonstrou ser mais eficaz em promover esta atividade. Já no estudo de citotoxicidade, as concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL da F1 não mostraram citotoxicidade em culturas de células leucêmicas da linhagem Jurkat e nem em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Portanto, essas células proliferaram normalmente na presença da F1. A fim de analisar se a F1 estimularia células endoteliais, foi feita cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVEC), como descrito por Jaffe, et al., 1973. A F1 também não estimulou diretamente as células endoteliais do cordão umbilical humano, comprovando que a ação angiogênica da BLN não se dá diretamente sob o estímulo proliferativo das células endoteliais, indicando assim um efeito indireto, ou seja, provavelmente sua ação angiogênica se dá pela

liberação de fatores de crescimento por monócitos/macrófagos estimulados, ou ainda algum mecanismo não elucidado até o momento.

Na tentativa de buscar informações sobre o mecanismo de ação da BLN na cicatrização, (ANDRADE, 2007; ANDRADE et al., 2011) realizou a implantação subcutânea da BLN no dorso de camundongos C57BL/6 sadios (sem doença associada), analisando quantitativamente e qualitativamente o tecido neoformado, acompanhado nos momentos pós-cirúrgicos representativos das fases inflamatória e de formação tecidual (angiogênese e fibrogênese), comparando-a com a membrana de látex desnaturado (luva cirúrgica), implante sintético (ePTFE) e, também, após somente o trauma cirúrgico no tecido subcutâneo de camundongos (sham). Utilizando-se de diferentes metodologias como análise de imagens pelo *software* ImageJ de secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia; e tricrômio de Gomori quanto à colagênese; imunoistoquímica para iNOS, IL-1 β , TGF- β 1, VEGF; além das dosagens de IL-1 β e TGF- β 1 por ELISA e de mieloperoxidase (determinante da função neutrofílica), ambas feitas a partir do macerado tecidual da região de implante.

Andrade et al. (2011) constatou que a BLN atua significativamente na fase inflamatória da cicatrização, importante no recrutamento neutrofílico para o local, confirmado quantitativamente pela concentração de mieloperoxidase e IL-1 β . Este fato pareceu influenciar diretamente as fases subsequentes do processo cicatricial, confirmado pela sua capacidade estimuladora de angiogênese, provavelmente não influenciada por VEGF, e pelo estímulo à fibroplasia independente de TGF- β 1 e sem modificação na produção colagênica.

Frade, 2003, (FRADE, 2003; FRADE et al., 2011; FRADE et al., 2012) propôs a BLN como alternativa eficiente, cômoda e econômica para o tratamento de úlceras de perna. Foram observados sinais evidentes de estímulo à granulação sob o aspecto clínico e com confirmação histopatológica, associada à redução dos sintomas, especialmente da dor em úlceras de perna crônicas. Foi observado

também que a BLN induziu a diferenciação do tecido de cicatrização, com aumento da detecção e fatores de crescimento como VEGF e TGF- β 1 e redução da enzima iNOS. Sua avaliação como curativo em úlceras de pressão, hipertensivas, venosas e associadas à microangiopatia diabética demonstrou, ainda, a capacidade de manter as lesões úmidas e curativo não aderente, sendo eficaz no desbridamento e na angiogênese (FRADE et al., 2005).

Frade et al. (2004) utilizaram a BLN como curativo de úlceras em indivíduos com diabetes crônico associadas a comorbidades e complicações. Concluíram que a BLN atuou nas diferentes fases da cicatrização, removendo tecido necrótico (desbridamento), estimulando a proliferação e granulação tecidual (angiogênese) e também a total reepitelização, diferente dos achados de Frade (2003) e Frade et al. (2005) em pacientes não diabéticos, onde não foi constatada clinicamente a reepitelização da úlcera. Com isso tornou-se importante o estudo do mecanismo de ação do látex na cicatrização de úlceras em animais induzidos ao diabetes, buscando identificar diferenças entre os fatores envolvidos no fenômeno de reepitelização nos animais diabéticos comparados aos não diabéticos.

Dessa forma, os achados do látex como indutor da cicatrização por meio do estímulo à fase inflamatória (FRADE, 2003; ANDRADE et al., 2011), a eficácia do látex na cicatrização de úlceras em indivíduos com diabetes (FRADE et al., 2004) aliado às alterações causadas pelo estresse oxidativo em úlceras cutâneas associadas ao diabetes, torna-se relevante o estudo das modificações teciduais e dos mecanismos envolvidos na cicatrização de úlceras tratadas topicamente com a fração F1 do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* em ratos induzidos ao diabetes.

Objetivos

"Pergunte sempre a cada ideia: a quem serves?"
_ Bertolt Brecht

"Todas as coisas são difíceis antes de se tornarem fáceis."
_ John Norley

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar as modificações teciduais e os mecanismos envolvidos na pele do rato diabético e na cicatrização de úlceras cutâneas tratadas topicamente com o látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (proteína F1) em ratos induzidos ao diabetes.

2.2 Objetivos específicos

✚ Avaliar a citotoxicidade da proteína F1 em culturas de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos;

✚ Avaliar as modificações teciduais por técnicas imunoistopatológicas e bioquímicas na pele (sem tratamento) dos ratos diabéticos e não diabéticos;

✚ Avaliar as modificações teciduais das úlceras/cicatrizes por técnicas imunoistopatológicas, bioquímicas e avaliar a reepitelização das úlceras nos ratos diabéticos e não diabéticos tratados topicamente com a proteína F1 e comparados com o sham.

Material e Métodos

"Passo a passo. Não consigo pensar em nenhum outro modo de se realizar algo."
_ Michael Jordan

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da citotoxicidade da F1 em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos

Este experimento foi realizado juntamente com a Dra. Diane Meyre Rassi e a técnica Maria Aparecida Nunes Ferreira no Laboratório de Cultura de Células da Dermatologia (Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP) da Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss em cooperação com a técnica Ana Cristina Morseli Polizello do Laboratório de Bioquímica (Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, FCFRP-USP) do Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro.

3.1.1 Fonte de queratinócitos

Os procedimentos envolvendo o uso de fragmentos de pele humana para cultura foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob o número de processo HCRP 5606/2008 (ANEXO A).

3.1.2 Coleta de material

As peles para cultura de queratinócitos foram obtidas dos pacientes com úlceras cutâneas através de biopsias de pele normal de área não lesionada

(preferencialmente na região inguinal). Os fragmentos de pele, de aproximadamente 2,0 por 1,0 cm, foram acondicionados em soro fisiológico 0,9% a 4°C, não ultrapassando 12 horas até sua manipulação.

3.1.3 Processamento da pele e cultivo

Os fragmentos de pele foram colocados em placas de Petri com tripsina 0,25% + EDTA e mantidos em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO₂, por 4 horas, separando-se, então, a derme da epiderme. A tripsina foi neutralizada com soro bovino fetal. O sobrenadante (contendo as células dérmicas e epidérmicas) foi recuperado e centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. Após a contagem, as células foram distribuídas em frascos de cultura, com $1,0 \times 10^5$ células por cm² e, então, incubadas a 37°C, com tensão de 5% de CO₂, em meios de crescimento específicos para queratinócitos, suplementado com 10% de soro bovino fetal.

Os frascos foram colocados em incubadora a 37°C, com 5% de tensão de CO₂. Os meios de cultura foram trocados 3 vezes por semana. Quando as culturas celulares atingiram 80% de confluência foi realizada a passagem utilizando tripsina com EDTA. Em média, foram necessários 14 dias para se obter quantidades suficientes de células (maior que $2,0 \times 10^6$). Em cerca de 21 dias obteve-se uma quantidade de queratinócitos ao redor de $5,0 \times 10^6$.

3.1.4 Cultura celular

Sob condições estéreis, fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos (cultura primária de biópsias de pele humana de pacientes do HCFMRP-USP) foram

descongeladas em banho-maria à 37°C e transferidos para um tubo cônico de 15 mL. Adicionou-se 10 mL de meio de cultura DMEM e centrifugou-se a 1.000 rpm durante 5 minutos para retirada do DMSO do meio de congelamento. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e 25 µg de anfotericina B) (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA). Em seguida as células foram plaqueadas em garrafas de cultura utilizando o mesmo meio. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO₂.

Após atingir 80% de confluência, a monocamada foi ressuspensa em solução de tripsina a 0,25% (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA), incubada a 37°C durante 5 minutos, seguida pela paralização da reação pela adição de DMEM completo. O volume da garrafa de cultura foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1.000 rpm durante 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com o meio de cultura DMEM e plaqueou-se novamente, representando a segunda passagem.

Os mesmos procedimentos de cultura e tripsinização foram repetidos até a quinta passagem. Após a tripsinização, as células foram contadas em Câmara de Neubauer para utilização nos testes de viabilidade celular.

3.1.5 Avaliação da viabilidade celular

O método MTT é baseado na redução do MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (que é amarelo e solúvel em água) em cristais de formazan (que é roxo e insolúvel em água) feita pelo NADH nas mitocôndrias das células viáveis. Sendo assim, a produção de cristais de formazan pode ser diretamente correlacionada com a viabilidade celular. Com isso, num total de 100%

de células, parte corresponde à células viáveis (indicando a % de viabilidade) e a outra parte corresponde à células não viáveis (indicando a % de citotoxicidade). (MOSMANN, 1983).

Os fibroblastos NIH-3T3 e os queratinócitos humanos foram plaqueados em microplacas de 96 poços, independentes, de fundo plano, na densidade de $2,0 \times 10^5$ células (volume de 200 μL) por poço, em triplicata.

As placas com fibroblastos e as com queratinócitos foram incubadas durante 24 horas a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO_2 para a obtenção de crescimento confluyente. Após este período, observou-se aderência das células. Então, todo o volume do meio de cultura foi aspirado e adicionou-se 200 μL das soluções teste contendo a proteína F1 do látex de forma que as concentrações finais fossem: 50,0; 25,0; 10,0; 5,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, meio de cultura DMEM 10% completo (controle positivo) e meio de cultura DMEM 10% acrescido de DMSO 50% (1/1) (v/v) (controle negativo da viabilidade), separadamente, em triplicata. As placas com fibroblastos e as com queratinócitos foram incubadas por 24 horas, à 37°C em estufa com 5% de tensão de CO_2 .

Após este período, o conteúdo dos poços foi removido e os mesmos foram lavados com tampão PBS. Solução estoque de MTT (5,0 mg/mL em PBS) foi adicionada (20 μL) ao meio de cultura DMEM (sem vermelho de fenol) (180 μL) e as placas foram incubadas sob as mesmas condições anteriores durante 3 horas.

Em seguida, uma solução de HCl 0,04M em isopropanol foi adicionada em cada poço da microplaca para a solubilização dos sais de formazan e então procedeu-se a leitura da absorbância a 560 nm (DENIZOT; LANG, 1986).

Os resultados de absorbância foram plotados no gráfico. A partir destes resultados, foi calculada a percentagem de citotoxicidade: quociente entre a absorbância das soluções contendo as células onde se adicionou F1 em diferentes concentrações e absorbância do controle negativo (DMEM + DMSO) multiplicado por 100, para que o resultado fosse dado em percentagem, e subtraído de 100. Sem subtrair o valor final por 100, tem-se a percentagem de viabilidade.

$$\% \text{ Citotoxicidade} = 100 - \left[\frac{\text{absorbância do teste (F1)}}{\text{absorbância do controle negativo (DMEM+DMSO)}} \right] \times 100$$

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições de isolamento em gaiolas individualizadas, com água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas e temperatura de 22°C no Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP, conforme estabelecido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, CETEA-FMRP-USP (processo nº 087/2008) (Anexo B).

3.3 Indução do diabetes

Para indução do diabetes foram utilizados ratos com peso corporal entre 170g e 180g. Após jejum de 12 horas (peso corporal médio de 150g a 160g) foram administrados nos ratos 200 µL de streptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) na dose de 45 mg/Kg de peso do animal, dissolvida em tampão citrato gelado 0,1M pH 4,5, em uma única injeção intravenosa caudal (Figura 4) (LO et al., 2006).

Foram estabelecidos como critério de inclusão neste estudo todos os animais com glicemia de jejum (por 12 horas) acima de 300 mg/dL, a qual foi aferida 15 dias após a injeção de STZ e também no dia da eutanásia. A glicemia foi

aferida em uma amostra de sangue da veia caudal com a utilização do glicosímetro Optium™ Xceed™ (MediSense® - Victoria, AU, EUA) (KUNTZ et al., 2004) (Figura 4).

Figura 4 – (A) Após o jejum de 12 horas, os ratos induzidos ao diabetes foram colocados numa caixa de madeira com uma luz incandescente (luz amarela - quente) para que houvesse vasodilatação na cauda pelo calor da luz, facilitando a injeção. **(B)** Os animais foram contidos **(C)** e foi feita a injeção intravenosa de 200 μ L de STZ 45 mg/Kg do animal. Após 15 dias de injeção e também no dia da eutanásia foram aferidas as glicemias de jejum por 12 horas. Para aferição da glicemia foi feita a contenção do animal e coletada uma amostra de sangue da cauda a qual foi analisada pelo glicosímetro.

3.4 Animais não diabéticos

Para o estudo com os animais não diabéticos foram realizados os mesmos procedimentos que foram realizados com os animais diabéticos, até mesmo semelhante faixa de peso dos animais de 170g a 180g, porém nada foi injetado na cauda destes animais.

3.5 Procedimento cirúrgico: confecção de úlceras cutâneas dorsais

Os ratos diabéticos e não diabéticos foram pesados, anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral 4,0% (Vetec – Duque de Caxias, RJ, Brasil) em salina estéril (JPFarma – Ribeirão Preto, SP, Brasil), na dose de 1,0 mL/100g de peso do animal. Após a tricotomia do dorso foram feitas 2 excisões cirúrgicas, uma em

cada lado, com *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro, atingindo a região dermo-epidérmica (Figura 6). Após a cirurgia, foi aplicada por via intraperitoneal dose única de DIPIRONA (Medley S/A – Campinas, SP, Brasil) 50 mg/Kg de peso do animal diluída em salina.

3.6 Extração do látex natural e obtenção de F1 a partir do soro total

O látex foi extraído através de incisões em formato de meia espiral na casca de troncos dos clones RRhim 600 e GT-1 da seringueira *Hevea brasiliensis*. Essas incisões expõem o conteúdo citoplasmático dos vasos laticíferos na região do floema secundário, o látex natural, que recebeu de 0,5% a 2,0% de hidróxido de amônio ao ser coletado nos recipientes fixados às árvores (Figura 5), a fim de que sua coagulação espontânea seja evitada.

Figura 5 – Seringal adulto em fase de extração do látex. Fotografia mostrando a organização da plantação e os procedimentos de sangria em meia espiral e coleta do látex natural. (GARCIA, 2009).

Ao látex amoniacal (látex acrescido de hidróxido de amônio) foi acrescentada solução de ácido acético a 2,2% (1:2, v/v) sob agitação branda. O material permaneceu em repouso, à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos, tempo suficiente para que a coagulação ocorresse e a retração do coágulo iniciasse. O soro, de aspecto amarelado e translúcido, foi decantado e sua obtenção concluída através da compressão da borracha por um bastão de vidro. Ele foi então diluído em água destilada (1:1, v/v) e teve o pH elevado para 9,0 com NaOH concentrado. Nesta etapa, algumas proteínas são precipitadas, tornando necessária a filtração da solução em papel de filtro qualitativo. A cada 500 mL de látex amoniacal, 2,0 L de soro diluído são gerados e prontamente cromatografados.

O soro foi submetido a uma primeira etapa de purificação em coluna de troca aniônica DEAE-celulose (5 x 40 cm) e eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 9,0, em gradiente descontínuo e crescente de cloreto de sódio (0M; 0,15M; 0,25M e 1,5M), com fluxo de 6 mL/min. Foram coletados 30 mL/tubo do eluato e este foi monitorado a 280 nm em espectrofotômetro. As frações obtidas foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

Em uma segunda etapa de purificação da proteína do látex, o primeiro pico, fração 1 (F1) obtido a partir da cromatografia em coluna DEAE-celulose foi submetido à purificação em coluna de filtração Sephadex G-50 (2,5 x 60 cm). O material foi eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, com fluxo de 1 mL/min e coletado no volume de 5 mL/tubo. O eluato foi monitorado a 280 nm em espectrofotômetro. (PITZ 2011. TEIXEIRA 2011)

3.7 Produção do gel de carboximetil-celulose incorporado com a fração F1 do látex da seringueira *H. brasiliensis*

A proteína F1 do látex na concentração de 0,01% foi incorporada em carboximetil-celulose (CMC) (EMFAL Especialidades Químicas – Betim, MG, Brasil) à 4,0% dissolvida em água, a qual foi aplicada nas lesões dos animais. Este procedimento foi elaborado pela técnica Vera Lúcia Epifânio no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP) do Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto.

Para homogeneização do gel de carboximetil-celulose em água com a proteína F1 foi utilizado um homogeneizador para tecidos celulares tipo POTTER (MA-099) (Marconi Equipamentos para Laboratório – Piracicaba, SP, Brasil) com ponteira de PTFE serrilhada em baixo relevo.

3.8 Padronização dos grupos

Cada grupo foi composto de 80 animais com duas lesões cada (n=160 úlceras), distintos conforme o tratamento aplicado nas úlceras:

Grupo F1: 80 animais cujas 2 lesões de cada animal foram tratadas com gel de carboximetil-celulose 4,0% ($\pm$ 2 mL em cada úlcera) incorporada com da proteína F1 do látex à 0,01%;

Grupo sham: 80 animais cujas 2 lesões de cada animal foram tratadas somente com carboximetil-celulose 4,0% ($\pm$ 2 mL em cada úlcera).

Esses dois grupos foram constituídos por animais induzidos ao diabetes (n=160) e não diabéticos (n=160). Os respectivos tratamentos foram aplicados nas

úlceras diariamente. Após a aplicação foi feito curativo oclusivo com gaze e esparadrapo (Figura 6).

Figura 6 – (A) *Punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro utilizado para confeccionar as 2 úlceras no dorso dos ratos. Posicionamento do rato no suporte para fotografia padronizada das úlceras. A régua milimetrada do suporte ao lado do rato serviu como medida conhecida para análise da reepitelização. **(B)** Curativo oclusivo com gaze e esparadrapo feito após a aplicação tópica e diária do tratamento.

3.9 Eutanásia e dias de seguimento das avaliações

Os animais foram sacrificados por meio de excessiva dose anestésica (hidrato de cloral 4,0%) e em seguida deslocamento cervical nos dias 2, 7, 14 e 21 após o procedimento cirúrgico (n=10 animais/tempo/tratamento). As úlceras foram fotografadas para análise da reepitelização.

3.10 Seguimento clínico-experimental: captura de imagens

Para avaliação da reepitelização foram utilizados 10 animais (n=20 úlceras) em cada tempo de seguimento e tratamento (diabéticos e não diabéticos). Após a eutanásia, ambas as úlceras de cada animal foram fotografadas pela câmera digital Sony DSC-P100, no modo básico, sem flash, sem zoom e na resolução de 3,0 MB.

Para padronização da distância da câmera à úlcera, a câmera foi fixada num suporte de alumínio distando 30 cm e perpendicular à úlcera. Uma régua, disposta ao lado do animal e junto às úlceras foi utilizada para padronização da unidade de área das lesões em mm^2 e também para servir como medida conhecida na calibração do *software* ImageJ ao calcular a área da úlcera (Figuras 6 e 7).

Figura 7 – Suporte utilizado para padronização da fotografia das úlceras e também para aferição das mesmas utilizando o cálculo da área das lesões (em mm^2).

3.11 Análise de imagens: avaliação do índice de cicatrização das úlceras pelo ImageJ

As imagens das úlceras foram transferidas para um computador e analisadas pelo *software* ImageJ 1.45, disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health - NIH* (Bethesda, Maryland, EUA).

Inicialmente, em *<Set Measurements>* do *menu <Analyze>* o ImageJ foi programado para calcular áreas de imagens habilitando a caixa "Area" (Figura 8A). A imagem foi aberta pressionando em *<Open>* no *menu <File>* (Figura 8B) e em seguida, foi feito a calibração do ImageJ baseando-se em distância conhecida. Utilizando a ferramenta "Straight" do ImageJ, foi traçado na régua (na direção da úlcera) o limite correspondente à 20,0 mm (Figura 8C). Em *<Set Scale>* do *menu <Analyze>* apareceu na caixa "Distance in pixels" o valor em pixels correspondente ao traço feito previamente sobre a régua. Foi digitado então na caixa "Know

distance" o número "20" e digitado "mm" na caixa "*Unit of length*". A caixa "*Global*" deveria ficar sempre habilitada. Abaixo apareceu o valor da relação entre a distância conhecida e desconhecida em pixels/mm. O *software* foi individualmente calibrado em cada imagem analisada (Figura 8D). Utilizando a ferramenta "*Polygon selections*" foi traçado o contorno da úlcera desconsiderando as áreas já reepitelizadas (Figura 8E). Por fim, pressionando em <*Measure*> (Ctrl+M, teclas de atalho como essa foram utilizadas para otimizar as diversas análises) do menu <*Analyze*> obteve-se o valor da área traçada em mm² tendo como base a calibração realizada em <*Set Scale*> (Figura 8F).

Figura 8 – Cálculo da área das úlceras pelo software ImageJ. (A) Habilitação do software para realizar cálculos de área. (B) A imagem foi aberta e (C e D) realizada a calibração do software de acordo com a medida conhecida. (E) Foi traçado ao redor da área ulcerada e por fim (F) o software apresentou o valor da área em mm².

Após calculadas as áreas de cada úlcera pelo *software* ImageJ foi feito no Microsoft Excel 2010 o cálculo do índice de cicatrização das úlceras (ICU) pela seguinte fórmula:

$$ICU = \frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área inicial}}$$

Valores de ICU maiores que zero representam diminuição da área ulcerada (reepitelização), valores menores que zero representam aumento da área ulcerada e valores iguais a zero representam reepitelização completa (CAETANO et al., 2009; MINATEL et al., 2009). A área inicial corresponde ao dia do procedimento cirúrgico e a área final corresponde ao dia da eutanásia, ou seja, 2, 7, 14 ou 21 dias.

3.12 Coleta do material para estudo

Os animais tiveram toda a pele dorsal avulsionada e através do *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro foi coletada uma biópsia cilíndrica de cada uma das duas úlceras/cicatrices, as quais foram utilizadas para as seguintes finalidades:

Estudos histopatológicos e imunoistoquímicos: Foi utilizada uma das úlceras de cada 10 animais (n=10 amostras) de cada tempo e tratamento (diabéticos e não diabéticos) para serem acondicionadas em solução de formaldeído 3,7% tamponada para estudos histopatológicos (coloração com hematoxilina e eosina, e tricrômio de Gomori). As melhores secções de cada grupo e tempo (diabéticos e não diabéticos) foram escolhidas para fazer marcação por imunoistoquímica.

✚ **Estudos bioquímicos:** A outra úlcera de cada um desses 10 animais de cada tempo e tratamento, diabéticos e não diabéticos foi seccionada e cada fragmento foi destinado à realização dos diferentes estudos bioquímicos (citometria de fluxo e estudos do estresse celular). Os fragmentos foram pesados, acondicionadas em *eppendorf's* distintos com tampão específico e permaneceram no freezer à -80°C até as respectivas dosagens.

3.13 Estudo histopatológico (histomorfometria)

As biópsias (n=5 – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram mantidas acondicionadas por 24 horas em solução de formaldeído 3,7% tamponada, seguidas do processamento histológico e incluídas em parafina. As secções foram de 5 µm, submetidas simultaneamente e com o mesmo tempo à respectiva coloração de hematoxilina e eosina – para avaliação e quantificação do infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos – e, para avaliação e quantificação da colagênese, coloração com tricrômio de Gomori.

3.13.1 Avaliação quantitativa por imagem do infiltrado inflamatório e fibroblastos e vasos sanguíneos

As secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina foram visibilizadas no microscópio óptico LEICA® DM-4000B com câmera LEICA® DFC-280 ligado ao computador com o *software* LAS® - *Leica Application Suite (version 3.3.0)* para captura das imagens (Figura 9).

Antes do processo de quantificação todas as imagens foram capturadas padronizando-se a objetiva, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador (GONÇALVES et al., 2003).

Figura 9 – Janela do software LAS – *Leica Applications Suite* (version 3.3.0) utilizado para captura das imagens de histologia e imunoistoquímica. No aumento de 100x o tamanho da imagem na janela do LAS é de 1057 x 845 μm , e no aumento de 400x é de 264 x 211 μm . Todas as imagens capturadas no LAS apresentaram resolução de 1280 x 1024 pixels.

Para quantificação de infiltrado inflamatório e fibroblastos foram capturadas 8 imagens (4 da derme superior e 4 da derme inferior) de 5 secções diferentes de cada grupo e tempo de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos) no sentido epiderme-derme-subcutâneo e no aumento de 400x (resolução de 1280 x 1024 pixels) (Figura 10). Essas imagens foram capturadas somente na região da úlcera, em duas partes distintas (sendo 4 imagens para cada parte, portanto $n=8$ imagens). O resultado final foi representado pela média do número de células (infiltrado inflamatório ou fibroblastos) contadas na região da úlcera dos diferentes grupos e tempos de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos).

Figura 10 – Fotomontagem (aumento de 50x) da histologia da úlcera de um animal diabético tratado com F1 por 2 dias. Identificação da área ulcerada nas imagens histológicas e esquema da metodologia específica utilizada para captura de imagens para quantificação de infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos. Para quantificação de infiltrado inflamatório e fibroblastos foram utilizadas 4 imagens (aumento de 400x) sendo 2 da derme superior (imagens 1a e 1b; 2a e 2b) e 2 da derme inferior (imagens 1c e 1d; 2c e 2d), em 2 áreas distintas da região da úlcera (área 1 e 2), totalizando 8 imagens (n=8 imagens) de cada 5 amostras diferentes de cada grupo e tempo de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos). Para quantificação dos vasos sanguíneos foram capturadas imagens em sequência (para fotomontagem no Photoshop CS5), no sentido epiderme-derme-subcutâneo, no aumento de 100x, também em 2 área distintas da região da úlcera, totalizando 2 imagens (n=2 imagens) de cada 5 amostras diferentes de cada grupo e tempo de seguimento (animais diabéticos e não diabéticos).

Foi necessária uma adaptação na metodologia de quantificação dos vasos sanguíneos por serem bastante espalhados e não tão numerosos em cada campo como o infiltrado inflamatório e os fibroblastos. Sendo assim, foram fotografadas imagens em sequência no sentido epiderme-derme-subcutâneo, no aumento de 100x (resolução de 1280 x 1024 pixels) em 5 secções diferentes de cada grupo e

tempo de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos) e em 2 partes distintas da região da úlcera (n=2 imagens). Em seguida, essas imagens em sequência foram montadas pelo *Photomerge* (menu <Arquivo>, <Automatizar>, <Photomerge>) do Adobe Photoshop CS5 (Figura 11), e a quantificação dos vasos foi feita em uma imagem montada que correspondia a toda extensão do espécime no sentido epiderme-derme-subcutâneo (Figura 10). O resultado final foi representado pela média do número de vasos sanguíneos contados na região da úlcera dos diferentes grupos e tempos de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos).

Figura 11 – Janela do Adobe Photoshop CS5 mostrando o Photomerge, o qual foi utilizado para montagem de imagens de secções coradas com HE, no aumento de 100x, fotografadas no microscópio em sequência e no sentido epiderme-derme-subcutâneo para quantificação somente de vasos sanguíneos. Pressionando em <Photomerge> abriu-se a janela "Photomerge" onde foram adicionadas as imagens a serem montadas. Para se fotografar em sequência, cada imagem foi fotografada repetindo um pequeno trecho da anterior, e assim o Photoshop pode identificar os trechos semelhantes e montar todas as imagens numa só.

Foi utilizado o *Plugin "Cell Counter"* do *software* ImageJ 1.45 (*menu* <Plugins>, <Analyse>, <Cell counter>) para contagem simultânea do infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos. A imagem foi aberta pressionando em <Open> no *menu* <File> do ImageJ. Na janela "*Cell counter*" foi determinado como "*Type 1*" a contagem de infiltrado inflamatório (todas as células inflamatórias incluindo polimorfonucleares e mononucleares), "*Type 2*" contagem de fibroblastos (incluindo também fibrócitos e miofibroblastos) e "*Type 3*" a contagem de vasos sanguíneos (veias e artérias indiferente do calibre). A diferenciação de cada célula foi feita pelo observador na imagem da lâmina e cada imagem foi quantificada individualmente. Pressionando em "*Initialize*" foi aberta a janela "*Counter window*" pela qual foi permitida a contagem simultânea a cada clique sobre cada tipo celular. Ao final da quantificação, foi clicado em "*Results*" da janela "*Cell counter*" e foi informado na janela "*Results*" a quantidade de células contadas para cada "*Type*".

As contagens de infiltrado inflamatório e fibroblastos foram feitas simultaneamente nas imagens (aumento de 400x). Nas imagens com aumento de 100x montadas pelo Photoshop foram contados apenas os vasos sanguíneos. O *software* realizou a contagem a cada clique do observador sobre cada célula visibilizada, sendo apresentada ao final da análise a contagem total e simultânea dos tipos celulares (Figura 12).

Figura 12 – (A) Imagens da derme superior e inferior para quantificação de infiltrado inflamatório e fibroblastos (aumento de 400x). **(B)** Imagem montada – sentido epiderme-derme – (aumento de 100x) para quantificação de vasos sanguíneos. **(C)** Plugin “Cell Counter” do software ImageJ para quantificação de infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos nas imagens coradas com HE.

3.13.2 Avaliação quantitativa por imagem da colagênese

Para estudo da colagênese foram capturadas imagens das secções coradas com tricrômio de Gomori (coloração azul para colágeno) da mesma forma que foi estabelecida na captura das imagens para quantificação do infiltrado inflamatório e fibroblastos. No entanto, foram capturadas 4 imagens (n=4 imagens) sendo 2 da

derme superior e 2 da derme inferior da região da úlcera, no aumento de 100x e em 5 secções diferentes de cada tratamento e tempo de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos).

Foi utilizado o *Plugin "Colour Deconvolution"* do *software ImageJ*, para quantificação da percentagem da cor azul na área total da imagem (resolução de 1280 x 1024 pixels). Este *Plugin* reconhece as cores da imagem e as decompõe em 3 cores: azul (colágeno), roxo (núcleos) e laranja. Em seguida, através do *Plugin "Threshold Colour"* foi quantificada a percentagem de azul na área total da imagem (Figura 13).

Figura 13 – Metodologia de quantificação da colagenese através da imagem das secções coradas com tricrômio de Gomori usando o *Plugin "Colour Deconvolution"* do software ImageJ. Após a decomposição da imagem em 3 cores distintas, somente foi calculada a área de azul, desconsiderando as outras 2 imagens decompostas.

Inicialmente, o ImageJ foi habilitado para realizar quantificações em percentagem de área, e para isso deixou-se habilitada somente a caixa "Area fraction" em <Set Measurements> do menu <Analyze> (Figura 13A). Após a imagem ser aberta pressionando em <Open> do menu <File> foi aberto o <Colour Deconvolution> pelo menu <Plugin> (Figura 13B). Na janela "Colour Deconvolution" são apresentados diversos "Vectors" específicos para decompor imagens de acordo com a coloração. Para decomposição das imagens coradas com tricrômio de Gomori foi utilizado o "Alcian blue & H" (Figura 13C). Pressionando em "OK" a imagem aberta se decompôs em 3 janelas: uma correspondente à cor azul, outra à cor roxa e outra à laranja (Figura 13D). As janelas com as cores roxa e laranja foram fechadas e foi medido a percentagem de área da cor azul somente na janela com cor azul. Isso foi feito pressionando no menu <Image>, <Adjust> e <Threshold> (Ctrl+Shift+T) (Figura 13E). Com isso, o ImageJ transformou em vermelho tudo o que seria quantificado. Por fim, foi clicado no menu <Analyze> e em <Measure> (Ctrl+M) e na janela "Results" foi informado a percentual da cor azul na área total da imagem em questão (Figura 13F).

O resultado final foi representado pela média do percentual de coloração azul na área total da imagem em diferentes grupos e tempos de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos).

3.14 Estudo imunoistoquímico

Este experimento foi realizado juntamente com os técnicos em histologia Kléber Augusto Loureiro, Gilberto André e Silva e Edna Aparecida dos Santos Moraes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

As biópsias (n=1 – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram acondicionadas em solução de formaldeído 3,7% tamponada. As

secções foram de 3 µm em lâminas silanizadas (*3-aminopropyltriethoxy silane*) (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) e em seguida foi realizado o processamento de desparafinização e hidratação das secções.

Para o bloqueio de peroxidase endógena as secções permaneceram submersas em uma cuba com uma solução de 250 mL de metanol com 250 µL de H₂O₂ 0,3% por 20 minutos. Após enxaguar com água milli-Q foi realizada a recuperação antigênica pelo calor com tampão citrato 0,1M pH 6,0 na panela de pressão à 20 minutos. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS e BSA 1% (v/v) (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos em câmara úmida.

Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C nas seguintes concentrações: 1:400 para anti-iNOS, OSM, OSMR-β, eNOS, IGF; 1:500 para anti-VEGF e IRS e 1:800 para TGFβ1, AKT, SRC e ERK (Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, EUA). Após lavagens com PBS as secções foram incubadas com o reagente 1 do kit *NovoLink™ Polymer Detection System* (Novocastra Laboratories – Newcastle Upon Tyne, UK) por 30 minutos em câmara úmida e nos escuro. Após 3 lavagens com PBS, as secções foram incubadas com o reagente 2 do kit por 30 minutos nas mesmas condições. Após as lavagens, as secções foram incubadas com solução de 10 mL de PBS com os 2 comprimidos de DAB – 3,3'-*Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA). Após as lavagens, as secções foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos, desidratado e montado com Entellan (Merck KGaA – Darmstadt, Alemanha).

Para quantificação das imunomarcações foram capturadas imagens das secções de imunoistoquímica da mesma forma que foi estabelecida na captura das imagens para quantificação da colagênese. No entanto, foram capturadas 5 imagens (n=5 imagens) sendo 3 da derme superior e 2 da derme inferior da região da úlcera, no aumento de 100x e em 1 amostra diferente de cada tratamento e

tempo de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos) de cada imunomarcação.

Foi utilizado o *Plugin "Colour Deconvolution"* do *software* ImageJ, para quantificação da cor ocre (imunomarcação) na área total da imagem (aumento de 100x). O procedimento foi o mesmo utilizado para quantificação da colagênese nas secções coradas com tricrômio de Gomori. No entanto, em "*Vectors*" foi selecionado o "*H DAB*" (Figura 14A), o qual permite a separação da imagem em 3 cores: ocre (imunomarcação), azul escuro (hematoxilina – coloração de fundo) e verde (fundo da lâmina), sendo somente a janela com a cor ocre utilizada para quantificação (Figura 14B e 14C). A janela "*Threshold*" apresenta através do histograma os tons da cor ocre de toda a amostra. A quantificação do estudo imunoistoquímico foi da percentagem de área marcada com os tons de ocre somente no intervalo de 0-180 do histograma. O ajuste das barras do histograma impede que o *software* detecte muita marcação em secções pouco marcadas ou que detecte menos marcação em secções muito marcadas.

O resultado final foi representado pela média do percentual de coloração ocre na área total da imagem em diferentes grupos e tempos de seguimento (em animais diabéticos e não diabéticos).

Figura 14 – Metodologia de quantificação da imunoistoquímica usando o *Plugin "Colour Deconvolution"* do software ImageJ.

3.15 Citometria de fluxo

Este experimento foi realizado juntamente com a doutoranda MSc. Carolina Calíari Oliveira do Laboratório de Imunogenética (HLA) no Hemocentro-Ribeirão Preto-SP do Prof. Dr. Júlio César Voltarelli.

Foram analisadas as seguintes células: CD3⁺CD4⁺ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos e NK) e CD11b (macrófagos).

As biópsias (n=3 – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram descongeladas e depois dilaceradas em placa de Petri mantidas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI incompleto onde foram tratadas com solução de collagenase tipo 1 (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA) por 1 hora. Após esse período foi realizada a inativação da collagenase através da adição do mesmo volume de meio RPMI contendo 10% soro bovino fetal. Essa solução foi passada por uma peneira de nylon para a retirada dos fragmentos de pele e centrifugada por 10 minutos à 400g. O *pellet* contendo células foi ressuspensão em PBS. Em seguida foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com 2,0 µL de anticorpos monoclonais diretamente conjugados ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) (eBioscience - San Diego, CA, EUA). Foram feitas marcações duplas para a análise das subpopulações linfocitárias. Todas as incubações foram realizadas no escuro para evitar perda de fluorescência. As células foram centrifugadas por 5 minutos à 500g, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 200 µL de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSsort (BD Bioscience - San Diego, CA, EUA).

Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetro de tamanho (FSC) por parâmetros de granularidade (SSC). Foram adquiridos 10.000 eventos/amostra. As análises foram realizadas utilizando-se o *software* Cellquest (BD Bioscience - San Diego, CA, EUA). Os eventos da *gate* de linfócitos (R1) foram analisados para marcação com os diferentes anticorpos por *dot plots* de fluorescência 1 (FL1, FITC), por fluorescência 2 (FL2, PE).

3.16 Estudo do estresse celular e defesas antioxidantes

A quantificação do NO, lipoperóxidos de membranas e defesas antioxidantes totais (TRAP) por quimiluminescência foram realizadas e padronizadas em macerado de pele de rato em colaboração e supervisão com o Prof. Dr. Rubens Cecchini, a doutoranda MSc. Vânia Aparecida Terra Malachias e a Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani no Laboratório de Radicais Livres em Patologia, Departamento de Ciências Patológicas (Centro de Ciências Biomédicas), da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

As dosagens de MDA, FOX, GSH e proteínas totais foram realizadas em colaboração e supervisão com o Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior no Laboratório de Nutrição, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrição e Metabolismo – FMRP-USP, juntamente com a técnica MSc. Paula Payão Ovidio.

A dosagem de MPO foi realizada juntamente com a doutoranda MSc. Sílvia Cellone Trevelin do Laboratório de Dor e Inflamação, Departamento de Farmacologia – FMRP-USP, do Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha.

3.16.1 Quantificação de NO: reação de quimiluminescência induzida por H₂O₂-luminol

A produção de NO foi quantificada na pele de ratos Wistar através de uma técnica baseada na reação de quimiluminescência entre o NO, H₂O₂ e luminol conforme descrito por Kikuchi et al. com poucas modificações.

A pele do dorso (5,0 mg/ml) previamente congelada foi homogeneizada em tampão de Na₂CO₃ 2,0 mM, pH 8,5, por 45 segundos utilizando o homogeneizador ULTRA-TURRAX (MARCONI – Piracicaba, SP, Brasil) e

degaseificando com nitrogênio líquido. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos.

Para garantir a ausência de oxigênio no homogenato de pele (evitando a reação do oxigênio da atmosfera com o NO da amostra formar peroxinitrito, que impediria a qualificação do NO) a homogeneização foi realizada borbulhando-se nitrogênio líquido. Além disso, todos os reagentes preparados foram previamente degaseificados também com nitrogênio líquido.

Foram diluídos iguais volumes de luminol 360 μ M / desferrioxamino 3 mM (DFO) e H_2O_2 200 mM e incubados por 5 minutos, 25°C, sob agitação moderada. Para iniciar a reação de quimiluminescência, 50 μ L desta solução foi automaticamente adicionada à mistura de sobrenadante de homogenato de pele (0,3 % (m/v)) e tampão para um volume final de 800 μ L. A reação de quimiluminescência foi monitorada a temperatura de 25°C, por 5 minutos usando o GLOMAX TD/20 20 luminometer (TURNER DESIGNS - Sunnyvale, CA, EUA).

O *software* OriginPro 8 foi usado para plotar as curvas de quimiluminescência que foram analisadas usando a área sob a curva para determinar a quantidade de NO presente na amostra. Cada amostra de tecido foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos em NO/URL/mg tecido (URL - unidade relativa de luz).

3.16.2 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

As biópsias (n=4 – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram acondicionadas em *eppendorf's* de 2,0 mL com 200 μ L de tampão NaCl 0,1 M, NaPO_4 0,02M, NaEDTA 0,015M pH 4,7 (tampão 1) gelado e permaneceram no freezer -80°C até a dosagem. Os fragmentos foram homogeneizados pelo Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA, EUA) a

13.000 rpm. Após centrifugação foi ressuspendido em tampão NaPO_4 (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (tampão 2). Em seguida, 5,0 μL do sobrenadante das amostras foram colocadas em placa de 96 poços para o ensaio. Foi feita uma curva padrão de neutrófilos obtidos na cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina. Em cada poço da placa foram adicionados 25 μL de TMB – “3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine” (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) e em seguida 100 μL de H_2O_2 . A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M e lida em leitor de placas à 450 nm (MORENO et al., 2006). Os resultados foram expressos em número de neutrófilos $\times 10^3/\text{mg}$ tecido.

3.16.3 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*-“*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*”)

A peroxidação lipídica do homogenato da pele foi quantificada pela *TBARS* e determinadas por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados cujo principal representante é o malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre o aquecimento por 30 minutos a 100°C em banho-maria (FANEM - Guarulhos, SP, Brasil). Esta reação produz um composto de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro (UV-Vis Modelo Q98U Quimis - Diadema, SP, Brasil) no comprimento de onda 535 nm (BUEGE, AUST, 1978).

Para quantificar o MDA ligado a macromoléculas, as amostras de homogenato ($n=3$ – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por (CIGHETTI et al., 1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 100 mg de pele foram homogeneizados com 1,0 mL de KCl 1,15% com o auxílio do homogeneizador Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA EUA). Em seguida

adicionou-se 3 mL de água pura (Milli-Q, Milipore – Bedford, MA, EUA) e 0,5 mL de NaOH 2M. Após agitação em vortex (PHOENIX - Araraquara, SP, Brasil), os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos em banho-maria e, então neutralizados com HCl 2M para seguirem a reação com o ácido tiobarbitúrico. Os resultados são expressos por nmol MDA/g tecido.

3.16.4 Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)

Os hidroperóxidos foram determinados pelo método da oxidação dos íons férricos na presença de xilenol laranja, em que 1 mL de solução de 100 mM de xilenol laranja, 4 mM BHT (hidroxitolueno butilado), 25 mM de ácido sulfúrico e 250 mM de sulfato ferroso em metanol: água (9:1 v/v) foi adicionada a uma alíquota de 100 µL do homogenato da biópsia (n=3 – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos). Após, agitar e encubar por 30 minutos em temperatura ambiente, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida a 560 nm e comparada com a curva padrão de peróxido de hidrogênio em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂/g tecido.

3.16.5 Análise da formação de lipoperóxidos de membranas por quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil hidroperóxido

As peles foram homogeneizadas no homogeneizador ULTRA-TURRAX por 4 vezes durante 45 segundos, com intervalos de 15 segundos. A concentração do

homogenado de 50 mg/mL foi utilizada para os testes de lipoperóxidos de membranas e capacidade antioxidante total (TRAP) em tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,4 e tampão glicina pH 8,6 respectivamente. O homogenato foi submetido à centrifugação a 11.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado nas análises. As amostras foram mantidas no gelo durante os experimentos.

Para avaliar a lesão lipoperoxidativa na membrana, foi utilizado o método de QL induzida por tert-butil hidroperóxido, descrito por Gonzalez-Flecha, Llesuy e Boveris (1991). A mistura contendo 49,0 % (m/v) de sobrenadante do homogenato de pele e 3 mM tert-butil hidroperóxido para volume final de 1 ml foi colocada imediatamente para leitura de emissão de quimiluminescência no luminômetro GLOMAX TD/20 20 durante 40 minutos.

O *software* OriginPro 8 foi utilizado para construção das curvas de quimiluminescência, que foram analisadas quanto área sobre a curva. Cada amostra de tecido foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos em URL/mg tecido (URL – unidades relativas de luz).

3.16.6 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por quimiluminescência

A TRAP foi avaliada conforme descrito por Repetto et al. (1996) e utilizada por Peres et al. (2011). Esta técnica avalia os níveis de antioxidantes totais de um tecido, principalmente antioxidantes de baixa massa molecular. Neste método, o ABAP (2,2-azo-bis(2-amidinopropano diidroclorido), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em luminômetro GLOMAX TD/20 20. A reação é inibida por análogos da vitamina E ou outros antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis existentes na amostra de pele.

A mistura contendo 1,5% (p/v) de sobrenadante do homogenato de pele (50 mg/mL), 200 mM de luminol e 200 mM de ABAP para um volume final de 1 ml, diminuiu a quimiluminescência a níveis basais (tempo de indução, T_i) proporcionalmente a concentração de antioxidantes existentes na amostra de pele até os radicais do ABAP serem gerados novamente.

O sistema foi calibrado com um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox). Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e homogenato permitiu obter valores de TRAP com uma concentração relativa à concentração do Trolox (Figura 15).

Figura 15 – Gráfico representativo do TRAP, mostrando a emissão de fótons pelo número de leituras. A interseção das retas representa a fase de indução da reação.

Para obtenção do resultado a seguinte equação foi usada:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times T_{\text{amostra}} / T_{\text{Trolox}}$$

onde:

D - é uma fator de diluição;

$T_{amostra}$ - é o tempo de indução da amostra;

T_{Trolox} - é o tempo de indução provocado pela adição 1 μM de Trolox.

Os resultados foram expressos em μM trolox/mg tecido.

3.16.7 Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

A quantificação da GSH foi realizada por método colorimétrico que consistiu na reação do grupo sulfidril com 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzólico) (DTNB) e leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 412 nm ($n=3$ – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos). A concentração foi calculada utilizando-se a curva padrão de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Os resultados foram expressos em μmol GSH/g tecido.

3.16.8 Determinação das proteínas totais

As dosagens de proteínas totais no homogenato de tecido ($n=3$ – por tempo e tratamento, em animais diabéticos e não diabéticos) foram realizadas por meio de kit comercial utilizando o método de Biureto (Labtest Diagnóstica - Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em g proteínas totais/g tecido.

3.17 Análise dos resultados

Para análise de todas as variáveis foi utilizado o teste *t* de *Student* (comparação 2 a 2) para comparação **entre os grupos diabéticos (DM F1 x DM sham)** e **não diabéticos (N F1 x N sham)**, além da comparação entre os **grupos tratados com F1 (DM F1 x N F1)** e os **não tratados com F1 (DM sham x N sham)** em todos os dias de seguimento.

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 para confecção dos gráficos e realização dos testes estatísticos. Para os cálculos de TRAP e lipoperóxidos de membranas foi utilizado também o OriginPro 8.

Os valores de $p < 0,05$ mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão, sob intervalo de confiança de 95%.

Resultados

*“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...”*
_ Luís Fernando Veríssimo

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada não
existirão resultados”*
_ Mahatma Gandhi

4 Resultados

4.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular dos fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos foram aferidas pelo método colorimétrico MTT, que é baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio em cristais de formazan. A coloração púrpura foi aferida por espectrofotometria e a absorbância do grupo controle foi relacionada a 100% de células viáveis.

A viabilidade de fibroblastos em cultura por 24 horas foi estatisticamente menor em relação ao controle positivo (DMEM 10%) nas concentrações de 25,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0040$), 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0209$) e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0454$). Além disso, a concentração de F1 a 0,01% (10 mg/mL), a mesma utilizada nos testes *in vivo* aplicada topicamente nas úlceras dos ratos, apresentou viabilidade de fibroblastos semelhante dentre as demais concentrações testadas (Figura 16).

Quanto aos queratinócitos em cultura por 24 horas a viabilidade diminuiu em relação ao controle positivo nas concentrações de 50,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0040$), 25,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0296$), 10,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0098$), 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0172$). Apesar de a viabilidade dos queratinócitos frente à concentração de 10 mg/mL também ter apresentado semelhança em relação às demais concentrações de F1 testadas, notou-se menor viabilidade de queratinócitos do que de fibroblastos pelo mesmo tempo de teste (Figura 16).

Figura 16 – Perfil da **viabilidade celular** e **percentagem de citotoxicidade** da proteína F1 em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e de queratinócitos humanos por 24 horas.

4.2 Confirmação do estado diabético

Os animais que receberam injeção de STZ apresentaram sinais clínicos de diabetes tal como polidipsia e poliúria (segundo acompanhamento diário no biotério).

O estado diabético foi confirmado pela glicemia de jejum maior que 300 mg/dL. A glicemia inicial, correspondente à glicemia média de jejum (por 12 horas) após 15 dias da indução do diabetes, foi de 416,40 mg/dL $\pm$ 62,39 (de 326 mg/dL à 500 mg/dL). Essa glicemia apresentou-se estatisticamente superior à glicemia inicial dos animais não diabéticos, que foi de 120,55 mg/dL $\pm$ 20,06 (de 81 mg/dL à 164 mg/dL) ($p=0,0001$) (Figura 17B).

No final do experimento a glicemia média de jejum (por 12 horas) de todos os animais diabéticos (glicemia final) foi de 390,63 $\pm$ 57,52 (de 305 mg/dL à 500

mg/dL), a qual apresentou-se estatisticamente diferente dos animais não diabéticos que foi de $111,60 \text{ mg/dL} \pm 14,58$ (de 80 mg/dL à 141 mg/dL) ($p=0,0001$). Não houve diferença estatística entre as glicemias inicial e final nos animais diabéticos e nem nos animais não diabéticos (Figura 17B).

Os animais diabéticos apresentaram média de peso corporal inicial de $263,60\text{g} \pm 45,67$ (de 170g a 370g), estatisticamente superior ao peso corporal dos animais não diabéticos que foi de $219,50\text{g} \pm 13,32$ (de 174g à 235g) ($p=0,0001$) (Figura 17C).

Ao final do experimento, a média de peso corporal dos animais diabéticos foi de $262,63 \pm 58,27$ (de 139g à 361g) sem diferença estatística em relação ao peso corporal dos animais não diabéticos, que foi de $236,35 \pm 26,57$ (de 180g à 290g) (Figura 17C).

Não houve diferença estatística entre os pesos inicial e final nos animais diabéticos, entretanto, dentre os animais não diabéticos houve aumento significativo de peso corporal ao final do experimento ($p=0,0155$) (Figura 17C).

Figura 17 – (A) Diferença dos sinais clínicos observados entre o rato diabético e não diabético. Os ratos diabéticos apresentaram menor peso corporal, indolência, caquexia, polidipsia e pelos ouriçados, principalmente quando em quadros mais graves do diabetes (quando a glicemia atingia níveis superiores a 400 mg/dL). Os ratos não diabéticos apresentaram aumento significativo de peso corporal, estado alerta, pele rósea e pelos sedosos. Distribuição das variáveis **(C) glicemia (mg/dL)** e **(C) peso corporal (g)** dos animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**).

4.3 Diferenças entre a pele dos ratos diabéticos e dos não diabéticos

Para esta análise foram utilizadas como biópsia as amostras de pele do dorso dos animais diabéticos e não diabéticos coletadas após a confecção das úlceras. Com isso, foram avaliadas as condições basais da pele dos animais diabéticos e não diabéticos antes de qualquer tratamento tópico (animais do dia 0).

4.3.1 Células inflamatórias, proteínas totais, OSM e OSMR- β

Pela análise histológica da pele dos animais diabéticos (Figura 18B), observou-se maior quantidade de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos e macrófagos, em comparação com a pele dos animais não diabéticos (Figura 18A).

Os animais induzidos ao diabetes apresentaram quase que duas vezes mais células inflamatórias na pele que os animais não diabéticos ($p=0,0001$) (Figuras 18 e 19). Além disso, apresentaram também nível de proteínas totais estatisticamente superiores em relação aos não diabéticos ($p=0,0045$). Em contrapartida, apresentaram também menores níveis de OSM e de seu receptor OSMR- β ($p=0,0001$) (Figura 19).

Figura 18 – Fotomicrografia da pele dorsal de um animal não diabético **(A)** e um diabético **(B)** após coloração com **hematoxilina e eosina**.

Figura 19 – Quantificação das **células inflamatórias (por histomorfometria)**, **proteínas totais (por dosagem bioquímica)**, **OSM** e **OSMR-β** na pele dorsal (sem tratamento) de animais diabéticos **(DM)** e não diabéticos **(N)**.

4.3.2 Estresse celular (iNOS, NO, MPO, MDA, FOX e lipoperóxidos de membranas) e defesas antioxidantes (TRAP e GSH)

Os animais diabéticos e não diabéticos apresentaram níveis semelhantes de MPO e TRAP ($p > 0,05$).

Além disso, os animais diabéticos apresentaram níveis superiores somente de NO ($p = 0,0473$) e de lipoperóxidos de membranas ($p = 0,0001$) em relação ao dos animais não diabéticos. Por outro lado, os níveis inferiores foram os de iNOS, MDA, FOX ($p = 0,0001$) e GSH ($p = 0,0035$) (Figura 20).

Figura 20 – Quantificação de **iNOS** (por imunoistoquímica), **NO**, **MPO**, **MDA**, **FOX**, **lipoperóxidos de membranas**, **TRAP** e **GSH** (por dosagem bioquímica) e na pele dorsal (sem tratamento) de animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**).

4.3.3 Vasos sanguíneos, VEGF e eNOS

Pela análise histológica da pele dos animais diabéticos (Figura 18B), observou-se menor quantidade de vasos sanguíneos em comparação com a pele dos animais não diabéticos (Figura 18A).

Na quantificação dos vasos sanguíneos os animais diabéticos apresentaram menor quantidade de vasos sanguíneos ($p=0,0001$) em relação aos animais não diabéticos (Figuras 18 e 21).

Associado a esta observação, os animais diabéticos apresentaram também níveis inferiores de VEGF ($p=0,0002$) e eNOS ($p=0,0206$) em relação aos animais não diabéticos (Figura 21).

Figura 21 – Quantificação do **número de vasos sanguíneos (por histomorfometria)**, **VEGF** e **eNOS (por imunoistoquímica)** na pele dorsal (sem tratamento) de animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**).

4.3.4 Fibroblastos, colágeno, TGF- β 1 e IGF

Pela análise histológica da pele dos animais diabéticos (Figura 18B) observou-se maior quantidade de fibrócitos em comparação com a pele dos animais

não diabéticos (Figura 18A). Além disso, a pele dos animais diabéticos apresentou maior densidade colagênica, diferente da dos animais não diabéticos (Figuras 18 e 22).

Pela morfometria, não houve diferença estatística entre os animais diabéticos e não diabéticos quanto à quantidade de fibroblastos, colágeno e IGF ($p > 0,05$), apesar de os diabéticos apresentarem essas variáveis levemente superiores em relação aos não diabéticos. Quanto ao TGF- $\beta 1$, os diabéticos apresentaram nível estatisticamente menor em relação aos não diabéticos (Figura 23).

Figura 22 – Fotomicrografia da pele dorsal de um animal não diabético **(A)** e um diabético **(B)** após coloração com **tricroômio de Gomori**.

Figura 23 – Quantificação do **número de fibroblastos** e **colágeno** (por histomorfometria), **TGF- β 1** e **IGF** (por imunohistoquímica) na pele dorsal (sem tratamento) de animais diabéticos (DM) e não diabéticos (N).

4.3.5 Marcadores da sinalização da insulina (IRS, AKT, SHC e ERK)

Os animais diabéticos apresentaram níveis estatisticamente inferiores dos marcadores da sinalização da insulina em relação aos animais não diabéticos – IRS ($p=0,0001$), AKT ($p=0,0041$); SHC ($p=0,0006$) e ERK ($p=0,0002$). Destacou-se também, os maiores níveis apresentados pelas proteínas AKT, SHC e ERK em relação aos níveis mínimos determinados de IRS (Figura 24).

Figura 24 – Quantificação das proteínas **IRS, AKT, SHC e ERK (por imunoistoquímica)** na pele dorsal (sem tratamento) de animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**).

4.4 Diferenças entre a pele dos ratos diabéticos e dos não diabéticos tratados e não tratados nas úlceras cutâneas com F1

Para esta análise foram utilizadas biópsias da úlcera/cicatriz dérmica de ratos dos grupos diabético e não diabético, com (grupo F1) e sem (grupo sham) tratamento tópico com gel de F1.

4.4.1 Estudo da fase inflamatória da cicatrização

Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrices dos animais não diabéticos e diabéticos, tratados ou não com F1 observou-se no grupo DM F1 já no 2º dia de seguimento denso infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos e macrófagos até mesmo em camadas inferiores da lesão. Este achado foi menor que o observado nos animais DM sham. Quanto aos não diabéticos, o infiltrado inflamatório apresentou-se bem menos denso. No entanto, o grupo N F1 apresentou infiltrado inflamatório mais denso em relação ao grupo N sham. No 7º dia de seguimento a densidade do infiltrado inflamatório dos respectivos grupos permaneceu praticamente semelhante à do 2º dia, havendo redução após o 14º dia (Figura 25).

Pela quantificação do infiltrado inflamatório, realizado por histomorfometria, o grupo N F1 no 2º dia apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório em relação ao grupo N sham ($p=0,0001$). Não houve diferença estatística entre os grupos DM F1 e DM sham. Além disso, foi observado maior infiltrado inflamatório nos grupos diabéticos (DM sham e DM F1) do que nos grupos não diabéticos (N sham e N F1) (Figura 26).

No 7° dia, os grupos N F1 e N sham mantiveram o nível de infiltrado inflamatório semelhante ao do 2° dia (Figura 27), sendo o grupo N F1 maior que N sham ($p=0,0021$) (Figura 26). Entretanto, o grupo DM F1 apresentou aumento importante do 2° para o 7° dia (Figura 27), tornando-se estatisticamente superior ao grupo DM sham ($p=0,0452$) (Figura 26).

A partir do 14° dia houve redução (menos que a metade) dos níveis de infiltrado inflamatório em todos os grupos (Figura 27). O grupo N F1 permaneceu estatisticamente superior ao grupo N sham no 14° ($p=0,0005$) e no 21° ($p=0,0057$) dias. Por outro lado, dentre os diabéticos, os níveis de infiltrado inflamatório foram semelhantes nestes dias de seguimento ($p>0,05$) (Figuras 26 e 27).

A quantificação de macrófagos (células CD11b⁺), células CD4⁺ e CD8⁺ foram feitas através de citometria de fluxo do sobrenadante do homogenato da úlcera. No 2° dia, o nível das células CD11b⁺ foi semelhante entre os todos grupos, apesar de o grupo N sham se apresentar levemente superior (sem diferença estatística) (Figura 26).

No 7° dia, o grupo DM sham se destacou apresentando níveis superiores de células CD11b⁺ em relação do 2° dia (Figura 27), sendo diferente estatisticamente do grupo DM F1 ($p=0,0263$). Dentre os grupos não diabéticos não houve diferença estatística (Figura 26).

No 14° dia, destacou-se o grupo N F1 com importante aumento de células CD11b⁺ em relação ao 7° dia (Figura 27), superior ao N sham ($p=0,0004$) (Figura 26). Quanto aos diabéticos, DM sham permaneceu semelhante ao 7° dia e superior ao DM F1 ($p=0,0112$) (Figuras 26 e 27).

No 21° dia, houve um aumento significativo de células CD11b⁺ no grupo DM F1 e N sham em relação ao 14° dia (Figura 27). No entanto, não houve diferença estatística entre todos os grupos (Figura 26). Além disso, é importante ressaltar o aumento importante de células CD11b⁺ do 14° ao 21° dia (Figura 27).

Em relação às células CD4⁺ no 2º dia, o grupo N sham apresentou-se estatisticamente superior ao grupo N F1 ($p=0,0123$), semelhantemente ao grupo DM F1, que se apresentou superior ao grupo DM sham ($p=0,0069$) (Figura 26).

No 7º dia, não houve diferença estatística entre todos os grupos, no entanto, o grupo N F1 e DM sham apresentaram importante aumento de células CD4⁺ do 2º para o 7º dia, ao passo que os grupos N sham e DM F1 apresentaram importante redução, níveis estes que se mantiveram até o 21º dia (Figura 27), com DM sham superior ao DM F1 no 14º dia ($p=0,0264$) e N F1 superior ao N sham ($p=0,0411$) (Figura 26).

Com relação às células CD8⁺ no 2º dia, o grupo N F1 apresentou-se inferior ao N sham ($p=0,0090$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0406$) (Figura 26).

Do 2º para o 7º dia o grupo N F1 apresentou aumento de células CD8⁺ praticamente igualando-se ao nível de N sham, enquanto que o grupo DM F1 apresentou importante redução, tornando-se estatisticamente diferente do grupo DM sham ($p=0,0462$) (Figuras 26 e 27).

No 14º dia, o grupo N sham apresentou diminuição no nível de células CD8⁺ em relação ao 7º dia enquanto o grupo N F1 apresentou aumento, evidenciando a importante diferença entre esses grupos no 14º dia ($p=0,010$). Em relação aos animais diabéticos, o grupo DM sham apresentou-se superior em relação ao 7º dia e superior ao grupo DM F1 ($p=0,0001$) (Figuras 26 e 27).

No 21º dia, os níveis de células CD8⁺ nos grupos N sham e DM F1 voltaram a aumentar. O grupo DM F1 apresentou-se estatisticamente diferente do grupo DM sham ($p= 0,0265$). Enquanto que nos grupos não diabéticos os níveis foram semelhantes, sem diferença estatística (Figura 26).

Figura 25 – Fotomicrografia das áreas ulceradas tratada topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento corada com **hematoxilina e eosina**. Destaca-se o infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibroblastos em cada grupo e tempo de seguimento.

Figura 26 – Quantificação do **infiltrado inflamatório (por histomorfometria)** e **células CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺ (por citometria de fluxo)** das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 27 – Evolução das variáveis **infiltrado inflamatório**, **CD11b⁺**, **CD4⁺** e **CD8⁺**, **relação CD4⁺/CD8⁺** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Para quantificação de proteínas totais no 2º dia, realizada por dosagem bioquímica por meio do sobrenadante do macerado da úlcera/cicatriz, o grupo N F1 apresentou nível inferior de proteínas totais em relação ao grupo N sham ($p=0,0049$). Quanto aos diabéticos, não houve diferença estatística, apesar de o grupo DM F1 ter se apresentado levemente superior em relação ao grupo DM sham (Figura 28).

No 7º dia, o grupo N sham destacou-se com redução importante no nível de proteínas totais em relação ao 2º dia, apresentando-se estatisticamente inferior ao grupo N F1 ($p=0,0024$). O grupo DM F1 apresentou aumento do 2º para o 7º dia além de apresentar-se estatisticamente superior em relação ao grupo DM sham ($p=0,0003$) (Figuras 28 e 29).

No 14º dia, o grupo N F1 apresentou-se estatisticamente superior em relação ao grupo N sham ($p=0,0001$) além de apresentar aumento importante no nível de proteínas totais em relação ao 7º dia. Quanto aos diabéticos, ambos os grupos apresentaram redução no nível de proteínas totais em relação ao 7º dia e o grupo DM F1 foi estatisticamente superior em relação ao DM sham ($p=0,0002$) (Figuras 28 e 29).

Em relação ao 21º dia, o grupo N F1 manteve-se superior ao N sham ($p=0,0010$) semelhante ao 14º dia, assim como o grupo DM F1 manteve-se superior ao DM sham ($p=0,0001$), entretanto, com níveis menores de proteínas totais (Figuras 28 e 29).

Para quantificação da oncostatina M (OSM), por meio da histomorfometria de imagens de imunoistoquímica, no 2º dia o grupo N F1 apresentou-se inferior ao grupo N sham ($p=0,0003$), enquanto o grupo DM F1 apresentou-se superior ao grupo DM sham ($p=0,0001$) (Figura 28).

No 7º dia o grupo N F1 apresentou aumento da OSM enquanto que o grupo N sham apresentou importante redução em relação ao 2º dia, permanecendo estatisticamente diferentes ($p=0,0012$). Ambos os grupos diabéticos, mantiveram os níveis da OSM em relação ao 2º dia ($p=0,0001$) (Figuras 28 a 30).

No 14° dia, o grupo N F1 apresentou importante redução de OSM enquanto que o N sham apresentou importante aumento em relação ao 7° dia, apresentando-se estatisticamente diferentes neste tempo de seguimento ($p=0,0001$). Por outro lado, os grupos diabéticos mantiveram níveis semelhantes em relação ao 7° dia (Figuras 28 a 30).

No 21° dia, foi observado importante aumento de OSM no grupo N F1 assemelhando-se com o grupo N sham ($p>0,05$), além da importante redução no grupo DM F1, assemelhando-se com o grupo DM sham (Figuras 28 a 30).

O OSMR- β , receptor da OSM também quantificado pela histomorfometria em imagens de imunoistoquímica, apresentou bastante semelhança com a quantificação de OSM. No 2° dia, o grupo N F1 apresentou inferior ao N sham ($p=0,0008$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou-se superior ao DM sham ($p=0,0001$) (Figura 28).

No 7° dia, houve importante redução de OSMR- β no grupo N sham e manutenção no grupo N F1 em relação ao 2° dia, tornando-os estatisticamente diferentes neste dia de seguimento ($p=0,0003$), enquanto que ambos os grupos diabéticos mantiveram os níveis de OSMR- β semelhantes até o 21° dia ($p=0,0044$) (Figuras 28, 29 e 31).

No 14° dia, houve importante aumento no grupo N sham em relação ao 7° dia, diferenciando-se estatisticamente do grupo N F1 ($p=0,0001$) assemelhando-se ao 2° dia. No 21° dia, houve importante aumento de OSMR- β no grupo N F1 assemelhando-se ao N sham ($p>0,05$) (Figuras 28, 29 e 31).

Figura 28 – Quantificação das **proteínas totais (por dosagem bioquímica)**, **OSM** e **OSMR-β (por imunoistoquímica)** das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 29 – Evolução das variáveis **proteínas totais**, **OSM** e **OSMR-β** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 30 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para OSM** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 31 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para OSMR- β** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

4.4.1.1 Estresse celular

Na quantificação da enzima iNOS no 2º dia, em percentagem de área marcada nas imagens de imunoistoquímica, os grupos N F1 e N sham não apresentaram diferença estatística, apesar de o grupo N sham ser levemente superior ao N F1. Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou importante nível de iNOS superior ao grupo DM sham ($p=0,0001$) (Figura 32 e 34).

No 7º dia, os grupos diabéticos mantiveram os níveis de iNOS semelhantes entre si, embora apresentassem importante redução de iNOS em relação ao 2º dia. Já o grupo DM F1, houve diminuição de iNOS em relação ao 2º dia e mesmo assim se manteve superior ao grupo DM sham ($p=0,0001$) no 7º dia (Figuras 32 à 34).

No 14º dia, o grupo N F1 manteve-se com nível semelhante de iNOS em relação ao 7º dia e o grupo N sham apresentou importante aumento tornando-se assim superior ao grupo N F1 no 14º dia ($p=0,0001$). Com relação aos diabéticos, o grupo DM sham apresentou leve aumento de iNOS em relação ao 7º dia, apresentando-se sem diferença estatística em relação ao DM F1 (Figuras 32 à 34).

No 21º dia, os grupos não diabéticos igualaram seus níveis de iNOS ($p>0,05$) enquanto que nos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou importante diminuição de iNOS em relação ao 14º dia, sendo inferior ao grupos DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 32 à 34).

Para estudo do estresse celular também foram feitas dosagens bioquímicas de óxido nítrico (NO) (por quimiluminescência), mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela oxidação do *ferrous xylene-orange* (FOX) e lipoperóxidos de membranas (por quimiluminescência).

Com relação ao NO, foi observado no 2º dia semelhança entre todos os grupos, apesar de os grupos diabéticos apresentarem-se levemente superiores, sobretudo o grupo DM sham (Figura 32).

No 7° dia, tornou-se mais pronunciado o superior nível de NO nos grupos diabéticos, principalmente no grupo DM F1 ($p>0,05$). Por outro lado, dentre os grupos não diabéticos houve aumento de NO no grupo N sham em relação ao 2° dia, apesar de manter-se sem diferença estatística em relação ao grupo N F1 (Figura 32).

No 14° dia, os níveis de NO de todos os grupos reduziram. No entanto, ainda assim, o grupo DM F1 permaneceu com nível superior de NO em relação ao DM sham ($p=0,0393$). Dentre os animais não diabéticos, os níveis de NO foram semelhantes ($p>0,05$) (Figuras 32 e 33).

No 21° dia, houve um leve aumento nos níveis de NO do grupo N sham em relação ao 14° dia apresentando-se estatisticamente diferente em relação ao grupo N F1 ($p=0,0231$). Quanto aos diabéticos, houve redução importante de NO em relação ao 14° dia, assemelhando-se ao grupo DM F1 ($p>0,05$) (Figuras 32 e 33).

Quanto à quantificação de MPO no 2° dia, o grupo N F1 apresentou-se estatisticamente superior ao grupo N sham ($p=0,0354$). Destacou-se também, nível inferior de MPO no grupo DM F1 em relação ao grupo DM sham ($p=0,0141$) (Figura 32).

No 7° dia, os grupos não diabéticos apresentaram níveis de MPO semelhantes ($p>0,05$) além de apresentarem importante redução em relação ao 2° dia. Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 permaneceu estatisticamente inferior ao grupo DM sham ($p=0,0314$) (Figuras 32 e 33).

No 14° dia, os grupos não diabéticos mantiveram os níveis de MPO semelhantes apesar de o grupo N F1 apresentar-se superior ao N sham. Já nos grupos diabéticos houve redução importante em relação ao 7° dia, e o grupo DM F1 manteve-se inferior ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 32 e 33).

No 21° dia, o grupo N F1 manteve-se semelhante ao N sham, enquanto dentre os diabéticos o grupo DM F1 apresentou-se superior ao DM sham ($p=0,0021$) (Figuras 32 e 33).

Quanto ao MDA no 2° dia, o grupo N F1 apresentou-se estatisticamente inferior ao N sham ($p=0,0001$), enquanto que ambos os grupos diabéticos

apresentaram-se semelhantes ($p>0,05$), apesar do grupo DM F1 levemente maior que o grupo DM sham (Figura 32).

No 7º dia, observou-se aumento importante do nível de MDA em ambos os grupos não diabéticos em relação ao 2º dia, sobretudo no grupo N sham, que apresentou-se estatisticamente diferente do N F1 ($p=0,0001$). Em relação aos diabéticos, ambos os grupos apresentaram redução nos níveis de MDA em relação ao 2º dia e o grupo DM F1 apresentou-se superior ao DM sham ($p=0,0005$) (Figuras 32 e 33).

No 14º dia, no grupo N sham houve persistência ao elevado estímulo do estresse celular apresentando maiores níveis de MDA em relação ao 7º dia, diferenciando-se estatisticamente do grupo N F1 ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, houve aumento importante nos níveis de MDA em relação aos 7º dia, no entanto, ambos foram semelhantes entre si ($p>0,05$) (Figuras 32 e 33).

No 21º dia, o nível de MDA no grupo N sham continuou elevado, diferente do grupo N F1 ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, os níveis foram superiores em relação ao 14º dia, entretanto, semelhante entre si ($p>0,05$) (Figuras 32 e 33).

Quanto ao FOX no 2º dia, o grupo N F1 apresentou níveis estatisticamente inferiores em relação ao N sham ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou nível superior em relação ao grupo DM sham ($p=0,0022$) (Figura 32).

No 7º dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram importante aumento nos níveis de FOX em relação ao 2º dia, no entanto não houve diferença entre eles neste tempo de seguimento. Com relação aos grupos diabéticos, também não houve diferença entre eles, apesar da importante redução dos níveis de FOX no grupo DM F1 em relação ao 2º dia (Figuras 32 e 33).

No 14º dia, os grupos não diabéticos apresentaram importante decréscimo nos níveis de FOX em relação ao 7º dia, mesmo não havendo diferença estatística entre eles. Quanto aos diabéticos, ambos os grupos apresentaram aumento importante do 7º para o 14º dia, sobretudo no grupo DM sham, que se tornou estatisticamente diferente em relação ao grupo DM F1 ($p=0,0013$) (Figuras 32 e 33).

No 21º dia, o grupo N sham apresentou aumento importante no nível de FOX em relação ao 14º dia, apresentando-se estatisticamente diferente em relação ao grupo N F1 ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, os níveis de FOX foram levemente maiores em relação ao 14º dia e o grupo DM sham apresentou-se estatisticamente superior em relação ao DM F1 ($p=0,0001$) (Figuras 32 e 33).

Quanto aos lipoperóxidos de membranas no 2º dia, o grupo N F1 apresentou-se superior em relação ao N sham ($p=0,0067$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou nível semelhante de lipoperóxidos de membranas em relação ao DM sham ($p>0,05$) (Figura 32).

No 7º dia, houve redução importante do grupo N F1 em relação ao 2º dia, o qual se assemelhou ao grupo N sham ($p>0,05$). Por outro lado, o grupo DM F1 diminuiu o nível de lipoperóxidos de membranas, apresentando-se estatisticamente diferente do grupo DM sham ($p=0,0097$) (Figuras 32 e 33).

No 14º dia, o nível de lipoperóxidos de membranas do grupo N F1 voltaram a aumentar assemelhando-se ao 2º dia ($p=0,0111$), enquanto que ambos os grupos diabéticos apresentaram redução e semelhantes entre si ($p>0,05$) (Figuras 32 e 33).

No 21º dia, o grupo N sham apresentou importante aumento de lipoperóxidos de membranas em relação ao 14º dia, diferenciando-se do grupo N F1 ($p=0,0003$), enquanto que o grupo DM F1 voltou a aumentar o nível de lipoperóxidos de membranas em relação ao 14º dia, diferente do grupo DM sham ($p=0,0188$) (Figuras 32 e 33).

Figura 32 – Quantificação de **iNOS** (por imunoistoquímica), **NO**, **MPO**, **MDA**, **FOX** e **lipoperóxidos de membranas** (por dosagem bioquímica) das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 33 – Evolução das variáveis **iNOS**, **NO**, **MPO**, **MDA**, **FOX** e **lipoperóxidos de membranas** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 34 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para iNOS** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

4.4.1.2 Defesas antioxidantes

Para estudo das defesas antioxidantes foi feita dosagem bioquímica da Capacidade Antioxidante Total (TRAP) por quimiluminescência e da glutathiona (GSH).

Quanto à quantificação de TRAP, todos os grupos apresentaram-se semelhantes no 2º dia. No entanto, no 7º dia houve aumento nos níveis de TRAP no grupo N F1 em relação 2º dia. Mesmo assim, não houve diferença estatística entre os grupos não diabéticos, mantendo-se semelhantes até o 14º dia. Em contrapartida, quanto aos grupos diabéticos houve aumento importante dos níveis de TRAP no grupo DM sham do 2º para o 7º dia, apresentando-se superior em relação ao grupo DM F1 no 7º ($p=0,0116$) e 14º ($p=0,0215$) dias. No 21º dia, o grupo N F1 apresentou superior nível de TRAP em relação ao N sham ($p=0,0007$), destacando-se também a redução nos níveis de TRAP do 14º ao 21º dias. Por outro lado, ambos os grupos diabéticos apresentaram-se semelhantes no 21º dia, apresentando também redução nos níveis de TRAP em relação ao 14º dia (Figuras 35 e 36).

Quanto à quantificação do GSH, o grupo N F1 apresentou-se inferior ao grupo N sham ($p=0,0082$) no 2º dia, enquanto que o grupo DM F1 apresentou-se estatisticamente superior em relação ao grupo DM sham ($p=0,0193$) (Figura 35).

No 7º dia, os grupos não diabéticos apresentaram aumento importante de GSH em relação ao 2º dia, sobretudo no grupo N sham, que permaneceu superior ao grupo N F1 ($p=0,0126$). Quanto aos grupos diabéticos, os níveis de GSH foram inferiores em relação ao 2º dia, e semelhantes entre si ($p>0,05$) (Figuras 35 e 36).

No 14º dia, o grupo N sham apresentou persistente atividade antioxidante com aumento do nível de GSH em relação ao 7º dia, apresentando-se estatisticamente diferente do grupo N F1 ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM sham apresentou aumento importante do nível de GSH em relação ao 7º dia, além de apresentar-se estatisticamente superior ao grupo DM F1 ($p=0,0008$) (Figuras 35 e 36).

No dia 21, o grupo N sham apresentou aumento consideravelmente importante em relação ao 14º dia, além de apresentar-se superior estatisticamente ao grupo N F1 ($p=0,0001$). Dentre os grupos diabéticos, o DM F1 aumentou o nível de GSH do 14º para o 21º dia, apesar de não apresentar diferença estatística com relação ao DM sham (Figuras 35 e 36).

Figura 35 – Quantificação de **TRAP** e **GSH (por dosagem bioquímica)** das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 36 – Evolução das variáveis **TRAP** e **GSH** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

4.4.2 Estudo da angiogênese

Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrizes, observou-se que o grupo DM F1 apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos já no 2º dia em relação aos demais grupos. No entanto, no 7º dia todos os grupos apresentaram importante angiogênese, mais evidenciada no grupo DM F1 em relação aos demais grupos. No 14º dia, notou-se redução da quantidade dos vasos em todos os grupos, mesmo assim o grupo DM F1 ainda apresentou maior angiogênese em relação aos

demais grupos. Este perfil se estendeu até o 21° dia, momento em que os demais grupos quase não apresentaram vasos sanguíneos e o grupo DM F1 ainda apresentava (Figura 25).

Para quantificação da angiogênese foram feitas contagens dos vasos sanguíneos nas secções histológicas coradas com HE. No 2° dia, não houve diferença estatística entre os grupos não diabéticos nem entre os grupos diabéticos. Entretanto, o grupo DM sham apresentou superior quantidade de vasos sanguíneos em relação ao grupo N sham ($p=0,0474$) (Figura 37).

No 7° dia, houve importante aumento da angiogênese de ambos os grupos não diabéticos em relação ao 2° dia, o qual foi mais pronunciado no grupo N sham. Quanto aos animais diabéticos, ambos apresentaram semelhante angiogênese ($p>0,05$) (Figuras 37 e 38).

No 14° dia, o grupo N sham manteve-se com angiogênese superior mesmo sem diferença estatística em relação ao grupo N F1. Quanto aos diabéticos, houve importante redução no grupo DM sham em relação ao 7° dia, que apresentou-se estatisticamente inferior ao grupo N sham (Figuras 37 e 38).

No 21° dia, o grupo N sham manteve com a maior quantidade de vasos sanguíneos, semelhante ao grupo N F1. Dentre os diabéticos, ambos os grupos mantiveram semelhante quantidade de vasos sanguíneos em relação ao 14° dia, e o grupo DM sham manteve-se estatisticamente inferior ao grupo N sham ($p=0.0026$) (Figuras 37 e 38).

Para quantificação de VEGF, foi feito imunoistoquímica e quantificação da percentagem de marcação pelo ImageJ.

No 2° dia, o grupo N F1 apresentou nível inferior de VEGF em relação ao grupo N sham ($p=0,0031$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou nível de VEGF superior ao DM sham ($p=0,0004$) (Figura 37 e 39).

No 7° dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram diminuição importante de VEGF em relação ao 2° dia. No entanto, o grupo N F1 apresentou superior nível de VEGF em relação ao N sham. Os diabéticos apresentaram redução

do nível de VEGF em relação ao 2º dia, e o grupo DM F1 manteve-se superior ao DM sham ($p=0,0338$) (Figuras 37 a 39).

No 14º dia, o grupo N F1 voltou a apresentar níveis de VEGF inferiores em relação ao grupo N sham ($p=0,0359$), como observado no 2º dia. O grupo DM sham aumentou o nível de VEGF em relação ao 7º dia assemelhando-se ao grupo DM F1 ($p>0,05$) (Figuras 37 a 39).

No 21º dia, o grupo N F1 apresentou importante aumento de VEGF em relação ao 14º dia, assemelhando-se com o grupo N sham, que também aumentou o nível de VEGF do 14º para o 21º dia. Dentre os diabéticos, o grupo DM F1 apresentou redução importante em relação ao 14º dia, tornando-se estatisticamente inferior ao DM sham ($p=0,0008$) (Figuras 37 a 39).

Quanto a análise de eNOS, também realizada por meio da quantificação da marcação imunoistoquímica, no 2º dia o grupo N F1 apresentou-se semelhante ao grupo N sham, enquanto ambos os grupos diabéticos apresentaram níveis semelhantes de eNOS ($p>0,05$), e o grupo DM F1 apresentou superior nível de eNOS em relação ao N F1 (Figura 37).

No 7º dia, o grupo N sham apresentou importante redução de eNOS em relação ao 2º dia, apresentando-se diferente do grupo N F1 ($p=0,0003$). Dentre os diabéticos, ambos mantiveram-se semelhantes em relação ao 2º dia ($p>0,05$) e o grupo DM F1 apresentou superior nível de eNOS em relação ao grupo N F1 ($p=0,0085$) (Figuras 37, 38 e 40).

No 14º dia, o grupo N sham apresentou importante aumento de eNOS em relação ao 7º dia, além de apresentar-se superior ao N F1 ($p=0,0001$). Por outro lado, o grupo DM F1 se mantém superior ao DM sham ($p=0,0038$) (Figuras 37, 38 e 40).

No 21º dia, o grupo N F1 apresentou aumento importante em relação ao 14º dia, além de apresentar-se estatisticamente diferente do grupo N sham ($p=0,0043$). O grupo DM sham aumentou o nível de eNOS em relação ao 14º dia, assemelhando-se ao grupo DM F1 (Figuras 37, 38 e 40).

Figura 37 – Quantificação da **angiogênese** (por **histomorfometria**), **VEGF** e **eNOS** (por **imunoistoquímica**) das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 38 – Evolução das variáveis **angiogênese**, **VEGF** e **eNOS** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 39 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para VEGF** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 40 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para eNOS** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

4.4.3 Estudo da reepitelização, fibroplasia e colagênese

Para o estudo da reepitelização foi calculado o índice de cicatrização das úlceras (ICU) considerando a área da úlcera (calculada pelo ImageJ) no início e no último dia de acompanhamento.

Com relação aos animais não diabéticos no 2º dia, as úlceras do grupo N sham apresentaram reepitelização estatisticamente superior em relação às do grupo N F1 ($p=0,0009$). No 7º dia, este achado se repetiu com maiores índices de cicatrização no grupo N sham, estatisticamente superior em relação ao N F1 ($p=0,0017$). No 14º dia, não houve diferença estatística entre os grupos em questão. No entanto, as úlceras dos animais do grupo N sham apresentaram-se mais reepitelizadas em relação às do grupo N F1, que ainda apresentavam atrasado grau de reepitelização. No 21º dia, as úlceras do grupo N sham estavam praticamente reepitelizadas, diferente das do grupo N F1, que ainda possuía algumas úlceras em atrasado grau de reepitelização ($p>0,05$) (Figura 41).

Com relação aos animais diabéticos no 2º dia, as úlceras do grupo DM F1 apresentaram reepitelização estatisticamente superior em relação às do grupo DM sham ($p=0,0026$). Além disso, notou-se no grupo DM sham maior quantidade de úlceras que aumentaram de tamanho (ICU com valor negativo). No 7º dia, as úlceras do grupo DM F1 também possuíam avançado grau de reepitelização semelhante ao 2º dia, sem diferença estatística em relação ao grupo DM sham. No 14º dia, as úlceras de ambos os grupos diabéticos apresentavam-se praticamente reepitelizadas ($p>0,05$), apresentavam-se totalmente reepitelizadas no 21º dia ($p>0,05$) (Figura 41).

Figura 41 – (A) Quantificação da **reepitelização (pelo índice de cicatrização das úlceras)** e **(B)** seguimento clínico das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrizes, observou-se que com a diminuição do denso infiltrado inflamatório, começaram a aparecer os primeiro fibrócitos no 7º dia, aumentando em número e grau de diferenciação ao longo dos próximos dias de seguimento. O grupo DM F1 apresentou fibroblastos

mais diferenciados no 7º dia assim como os grupos DM sham e N F1, diferente do grupo N sham que apresentou quantidade importante de células inflamatórias até o 14º dia. No 14º dia, os grupos diabéticos apresentaram maiores quantidades de fibroblastos desenvolvidos, diferente dos grupos não diabéticos. No 21º dia, os grupos diabéticos evidenciaram maior quantidade de fibroblastos diferenciados que os grupos não diabéticos (Figura 25).

Pela análise histológica por meio da coloração de tricrômio de Gomori pode-se perceber maior coloração e maior densidade colagênica nos grupos diabéticos especialmente no grupo DM F1 no 14º e 21º dias, assemelhando-se ao grupo N sham. Já os grupos N F1 e DM sham se assemelharam com menor coloração de tricrômio de Gomori e menor densidade colagênica (Figura 42).

Para quantificação da fibroplasia, foram feitas contagens de fibroblastos em secções histológicas coradas com HE. No 2º dia, o grupo N sham apresentou maior quantidade de fibroblastos, estatisticamente diferente do grupo N F1 ($p=0,0222$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM sham apresentou maior quantidade de fibroblastos, estatisticamente diferente em relação ao grupo DM F1 ($p=0,0455$) (Figuras 43 e 44).

No 7º dia, o grupo N sham apresentou aumento importante na quantidade de fibroblastos em relação ao 2º dia, mantendo-se superior ao grupo N F1 ($p=0,0001$). Com relação aos diabéticos, os níveis de fibroblastos foram superiores, comparados ao 2º dia, no entanto não houve diferença estatística entre eles (Figuras 43 e 44).

No 14º dia, o grupo N F1 apresentou aumento importante de fibroblastos em relação ao 7º dia, o grupo N sham manteve-se semelhante, não havendo diferença estatística entre eles. Com relação ao grupo DM F1, houve aumento considerável de fibroblastos em relação ao 7º dia, superior ao grupo DM sham ($p=0,0121$), que também apresentou importante aumento de fibroblastos em relação ao 7º dia (Figuras 43 e 44).

No 21° dia, a quantidade de fibroblastos dos grupos não diabéticos permaneceu semelhante à do 14° dia, sem diferença estatística entre eles. Houve aumento importante de fibroblastos nos grupos diabéticos do 14° para o 21° dia. Apesar de o grupo DM F1 apresentar nível de fibroblastos levemente superior ao de DM sham, não houve diferença estatística (Figuras 43 e 44).

Para análise da colagênese foram utilizadas secções histológicas corados com tricrômio de Gomori e com o ImageJ foi calculada a percentagem de área de coloração verde (colágeno) na imagem histológica. No 2° dia o grupo N F1 apresentou inferior percentagem de coloração em relação ao grupo N sham ($p=0,0052$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou maior percentagem de coloração diferente do que no grupo DM sham ($p=0,0001$) (Figura 43).

No 7° dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram aumento importante na percentagem de colágeno em relação ao 2° dia. Mesmo assim, o grupo N F1 continuou inferior ao N sham ($p=0,0448$). Os grupos diabéticos apresentaram aumento importante na coloração para colágeno em relação ao 2° dia e o grupo DM F1 continuou superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 43 e 44).

No 14° dia, a percentagem de colágeno dentre os grupos não diabéticos apresentou-se levemente aumentada em relação ao 7° dia. Além disso, o grupo N F1 manteve-se inferior em relação ao N sham ($p=0,0141$). Já nos grupos diabéticos, o DM F1 manteve-se superior ao DM sham ($p=0,0004$) (Figuras 43 e 44).

No 21° dia, houve redução da percentagem de colágeno no grupo N sham em relação ao 14° dia e o grupo N sham apresentou semelhança com o N F1 ($p>0,05$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 persistiu em manter-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 43 e 44).

Para quantificação do TGF- β 1, realizado por histomorfometria em secções de imunoistoquímica, no 2° dia, o grupo N F1 apresentou nível de marcação para TGF- β 1 inferior ao grupo N sham ($p=0,0001$). Dentre os diabéticos, o grupo DM F1

apresentou nível superior de TGF- β 1 em relação ao DM sham ($p=0,0164$) (Figuras 43 a 45).

No 7° dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram importante redução de TGF- β 1 em relação ao 2° dia. Além disso, o grupo N F1 apresentou superior ao N sham ($p=0,0001$). Quanto aos diabéticos, ambos os grupos também apresentaram redução de TGF- β 1 em relação ao 2° dia, assemelhando-se entre si ($p>0,05$) (Figuras 43 a 45).

No 14° dia, o grupo N sham apresentou importante aumento em relação ao 7° dia, diferenciando-se do grupo N F1 ($p=0,0001$). Por outro lado, o grupo DM F1 novamente aumentou seus níveis de TGF- β 1 apresentando-se superior ao DM sham ($p=0,1034$) (Figuras 43 a 45).

No 21° dia, houve uma inversão nos níveis de TGF- β 1 em relação ao 14° dia, e o grupo N F1 apresentou-se superior ao N sham ($p=0,0001$). Semelhantemente aconteceu com os diabéticos, com aumento importante dos níveis de TGF- β 1 no grupo DM sham superior em relação ao grupo DM F1 ($p=0,0001$) (Figuras 43 a 45).

Para a análise do IGF, também foi utilizada quantificação de marcação imunoistoquímica. No 2° dia, o grupo N F1 apresentou nível de IGF inferior em relação ao de N sham ($p=0,0115$), enquanto que o nível de IGF do grupo DM F1 foi superior ao de DM sham ($p=0,0001$) (Figura 43).

No 7° dia, houve diminuição considerável nos níveis de IGF no grupo N sham em relação ao 2° dia, apresentando-se diferente do N F1 ($p=0,0003$). Ambos os grupos diabéticos apresentaram redução importante nos níveis de IGF, embora o DM F1 continuasse superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 43, 44 e 46).

No 14° dia, houve aumento nos níveis de IGF no grupo N sham em relação ao 7° dia, apresentando-se diferente do N F1 ($p=0,0001$), enquanto que os grupos diabéticos mantiveram-se semelhantes ao 7° dia ($p=0,0001$) (Figuras 43, 44 e 46).

No 21° dia, o grupo N F1 apresentou importante aumento de IGF, estatisticamente superior ao N sham ($p=0,0001$). Os grupos diabéticos apresentaram

redução nos níveis de IGF em relação ao 14º dia e mesmo assim o grupo DM F1 manteve-se superior ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 43, 44 e 46).

Figura 42 – Fotomicrografia das áreas ulceradas tratada topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento, corada com **tricroômio de Gomori**. Destaca-se o nível de produção colagênica (coloração verde) em cada grupo e tempo de seguimento.

Figura 43 – Quantificação da **fibroplasia** e **colagênese** (por histomorfometria), **TGF-β1** e **IGF** (por imunoistoquímica) das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 44 – Evolução das variáveis **fibroplasia**, **colagênese**, **TGF-β1** e **IGF** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 45 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para TGF- β 1** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 46 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para IGF** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

4.4.4 Marcadores da sinalização da insulina

Para análise dos marcadores da sinalização da insulina foram realizadas marcações por imunoistoquímica de biópsias da úlcera.

Quanto ao IRS no 2º dia, o grupo N sham apresentou marcação superior em relação ao N F1 ($p=0,0005$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figura 47).

No 7º dia, o grupo N sham apresentou redução importante na marcação de IRS em relação ao 2º dia, apresentando-se inferior ao grupo N F1 ($p=0,0001$). Os diabéticos também apresentaram redução em relação ao 2º dia e mesmo assim o grupo DM F1 manteve-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 47 a 49).

No 14º dia, o grupo N sham apresentou aumento na marcação de IRS em relação ao 7º dia, além de apresentar-se estatisticamente diferente em relação ao grupo N F1 ($p=0,0025$). Quanto aos diabéticos, o grupo DM F1 apresentou nível de IRS semelhante ao do 7º dia e superior ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 47 a 49).

No 21º dia, o grupo N F1 aumentou seu nível de IRS assemelhando-se ao grupo N sham, quanto que ambos os grupos diabéticos apresentaram-se semelhante nível de IRS ($p>0,05$) (Figuras 47 a 49).

Quanto ao AKT no 2º dia, o grupo N F1 apresentou-se inferior em relação ao grupo N sham ($p=0,0001$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou-se inferior em relação ao DM sham ($p=0,0402$) (Figura 47).

No 7º dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram redução nos níveis de AKT ($p>0,05$) em relação ao 2º dia, e o grupo DM F1 manteve-se estatisticamente inferior ao grupo DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 47, 48 e 50).

No 14º dia, o grupo N sham apresentou importante aumento de AKT em relação ao 7º dia, apresentando-se superior ao N F1 ($p=0,0001$). Quanto aos

diabéticos, houve aumento importante de AKT no grupo DM F1, sem diferença estatística em relação ao DM sham (Figuras 47, 48 e 50).

No 21° dia, houve redução importante nos níveis de AKT no grupo N sham em relação ao 14° dia, apresentando-se inferior ao N F1 ($p=0,0140$). O grupo DM F1 voltou a diminuir seu nível de AKT, apresentando-se inferior ao DM sham ($p=0,0005$) (Figuras 47, 48 e 50).

Quanto ao SHC no 2° dia, o grupo N F1 apresentou-se inferior ao N sham ($p=0,0001$) enquanto o grupo DM F1 apresentou superior nível de SHC em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figura 47).

No 7° dia, ambos os grupos não diabéticos apresentaram redução nos níveis de SHC em relação ao 2° dia, principalmente o grupo N sham, que se assemelhou com o grupo N F1 ($p>0,05$). Dentre os diabéticos, ambos os grupos também apresentaram redução de SHC, no entanto, o grupo DM F1 manteve-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 47, 48 e 51).

No 14° dia, houve aumento nos níveis de SHC no grupo N F1 em relação ao 7° dia, apresentando-se superior ao N sham ($p=0,0025$). Ambos os grupos diabéticos apresentaram importante aumento de SHC em relação ao 7° dia, sobretudo o grupo DM sham, assemelhando-se com o grupo DM F1 ($p>0,05$) (Figuras 47, 48 e 51).

No 21° dia, houve redução importante dos níveis de SHC no grupo N sham em relação ao 14° dia, assemelhando-se com o grupo N F1 ($p>0,05$). O grupo DM F1 reduziu os níveis de SHC em relação ao 14° dia, apresentando-se estatisticamente inferior ao DM sham ($p=0,0331$) (Figuras 47, 48 e 51).

Quanto ao ERK no 2° dia, o grupo N F1 apresentou-se inferior ao grupo N sham ($p=0,0001$), enquanto que o grupo DM F1 apresentou-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0001$) (Figura 47).

No 7° dia, o grupo N F1 apresentou importante aumento nos níveis de ERK ao passo que o grupo N sham apresentou importante diminuição, havendo uma inversão dos níveis destes grupos em relação ao 2° dia ($p=0,0001$). Quanto aos

diabéticos, houve aumento nos níveis de ERK de ambos os grupos, e o DM F1 apresentou-se superior em relação ao DM sham ($p=0,0017$) (Figuras 47, 48 e 52).

No 14º dia, o grupo N sham voltou a aumentar o nível de ERK e o grupo N F1 voltou a diminuir, retornando ao perfil semelhante ao 2º dia, com o grupo N sham apresentando superior nível de ERK em relação ao N F1 ($p=0,0016$). Já em relação aos diabéticos, o DM F1 apresentou importante aumento em relação ao 7º dia, diferenciando estatisticamente do grupo DM sham ($p=0,0001$) (Figuras 47, 48 e 52).

No 21º dia, os grupos não diabéticos mantiveram semelhantes os níveis de ERK em relação ao 14º dia ($p=0,0330$), enquanto ambos os grupos diabéticos apresentaram importante redução, sobretudo o grupo DM F1, assemelhando-se do DM sham ($p>0,05$) (Figuras 47, 48 e 52).

Figura 47 – Quantificação das proteínas **IRS**, **AKT**, **SHC** e **ERK** (por imunoistoquímica) das úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 48 – Evolução das proteínas **IRS**, **AKT**, **SHC** e **ERK** nas úlceras dérmicas tratadas topicamente com gel de CMC com (grupo F1) e sem a proteína F1 (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 49 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para IRS** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 50 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para AKT** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 51 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para SHC** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Figura 52 – Fotomicrografia de marcação **imunoistoquímica para ERK** das áreas ulceradas tratadas topicamente com gel de CMC com a proteína F1 (grupo F1) e sem (sham) em animais diabéticos (**DM**) e não diabéticos (**N**), por 2, 7, 14 e 21 dias de seguimento.

Discussão

*“Escrever é fácil: você começa com uma
letra maiúscula e termina com um ponto final.
No meio você coloca as idéias.”*
_ Pablo Neruda

5 DISCUSSÃO

Úlceras cutâneas constituem um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo. A situação agrava-se quando estas úlceras não cicatrizam de forma e tempo esperados, levando à sua cronicidade. Estima-se que em torno de seis milhões de pessoas sofram de desordens na cicatrização de úlceras (RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011).

O processo de cicatrização é extremamente complexo e caracterizado por uma série progressiva de eventos celulares, moleculares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade mecânica e função barreira da pele (SCHULTZ et al., 2011).

Estudos para a melhor compreensão das fases do processo cicatricial, assim como, a busca por alternativas para o tratamento dos pacientes são constantes e incessantes. Muitos produtos naturais são conhecidos por apresentar propriedades cicatrizantes, baseadas no conhecimento popular e evidências científicas (RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011).

Dentre esses produtos naturais destaca-se o látex da seringueira *Hevea brasiliensis* utilizada por Frade, et al., 2004 como curativo de úlceras de indivíduos com diabetes associadas à comorbidades e complicações. A biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* atuou nas fases da cicatrização, removendo tecido necrótico (desbridamento), estimulando a proliferação e granulação tecidual (angiogênese) e também a reepitelização, diferente dos achados de Frade (2003) e Frade et al. (2005) em pacientes não diabéticos, o qual não foi constatada clinicamente a reepitelização total da úlcera.

Com isso, tornou-se importante o estudo do real mecanismo de ação do látex (F1) em úlceras de ratos induzidos ao diabetes, estudo das modificações teciduais a partir da análise imunoistopatológica, citotoxicidade do látex em cultura

de fibroblastos NHI-3T3 e queratinócitos humanos e finalmente o estudo do estresse celular e do sistema de defesas antioxidantes.

Estudos de Mendonça, 2004 e 2010, sobre atividade cicatrizante em úlceras dérmicas confeccionadas em orelhas de coelhos tratadas com diferentes concentrações de F1, confirmaram ser a concentração de 0,01% de F1 a mais eficiente em estimular o fechamento da úlcera em menor tempo.

Para avaliar a citotoxicidade, diferentes concentrações da proteína F1 (50,0; 25,0; 10,0; 5,0 e 2,5 µg/mL) foram usadas em cultura de fibroblastos NHI-3T3 e queratinócitos humanos (ambos por 24 horas). Dentre as concentrações da proteína F1 testadas a concentração de 10,0 µg/mL (0,01%) correspondeu a que foi veiculada no gel de carboximetil-celulose 4% para aplicação tópica nas úlceras dos animais.

Os fibroblastos em cultura por 24 horas com as diferentes concentrações da proteína F1 (especificamente a de 10,0 µg/mL) apresentaram baixa citotoxicidade (menor que 8%) além de apresentarem semelhantes entre si. A concentração de 10,0 µg/mL apresentou 6,8% de citotoxicidade, diferente do controle negativo com 95,1% de citotoxicidade.

Quando em cultura de queratinócitos por 24 horas todas as concentrações de F1 testadas apresentaram-se semelhantes entre si, apesar de mais citotóxicas (de 64,2% à 71,1%) que quando em cultura com fibroblastos. A concentração de 10,0 µg/mL apresentou 67,9% de citotoxicidade, diferente do controle negativo com 94,5% de citotoxicidade.

Lönnroth (2005) realizou o método MTT em estudos de citotoxicidade de um extrato de luva de látex em cultura de fibroblastos L929 por 4 horas. Foi considerado a citotoxicidade baseando-se na viabilidade celular do controle positivo e classificou como: citotoxicidade severa (viabilidade 30% menor que a do controle positivo), moderada (viabilidade de 30% a 60% em relação a do controle positivo), leve (viabilidade de 60% a 90%) e sem citotoxicidade (maior que 90% de viabilidade). Os resultados apontaram citotoxicidade severa do extrato testado.

Assim, considerando o percentual de viabilidade proposto por Lönnroth (2005), a fração F1 mostrou-se sem citotoxicidade quando em culturas de fibroblastos, porem apresentou citotoxicidade moderada quando em culturas de queratinócitos, provavelmente relacionada a não padronização do teste de citotoxicidade a partir de células de culturas primárias como queratinócitos, diferente das células imortalizadas como fibroblastos 3T3.

Oliveira et al. (2007) avaliaram a atividade citotóxica de 10 µg/mL de proteínas laticíferas do látex da planta medicinal *Calotropis procera* em células mononucleares saudáveis do sangue periférico (PBMC). De 24 à 72 horas em cultura não houve algum efeito visíveis sobre a viabilidade ou morfologia celular. No entanto, aumentando a concentração para 25 µg/mL o número e morfologia das PBMC foram alterados com 48 horas de cultura. Adicionalmente, Choedon (2006) avaliaram que o *Calotropis procera* mostrou-se importante na terapia anti-cancer por apresentar citotoxicidade às células cancerígenas sem alterar a via regular da apoptose. Esses achados diferem em relação aos encontrados no teste de citotoxicidade da proteína F1 da seringueira *Hevea brasiliensis*, confirmando maior segurança de seu uso no leito de úlceras e como estimulador da cicatrização.

Diante da segurança comprovada da proteína F1, aliada às constatações clínicas de melhor reepitelização nos pacientes com diabetes, a avaliação de sua eficácia na cicatrização no modelo experimental de diabetes se mostrou indispensável no esclarecimento do seu real mecanismo de ação.

O modelo de diabetes por streptozotocina (45 mg/Kg) em ratos demonstrou-se eficaz 15 dias após a injeção, tanto clinicamente (poliúria e polidipsia) quanto pelas glicemias inicial e final elevadas (425,7 mg/dL / 441,19 mg/dL) diferente dos animais não diabéticos (118 mg/dL/ 125,42 mg/dL).

Apikoglu-Rabus et al. (2009) em seu estudo com ratos *Sprague-Dawley* obtiveram ratos diabéticos que se apresentaram emagrecidos frente aos não diabéticos. No presente estudo com ratos Wistar diabéticos, pouca diferença no peso corporal foi encontrada. Entretanto, o estado hiperglicêmico dos animais foi

fundamental para o estabelecimento do diabetes o qual foi garantido até o final do experimento, assim como o estado normoglicêmico dos não diabéticos.

Além da glicemia, diferenças importantes foram constatadas na pele dos animais diabéticos quando comparadas à pele dos não diabéticos, como maior quantidade de células inflamatórias, maior expressão de oncostatina M e seu receptor, maior produção de óxido nítrico (NO) e lipoperóxidos de membranas, dosados por quimiluminescência, embora com menor expressão de iNOS, baixa quantidade de MDA, FOX e GSH, além de níveis de MPO e TRAP semelhantes aos dos animais não diabéticos.

Cabe ressaltar o fato da quantidade de proteínas totais nos animais diabéticos ser estatisticamente superior em relação à dos não diabéticos ($p=0,0045$) estar diretamente relacionada ao maior influxo de células inflamatórias na pele diabética, sobretudo neutrófilos, o que também se relaciona à maior quantidade de OSM e OSMR- β nos animais diabéticos.

Foi evidenciada importante ação da OSM no recrutamento de infiltrado de neutrófilos (GOREN et al., 2006). Adicionalmente, o microambiente na pele do animal diabético com quadros de hiperglicemia e resistência insulínica permite maior influxo de neutrófilos além de estimular a produção de ROS e RNS pelas membranas celulares. Os neutrófilos recrutados são estimulados, seguido da ativação do sistema NAD(P)H oxidase, gerando uma série de espécies reativas (GUARATINI et al., 2007).

Neste contexto, a quantidade de NO produzida juntamente com o nível de lipoperoxidação nas membranas celulares apontam nível importante de produção de ROS e RNS pelos neutrófilos na pele dos animais diabéticos, apesar dos níveis mínimos de iNOS e a quantidade de MPO semelhante aos animais não diabéticos.

Estudos apontam que os níveis de peroxidação lipídica estão elevados em indivíduos com DM1 e DM2. Altos níveis de superóxido foram encontrados no plasma de camundongos diabéticos induzidos por STZ em relação ao camundongo controle (MATSUMOTO et al., 2003). Por outro lado, nível de GSH, GPx e catalase

estava diminuída em eritrócitos ou plasma de DM1 e DM2 (DAVE; KALIA 2007), o que corrobora com os resultados dos animais diabéticos em relação aos não diabéticos.

Significativamente, os animais diabéticos apresentaram menor quantidade de vasos sanguíneos na pele comparado aos não diabéticos, sugerindo haver influência significativa da patologia do diabetes na quantidade de vasos sanguíneos da pele. Adicionalmente, essas diferenças pareceram se relacionar às expressões de VEGF e eNOS na pele.

Várias são as mudanças que o diabetes pode causar na modulação da angiogênese. Mudanças no rolamento de neutrófilos ou na própria função do macrófago como fagocitose, *bust* respiratório, produção e liberação de citocinas e metabólitos do ácido araquidônico (COSTA PINTO et al., 2002).

A deficiência na microcirculação ocorre precocemente no diabetes. Essa anormalidade inclui redução do tamanho do capilar, espessamento da membrana basal, que interfere com mudança fisiológica e altera a migração do leucócito (contribuindo para infecção), diminuição da hiperemia e capacidade auto regulatória anormal. Função endotelial prejudicada pode envolver uma redução da eNOS (FALANGA, 2005).

A quantidade de fibroblastos existente na pele dos animais diabéticos foi levemente mais elevada à existente na pele dos não diabéticos, semelhante ao observado quanto à percentagem de colágeno nas secções histológicas coradas com tricrômio de Gomori, porém ambos sem diferença estatística. No entanto, essas diferenças parecem não estar relacionadas à expressão de TGF- β 1 cuja expressão foi menor nos animais diabéticos. Quanto ao IGF, notou-se primeiramente, níveis bastante reduzidos em ambos os grupos diabéticos e não diabéticos, além de se apresentarem semelhantes entre si.

Células residentes em úlceras diabéticas são fenotipicamente alteradas. Alguns estudos apontam que fibroblastos isolados de úlceras de pessoas diabéticas são praticamente senescentes e apresentam uma diminuição na resposta proliferativa e produção de fatores de crescimento. Estudos semelhantes em outros tipos de

úlceras crônicas estão em acordo com esses achados tendo mostrado redução da resposta ao TGF- β , PDGF e outras citocinas (FALANGA, 2005).

Por fim, quanto aos marcadores da cascata da insulina, todos os quatro testados (IRS, AKT, SHC, ERK) apresentaram níveis superiores nos animais não diabéticos, estatisticamente diferentes dos animais diabéticos. Esses achados corroboram com o mecanismo de sinalização do diabetes, ou seja, na falta da insulina (diabetes tipo 1) essas vias de sinalização não são expressas como nos animais não diabéticos.

Sabe-se que um camundongo *knock-out* para IRS-1 desenvolve resistência insulínica mas não se torna diabéticos presumivelmente devido à compensação das células β -pancreáticas (PESSIN et al., 2000).

Na avaliação da eficácia da fração F1 do látex na cicatrização das úlceras cutâneas, foi observado que os grupos tratados com F1 (N F1 e DM F1) apresentaram infiltrado inflamatório maior que nos grupos sham (N sham e DM sham, respectivamente), no 2° e 7° dias. Da mesma forma pode-se observar que os grupos diabéticos (DM sham e DM F1) apresentaram maior infiltrado inflamatório que os grupos não diabéticos (N sham e N F1), no 2° e 7° dias, o que corrobora aos achados do estudo sobre a pele do rato diabético sem tratamento. No entanto, a maior quantidade de infiltrado inflamatório no grupo DM F1 certamente foi relacionada à associação entre o efeito do diabetes e da proteína F1 no recrutamento de células inflamatórias para o local da úlcera.

Os dias iniciais do processo cicatricial (2° e 7° dias) representam a fase inflamatória da cicatrização, com recrutamento de células inflamatórias, desbridamento, fagocitose de células senescentes (neutrófilos), formação do tecido de granulação (angiogênese) e produção de citocinas e fatores de crescimento que estimulam as fases subsequentes (14° e 21° dias) pró-fibrótica e de remodelagem, com consequente diminuição (regulação) das células inflamatórias no sítio lesado. Nesta fase acontecerá a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno,

transformação da matriz extracelular provisional em matriz definitiva de colágeno, e a total reepitelização (SCHULTZ et al., 2011).

Em todos os grupos foi observada importante regulação das células inflamatórias para o local da úlcera no 14° e 21° dias, sendo mais evidente no grupo N sham. A fase inicial da cicatrização (2° dia) compete principalmente ao infiltrado neutrofílico. À partir deste momento, começam a ser recrutados maiores quantidades de macrófagos a fim de darem continuidade à atividade desbridante iniciada pelos neutrófilos (SCHULTZ et al., 2011).

No estudo, o infiltrado inflamatório no 2° dia de cicatrização das úlceras dos diferentes grupos parece ser essencialmente neutrofílico principalmente na presença da biomembrana de látex, fato demonstrado por Andrade et al. (2011).

À análise por citometria de fluxo, observou-se que o grupo DM F1 apresentou o mesmo perfil de evolução que o grupo N Sham em todos os dias de seguimento quanto aos percentuais de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ e consequente relação $CD4^+/CD8^+$, além dos macrófagos ($CD11b^+$). Exceção feita apenas para as células $CD8^+$ no segundo dia de avaliação, quando o grupo DM F1 apresentou maior percentual de células $CD8^+$ em relação aos demais. Esses achados indicam uma provável interação entre a proteína F1 do látex e as alterações celulares/teciduais envolvidas no processo de cicatrização das úlceras quando associadas ao diabetes *mellitus* igualando-se ao mesmo processo ocorrido na cicatrização do grupo N sham.

A análise de proteínas totais relaciona-se em grande parte com o infiltrado inflamatório exacerbado, sobretudo no grupo DM F1, até o 7° dia. Após este tempo de seguimento, outras proteínas estariam envolvidas, como por exemplo o colágeno.

Quanto à análise de iNOS, determinada por imunistoquímica, percebeu-se que a proteína F1 em animais diabéticos no 2°, 7° e 14° dias, produziu intensa inflamação com níveis superiores de iNOS em relação a ambos os DM sham. No entanto, este perfil reduz bastante no 21° dia. Adicionalmente, percebeu-se que o grupo N sham também acompanha o grupo DM F1 quanto ao nível de iNOS durante o seguimento (exceto no 7° dia), embora em níveis inferiores ao DM F1 (até o 7° dia).

Esse perfil é concordante ao observado quanto à celularidade do infiltrado inflamatório acima descrito.

Semelhante fenômeno inflamatório foi constatado com a expressão de oncostatina M (OSM) e seu receptor OSMR- β no 2° ao 14° dias com grupo DM F1 estatisticamente superior em relação ao grupo DM sham, e consequente diminuição somente no 21° dia. Diferentemente, na expressão de OSM no grupo DM F1 se apresentou diferente ao N sham somente no 7° e 21° dias.

Goren et al. (2006) evidenciaram uma relação entre a OSM e o infiltrado de PMN em úlceras agudas. Além disso, demonstraram a participação de uma leptina que melhorou a cicatrização de úlceras em indivíduos diabéticos crônicos e foi associada com a baixa quantidade de PMN e expressão da OSM na úlcera. Assim, este estudo forneceu evidências de que a expressão desregulada da OSM é funcionalmente relacionada à infiltração PMN na lesão e associada à dificuldade cicatricial das feridas em condições cronicamente inflamadas (GOREN et al., 2003). Neste contexto, a expressão de OSM certamente seria um dos fatores que explicariam o desempenho evidente do látex (F1) na cicatrização quando associado com o diabetes.

Mais uma vez pode-se afirmar que a proteína F1 associada ao diabetes aumentou consideravelmente a resposta inflamatória nos dias iniciais da cicatrização (2° e 7° dias) apresentando um importante controle da resposta inflamatória nos dias subsequentes do processo cicatricial (14° e 21° dias).

Quanto aos animais não diabéticos, foi observado no 2° e 7° dias que o F1 foi capaz de aumentar o recrutamento de células inflamatórias para o local da úlcera, apesar da baixa expressão de iNOS e OSM. No entanto, não foi observado o aumento da expressão de iNOS, a qual permaneceu inferior a do grupo N sham até o 21° dia. Quanto ao receptor de OSM (OSMR- β), sua expressão foi bastante semelhante ao de OSM, podendo afirmar que os efeitos de F1 e do diabetes na fase inflamatória como um todo, principalmente para a OSM, também interfere diretamente na expressão de seu receptor, OSMR- β .

Quanto aos marcadores de estresse celular durante o processo de cicatrização, o grupo DM F1, semelhante ao DM sham, apresentou níveis superiores de NO até o 7º dia. Este perfil também está de acordo com a fase inflamatória bem como com os níveis de iNOS. Quanto ao grupo N F1, os níveis foram semelhantes e inferiores ao grupo N sham até o 14º dia. Este perfil também relaciona-se com a fase inflamatória e os níveis de iNOS.

A MPO está presente principalmente em neutrófilos (um monócito contém 1/3 de toda MPO encontrada nos neutrófilos) e por isso indica também o nível de infiltrado neutrofílico na lesão, além de produzir ROS e RNS para eliminação ou inativação do patógeno durante fagocitose pelo neutrófilo.

Pela análise da MPO, percebeu-se que o grupo N F1 foi capaz de recrutar mais neutrófilos para o local da úlcera diferente do DM F1. Sendo assim, pode-se perceber que a proteína F1 em ratos não diabéticos permite o recrutamento de neutrófilos para o leito da úlcera e, conseqüentemente, produção de ROS / RNS para atuação do processo cicatricial em si. Sendo assim, nos animais não diabéticos há altos níveis de MPO, maiores ainda nos associados com F1.

No caso dos animais diabéticos, a própria fisiopatologia do diabetes, como a hiperglicemia e resistência insulínica, permite o recrutamento de neutrófilos e o estresse oxidativo mais exacerbado. Ou seja, a importante produção de ROS e RNS pelo diabetes, favorecendo a cicatrização com F1.

O malondialdeído (MDA) é produto da peroxidação lipídica que foi encontrado em níveis significativamente altos na cicatrização de úlceras debilitadas de ratos tratados com hidrocortisona comparados com os animais controle (GUPTA et al., 2002). Surpreendentemente, entretanto, nenhuma diferença no nível de MDA foi encontrada entre o fluido de úlceras humanas agudas e crônicas (MOSELEY et al., 2004). A peroxidação dos ácidos graxos essenciais (primeiramente o ácido araquidônico) resulta na formação de isoprostanos, que são molecularmente semelhante às prostaglandinas. O grande aumento da concentração do 8-isoprostano foi encontrado no fluido de úlceras venosas crônicas em comparação

com o fluido de úlceras agudas em humanos (YEOH-ELLERTON; STACEY, 2003). Este achado mostra a evidência do estresse celular em úlceras crônicas, resultando na persistência do denso infiltrado inflamatório (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005).

Neste sentido, observou-se que o grupo N sham se destaca por apresentar níveis elevados de MDA e FOX em comparação aos demais grupos durante todo o seguimento. Esses fatores relacionados ao grupo DM F1 se assemelhando ao grupo N sham durante o seguimento se repete quanto ao infiltrado inflamatório, CD11b⁺, CD4⁺, CD8⁺, iNOs, OSM, OSMR- β , NO, MPO, lipoperóxidos de membranas.

Quanto ao estudo da atividade antioxidante por meio do GSH, a F1 associada com o diabetes produziu nível estatisticamente superior em relação ao DM sham já no 2º dia, estando similar ao grupo DM sham no 7º dia e a partir do 14º dia menor em relação ao DM sham. Sendo assim, a proteína F1 nos animais diabéticos pareceu aumentar consideravelmente as defesas antioxidantes já no 2º dia, momento em que houve superior recrutamento de células inflamatórias (principalmente células CD4⁺ e CD8⁺), superior produção de iNOS, NO, lipoperóxidos de membranas, OSM e OSMR- β em relação ao grupo DM sham. No entanto, certamente pode ter sido este excesso de GSH no grupo DM F1 já no 2º dia que impediu o aumento de FOX no 7º dia, embora não tenha conseguido impedir no 2º dia (DM F1 com níveis de GSH estatisticamente superiores aos de DM sham).

A proteína F1 nos animais diabéticos apresentou nível de GSH inferiores aos do grupo DM sham no 14º e no 21º dias, o que se assemelhou ao perfil de FOX. Em relação ao MDA, a única diferença foi que o grupo DM F1 no 7º e 14º dias igualou-se ao nível de DM sham. Sendo assim, pode-se notar que a proteína F1 associada ao diabetes foi importante nas defesas antioxidantes e controle do estresse celular com redução dos níveis de MDA e FOX a partir do 2º dia.

Devido ao fato de os diabéticos apresentarem hiperglicemia e resistência insulínica, essa causa o aumento da produção de ROS em animais diabéticos que foi normalizada pela administração de SOD (REIS et al., 2008). Esses achados confirmam

a associação de diabetes e estresse oxidativo, entretanto, a importância do estresse oxidativo para o diabetes permanece incerta (SHEN, 2010).

Em relação aos animais não diabéticos no 2º dia, o grupo N F1 apresentou níveis de FOX e MDA inferiores em relação ao N sham, estendendo-se neste perfil até o 21º dia em níveis proporcionalmente maiores. Esse fato parece confirmar o efeito da proteína F1 como estimuladora das defesas antioxidantes até mesmo nos animais não diabéticos, muito provavelmente reduzindo os níveis de FOX e MDA em relação ao N sham durante todos os dias de seguimento.

Adicionalmente, os dados do estudo das diferenças da pele entre animais diabéticos e não diabéticos, demonstram níveis estatisticamente inferiores de GSH nos animais diabéticos em relação aos não diabéticos. No entanto, a proteína F1 no tratamento das úlceras diabéticas parece proporcionar melhor eficiência no reconhecimento da GSH e sua atividade antioxidante com consequente diminuição dos níveis de MDA e FOX em relação aos grupos N sham e DM sham, por isso, a sua baixa expressão em relação demais.

A respeito da angiogênese, o fenômeno de menor número de vasos encontrado na pele sem tratamento dos animais diabéticos se inverteu significativamente apenas na avaliação cicatricial do 2º dia, o que pode estar relacionado à resposta inflamatória exagerada nesses animais como visto no maior infiltrado de células inflamatórias (CD11b⁺, CD4⁺ e CD8⁺) para o local da úlcera já no 2º dia, fenômeno corroborado pelos achados de Andrade et al. (2011) em relação aos implantes da biomembrana de látex. Essas células inflamatórias certamente atuaram intensamente na produção de citocinas e fatores de crescimento, evidentemente favorecendo as fases subsequentes da cicatrização como também proposto por Imamura et al. (2004). No entanto, as características iniciais de menor número de vasos dentre os diabéticos se estabelece durante todo o restante do seguimento, exceto quando associada ao tratamento com F1 na avaliação do 14º dia quando foi observada evolução ascendente semelhante ao grupo N sham. Apenas no 21º dia

pareceu prevalecer as características do diabetes com diminuição importante do número de vasos.

O elevado e persistente nível de angiogênese no grupo N sham a partir do 7º dia parece estar relacionado ao intenso estresse celular encontrado nesse também a partir do 7º dia com altos níveis de MDA e FOX, além dos altos níveis de GSH.

A proteína F1 reduziu levemente a expressão de VEGF do 2º ao 14º dia de tratamento das úlceras diabéticas (DM F1), enquanto no tratamento das não diabéticas (N F1) a expressão de VEGF foi significativamente menor nesse período. Isso parece estar relacionado diretamente ao elevado infiltrado inflamatório encontrado no grupo DM F1 durante o mesmo período, diferente significativamente dos demais grupos. Seguimento semelhante ao VEGF também foi observado quanto à expressão da enzima eNOS do 2º ao 14º dia, diferenciando-se apenas no 21º dia quando houve manutenção de VEGF e de eNOS.

Além das enzimas relacionadas à produção de NO, outro dado importante foi a detecção direta de NO tecidual por quimiluminescência, a qual foi pronunciada no grupo DM F1 do 2º ao 14º dia, superior ao N sham, fenômeno que também se inverteu significativamente no 21º dia de seguimento.

O fenômeno angiogênico, tanto pelo número de vasos quanto pela expressão de VEGF, assemelhou-se no 21º dia o que pode estar relacionado diretamente a melhor reepitelização das úlceras cutâneas. A expressão de VEGF tem implicação direta na permeabilidade vascular e manutenção da umidade do leito ulcerado o que poderia influenciar negativamente na reepitelização, tendo em (BATES et al., 2003).

O estudo da reepitelização, analisada pelo seguimento dos índices de cicatrização (ICU), mostrou que o grupo N sham teve suas úlceras mais reepitelizadas que as do grupo N F1 no 2º dia, cujas úlceras tiveram suas áreas aumentadas. proteína F1 quando aplicada nas úlceras dos animais diabéticos (DM F1) houve cicatrização semelhante ao grupo N sham no 2º dia de avaliação. Esse perfil estendeu-se ao 7º dia, no qual o grupo N sham apresentou índice de cicatrização

superior em relação ao grupo N F1. A partir do 14º dia, não houve mais diferença estatística entre os grupos em questão, embora o grupo N sham ainda continuava a ter reepitelização mais evidente que o grupo N F1.

No entanto, quando F1 foi aplicada nas úlceras dos animais diabéticos (DM F1), essa promoveu melhor cicatrização que as do seu grupo sham (DM sham) e principalmente melhor que as do grupo N F1 durante todo o seguimento. Provavelmente, esse perfil cicatrizante da proteína F1 quando associada ao DM esteja relacionado ao importante infiltrado inflamatório recrutado para o leito destas úlceras, aumento na produção de OSM, OSMR- β , VEGF, IGF, iNOS e eNOS com consequente aumento de óxido nítrico (NO), aliado ao baixo estímulo do estresse celular pelos baixos níveis de lipoperóxidos de membranas, MDA e FOX, seguidos de nível importante de GSH e TRAP em relação ao DM sham no 2º dia, fatores que parecem interferir positivamente na velocidade de cicatrização das úlceras dos animais do grupo DM F1.

A análise histomorfométrica da fibroplasia demonstrou uma tendência fibrogênica relacionada ao diabetes *mellitus*, no entanto, paradoxalmente, a doença inibiu significativamente a colagênese. A proteína F1, quando aplicada às úlceras dos animais diabéticos (DM F1), promoveu intenso recrutamento e proliferação de fibroblastos para o local da úlcera, maior que nos não diabéticos (N F1), além de amplificar significativamente a produção colagênica.

Quanto ao TGF- β 1, determinado por imunoistoquímica, novamente se assemelham os grupos DM F1 e N sham no 2º e 14º dias. O grupo DM F1 apresentou superior nível de TGF- β 1 em relação ao DM sham até o 14º dia. Notou-se também, expressão reduzida dentro os grupos não diabéticos.

Correlacionando a expressão de TGF- β 1, fibroplasia e colagênese, foi observado que dentre os grupos não diabéticos foi observado que no grupo sham houve alta expressão de TGF- β 1 e baixa fibroplasia com alta colagênese em sua úlceras, no entanto, quando tratadas com F1, houve aumento da expressão de TGF- β 1 com consequente aumento do estímulo à fibroplasia, seguida da baixa da

colagênese. Esses achados corroboram aos publicados por Andrade et al. (2011), no qual os autores relatam não haver relação da expressão de TGF- β 1 com a colagênese e fibroplasia desencadeadas pelos implantes de biomembrana de látex em camundongos, estando esses fenômenos mais relacionados com o estímulo inflamatório que à expressão de TGF- β 1 segundo Sisco (2007) e Imamura et al. (2004).

Nos grupos diabéticos houve elevada expressão de TGF- β 1 com alta fibroplasia e pobre colagênese. Entretanto, quando as úlceras foram tratadas com F1 (DM F1), observou-se diminuição significativa de TGF- β 1 com elevada fibroplasia e colagênese, dados que sugerem provável influência da proteína F1 no estado diabético das úlceras durante a cicatrização observada no grupo DM F1. Essas modificações parecem se relacionar diretamente a mais rápida e melhor qualidade da cicatrização das úlceras dos animais diabéticos frente à proteína F1, diferente dos indivíduos não diabéticos, o que é concordante às observações clínicas de Frade et al. (2004).

A proteína F1 aumentou a expressão de IGF nas úlceras dos animais diabéticos (DM F1) durante o seguimento, exceto no 21º dia, tendo um desempenho também semelhante ao encontrado no grupo N sham. Cabe ressaltar que a expressão de IGF foi similar à expressão de TGF- β 1 dentre os grupos DM F1 e N sham, o que pode ter relação direta com a colagênese e fibroplasia.

Quanto às proteínas da sinalização da insulina, pode-se notar que as 4 possuem perfis bastante semelhantes, além da detecção bastante reduzida de IRS em todos os grupos, principalmente no N F1 e DM sham em todos os dias de seguimento. Mais uma vez o grupo DM F1 assemelha-se ao N sham em todos os tempos de seguimento.

Quanto ao AKT o grupo N F1 destacou-se com nível inferior em todos os tempos de seguimento, ao passo que o grupo DM F1 destacou-se superior em todos os tempos de seguimento, exceto no 21º dia. Já o grupo N sham apresentou nível superior no 2º dia e em seguida se assemelhou a este perfil no 14º dia.

Quanto ao SHC, DM F1 apresentou-se semelhante ao N sham, enquanto que o DM F1 manteve-se superior aos demais grupos, que reduziram consideravelmente. Por fim, todos se igualaram o nível de SHC no 21º dia.

Quanto ao ERK, apresentou perfil bastante semelhante ao do IRS no 2º dia. O grupo DM F1 apresentou aumento gradativo até o 14º dia, reduzindo consideravelmente no 21º dia, diferente do DM sham, semelhante ao N F1, que teve poucas variações dentre os dias. Já o N sham iniciou o 2º dia superior à todos os grupos, reduziu no 7º e voltou a aumentar no 7º dia de seguimento.

Conclusões

*"É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas a graça das graças é não desistir nunca."
_ Helder Câmara*

6 CONCLUSÕES

- ✚ A proteína F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* apresentou-se atóxica frente aos fibroblastos NHI-3T3 e queratinócitos humanos, oferecendo maior segurança a ser utilizada no leito de úlceras;

MODIFICAÇÕES TECIDUAIS NA PELE (SEM TRATAMENTO):

- ✚ Os animais diabéticos apresentaram maior recrutamento de células inflamatórias;
- ✚ Maior dano oxidativo com níveis baixos de GSH;
- ✚ Menor quantidade de vasos;
- ✚ Não diminuiu a quantidade de fibroblastos nem de colágeno (apesar da expressão diminuída de TGF- β 1);
- ✚ Houve redução importante dos sinalizadores intracelulares da insulina.

MODIFICAÇÕES TECIDUAIS NAS ÚLCERAS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM F1 EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS:

- ✚ Os efeitos da F1 no recrutamento de células inflamatórias para o local da úlcera pareceram se somar aos efeitos do diabetes, assemelhando-se à cicatrização normal (N sham);
- ✚ A maior expressão de OSM e OSMR- β relaciona-se com maior recrutamento de células inflamatórias, aumentando o estresse oxidativo com superior produção de NO e iNOS até o 14º dia;

- ✚ F1 parece apresentar leve atividade antioxidante quando associada ao diabetes além de modular o estresse celular a ser semelhante ao de um processo cicatricial sem comprometimentos patológicos;
- ✚ F1 associada ao diabetes atua ativamente no aumento da expressão de VEGF e eNOS influenciando na formação do tecido de granulação mais evidente e potencializando a reepitelização.
- ✚ Enfim, o maior recrutamento de células inflamatórias, o maior estímulo à produção de citocinas e fatores de crescimento, o estresse oxidativo desencadeado até o 14º dia e o importante estímulo à fibroplasia e colagênese bem como a importante ativação da sinalização da insulina, outrora diminuída nos diabéticos, foram fatores essenciais que permitiram a total reepitelização das úlceras cutâneas tratadas com F1 nos ratos diabéticos.

*Referências**

*“Bem-aventurado o homem que suporta a provação;
no final receberá a recompensa que o Senhor prometeu.”*
_ **Tiago 1:12**

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.S.; MARQUES, M.E.A. Histologia da pele normal. In: JORGE, S.A.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 17-29.
- ALEXIS, A. F.; JONES, V. A.; STILLER, M. J. Potential therapeutic applications of tea in dermatology. **Int J Dermatol**. 1999 Oct;38(10):735-43
- ANDRADE, T. A.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.
- ANDRADE, T. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na indução de neoformação tecidual em camundongos**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- APIKOGLU-RABUS, S.; IZZETTIN, F.V.; TURAN, P.; ERCAN, F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 2, p. 180-185, 2009.
- ARAUJO, E. P. et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1428-1437, 2005.
- BATES, D. O., JONES, O. P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **Lower Extremity Wounds**, v.2, n.2, p.107-120. 2003.
- BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinica correlation with cellular and molecular events. **Dermatological Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.
- BEAK, S. M.; PAEK, S. H.; JAHNG, Y.; LEE, Y. S.; KIM, J. A. Inhibition of UVA irradiation-modulated signaling pathways by rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, in human keratinocytes. **Eur J Pharmacol**. 2004 Sep 13;498(1-3):19-25.
- BEANES, S.R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 5, p. 1-11, 2003.
- BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis: **J Infect Dis**, v.182, n.1, p.214-223. 2000.
- BIALY, T. L.; ROTHE, M. J.; GRANT-KELS, J. M. Dietary factors in the prevention and treatment of nonmelanoma skin cancer and melanoma. **Dermatol Surg**. 2002 Dec;28(12):1143-52.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informações sobre Mortalidade**. 2008. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 08 ago. 2010.
- BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, 1219-1222, 2007.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 117, p.1e-S-32e-S, 2006b.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. A brief history of wound care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 117, p. 6S-11S, 2006a.
- BUEGE, J.; AUST, S. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURTON, G. W.; TRABER, M. G.; ACUFF, R. V.; WALTERS, D. N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L.; INGOLD, K. U. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am J Clin Nutr**. 1998 Apr;67(4):669-84
- CAETANO, K.S.; FRADE, M.A.C.; MINATEL, D.G.; SANTANA, L.A.; ENWEMEKA, C.S. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine & Laser Surgery**, Larchmont, v. 27, p. 111-118, 2009.
- CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circ Res**, v. 106, n. 10, p. 1559-1569, 2010.
- CHETTIBI, S.; FERGUSON, M.W.J. Wound repair: an overview. In: GALHN, J.I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation basic principles and clinical correlates**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 865-881.
- CIGHETTI, G. et al. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. **Anal Biochem**, v. 266, n. 2, p. 222-229, 1999.
- CLARK, R.A.F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 127, p. 1018-1029, 2007.
- COLADO SIMÃO A. N., SUZUKAWA A. A., CASADO M. F., GUARNIER F. A., et al., Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane), **Life Sci**. 78 (2005) 1202-1210.
- CORDOVA, C. A.; SIQUEIRA, I. R.; NETTO, C. A.; YUNES, R. A.; VOLPATO, A. M.; CECHINEL-FILHO, V.; CURI-PEDROSA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Protective

properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. **Redox Rep.** 2002;7(2):95-102.

CORSETTI, G.; D'ANTONA, G.; DIOGUARDI, F.S.; REZZANI, R. Topical application of dressing with aminoacids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta histochemica**, Jena, v. 112, n. 5, p. 497-507, 2009.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, v. 9, p. 283-289, 2004.

DOUGHTY, D.B.; SPARKS-DeFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds: current management concepts**. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap. 4, p. 63-82.

EISENBARTH, G.S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, n. 21, p. 1360-1368, 1986.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**, v. 366, n. 9498, p. 1736-1743, 2005.

FEOLI, A. et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **J Nutr**, v. 136, n. 9, p. 2357-2361, 2006.

FIERRO, I. M. et al. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. **Immunology**, v. 89, n. 2, p. 295-300, 1996.

FIERRO, I. M.; NASCIMENTO-DASILVA, V.; ARRUDA, M. A.; FREITAS, M. S.; PLOTKOWSKI, M. C.; CUNHA, F. Q.; BARJA-FIDALGO, C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. **J Leukoc Biol**, v.65, n.4, p.508-514. 1999.

FRADE MA, COUTINHO NETTO J, GOMES FG, MAZZUCATO EL, ANDRADE TA, FOSS NT. Natural-biomembrane dressing and hypersensitivity. **An Bras Dermatol**. 2011 Sep-Oct;86(5):885-91

FRADE MAC, ASSIS RVC, COUTINHO-NETTO J, ANDRADE TAM, FOSS NT. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **An Bras Dermatol**. 2012;87(1):45-51.

FRADE, M. A.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N.T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Med Cutan Iber Am**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.

FRADE, M.A.C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164 f. (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M.A.C.; CURSI, I.B.; ANDRADE, F.F.; CASEMIRO, S.S.; RIBEIRO, W.S.; SANTOS, S.V.; FOSS, N.T. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 41-46, 2005.

GALIANO, R.D. et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. **Am J Pathol**, v. 164, n. 6, p. 1935-1947, 2004.

GALKOWSKA, H. et al. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. **Wound Repair Regen**, v. 14, n. 5, p. 558-565, 2006.

GARCIA R.M. Descoberta aponta novo uso para o látex: reconstrução óssea. Maringá: 2009. Disponível em: <http://www.dentalpress.com.br/v5/noticias.php?id=5768>> Acesso em: 21 jan. 2011.

GARY SIBBALD, R.; WOO, K. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, p. S25-S30, 2008. Supplement 1.

GIBRAN, N. S. et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. **J Surg Res**, v. 108, n. 1, p. 122-128, 2002.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A. C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res**. 2001 Nov;34(11):1487-94.

GONÇALVES, R. et al. Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal. **Rev. Col. Bas. Cir.**, v. 30, n. 4, p. 286-292, 2003.

GONZALEZ-FLECHA, S. LLESUY, A. BOVERIS, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, **Free Rad. Biol. Med.** 10 (1991) 93-100.

- GOREN, I. et al. Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 3, p. 628-637, 2006.
- GUARNIER H. A. CECCHINI A. L.,SUZUKAWA A. A., et al., Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor, **Muscle Nerve**, 42 (2010) 950-958.
- GUPTA, A. et al. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. **Mol Cell Biochem**, v. 241, n. 1/2, p. 1-7, 2002.
- GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, London, v. 453, n. 15, p. 314-321, 2008.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in biology and medicine, 3rd ed., Oxford Science Publications: **Oxford**, 1998.
- HARDING, K.G.; PATEL, M.G.K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, London, v. 324, p. 160-163, 2002.
- HEINRICH, P. C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**, v. 374, Pt 1, p. 1-20, 2003.
- HOWELL-JONES, R.S.; WILSON, M.J.; HILL, K.E.; HOWARD, A.J.; PRICE, P.E.; THOMAS, D.W. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 55, p. 143-149, 2005.
- ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**. 2003 Jul 15;189(1-2):21-39
- IHN, H.; TAMAKI, K. Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **J Immunol**, v. 165, n. 4, p. 2149-2155, 2000.
- IMAMURA, M.; OGAWA, T.; SASAGURI, Y.; CHAYAMA, K.; UENO, H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. **Gastroenterology**, v. 128, p. 138-146, 2005.
- JAU, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 224-226, 2009.
- JIANG, Z. et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal Biochem**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

- KARUKONDA, S.R.K.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; MCBURNEY, E.I.; RUSSO, G.; MILIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing: part 1. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 39, p. 250-257, 2000.
- KATIYAR, S. K.; MATSUI, M. S.; ELMETS, C. A.; MUKHTAR, H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. **Photochem Photobiol.** 1999 Feb;69(2):148-53
- KIKUCHI K, NAGANO T, HAYAKAWA H et al. Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H₂O₂ system. **Anal Chem** 1993; 65: 1794-99.
- KIKUCHI K, NAGANO T, HAYAKAWA H, et al. Real time measurement of nitric oxide produced ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. **J Biol Chem** 1993; 268: 23106-110.
- KIM, S. J. Effect of biflavones of *Ginkgo biloba* against UVB-induced cytotoxicity in vitro. **J Dermatol.** 2001 Apr;28(4):193-9.
- KIM, S. J.; LIM, M. H.; CHUN, I. K.; WON, Y. H. Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. **Skin Pharmacol.** 1997;10(4):200-5.
- KING BA, OH DH. Spatial control of reactive oxygen species formation in fibroblasts using two-photon excitation. **Photochem Photobiol.** 2004 Jul-Aug;80:1-6.
- KOHEN, R.; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. **Arch Gerontol Geriatr.** 1997 Mar-Apr;24(2):103-23.
- KOKANE, D.D.; MORE, R.Y.; KALE, M.B.; NEHETE, M.N.; MEHENDALE, P.C.; GADGOLI, C.H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 124, p. 311-315, 2009.
- KROKAN, H. E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G.; DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochem J.** 1997 Jul 1;325 (Pt 1):1-16
- KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças.** 7th. ed. Rio de Janeiro: Saunders, 2005.
- KUNTZ, E. et al. *Cholecystokinin octapeptide*: a potential growth factor for pancreatic beta cells in diabetic rats. **Jop**, v. 5, n. 6, p. 464-475, 2004.
- KVAM E, DAHLE J. Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-A-induced membrane damage. **J Invest Dermatol.** 2003 Sep;121(3):564-9.

- LEIBOVICH, S. J., ROSS, R. The role of the macrophage in the wound repair: **Am J Pathol**, v.78, p.71-100. 1975.
- LEITE SN, JORDÃO JÚNIOR AA, ANDRADE TA, MASSON DDOS S, FRADE MA. Experimental models of malnutrition and its effect on skin trophism. **An Bras Dermatol.**, 2011 Aug;86(4):681-8.
- LIM, J. et al. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2009.
- LIMA E COSTA, M.F.; GUERRA, H.L.; BARRETO, S.M.; GUIMARÃES, R.M. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.9, n.1, p. 23-41, 2000.
- LO, H.C. et al. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. **Life Sci**, v. 78, n. 17, p. 1957-1966, 2006.
- LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G.; WALDMANN, K.; SCHIWECK, S.; LEHNERT, H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, Berlin, v. 45, n. 7, p. 1011-1016, 2002.
- LÖNNROTH EC. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. **Int J Occup Saf Ergon**, v. 11, n. 2, p. 131-139, 2005.
- MALECH, H. L., GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med*, v.317, n.11, p.687-694. 1987.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MANKAD, P.S.; CODISPOTI, M. The role of fibrin sealants in hemostasis. **The American Journal of Surgery**, v. 182, p. 21S-28S, 2001.
- MARBLE, A. et al. **Diabetes mellitus**. 12th. ed. Philadelphia: Lea-Febiger, 1985.
- MAURÍCIO, V. **Aceleração do reparo tissular induzido por uma fração angiogênica purificada do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. 2006. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- MENDONÇA, R. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. 2004. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MENDONÇA, R. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother Res.**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.

MENKE, M.N.; MENKE, N.B.; CECELIA H.; BOARDMAN, C.H.; ROBERT, F.; DIEGELMANN, R.F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 111 p. S87-S91, 2008.

MENKE, N.B.; WARD, K.R.; WITTEN, T.M.; BONCHEV, D.G.; DIEGELMANN, R.F. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 25, p. 19-25, 2007.

MINATEL DG, FRADE MA, FRANÇA SC, ENWEMEKA CS. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med.** 2009 Aug;41(6):433-41

MINATEL, D.G.; FRADE, M.A.C.; FRANCA, S.; ENWEMEKA, C.S. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 41, n. 6, p. 433-441, 2009.

MODUR, V. et al. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. **J Clin Invest**, v. 100, n. 1, p. 158-168, 1997.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing an overview. **Clinics in Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 30, p. 1-12, 2003.

MOON, J.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MORENO SE, ALVES-FILHO JC, BERTOZI G, ALFAYA TM, THEZE J, FERREIRA SH, VARGAFTIG BB: Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. **British journal of pharmacology** 2006, 148(8):1060-1066.

MOSELEY, R. et al. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 4, p. 419-429, 2004.

MOSLEY, B. et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 51, p. 32635-32643, 1996.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **J Immunol Methods**. 1983 65: 55-63.

MRUÉ, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of new biomembrane. **Materials research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

PERES P. S., TERRA V. A., GUARNIER F. A., et al., Photoaging and chronological aging profile: understanding oxidation of the skin, **J. Photochem. Photob. B** 103 (2011) 93-97.

PITZ, H. S. **Caracterização de proteínas provenientes do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*: purificação e avaliação do processo cicatricial e angiogênico.** 2011. 93 f. (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PODDA, M.; ZOLLNER, T. M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M.; THIELE, J. J.; PACKER, L.; KAUFMANN, R. Activity of alpha-lipoic acid in the protection against oxidative stress in skin. **Curr Probl Dermatol**. 2001;29:43-51.

RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANDO, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. **J Ethnopharmacol**, v. 134, n. 2, p. 443-449, 2011.
RANZATO; MARTINOTTI; BURLANDO, 2011

RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L.; OTONKOSKI, T.; LAPATTO, R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochem Pharmacol**. 2002 Apr 1;63(7):1297-304.

REITER, R. J. Antioxidant actions of melatonin. **Adv Pharmacol**. 1997;38:103-17

REPETTO M., REIDES C., CARRETERO M. L., COSTA M., GRIEMBERG G., LIESUY S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 255, p. 107-117, Nov. 1996.

ROLSTAD, B.S.; BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Topical management. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds**: current management concepts. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap. 18, p. 289-306.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; DA SILVA, V. V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B. Pothomorphe umbellata extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochem Photobiol**. 2003 Nov;78(5):436-9.

ROVER,-JR L.; KUBOTA, L. T.; HÖEHR, N.; F. Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for

the analysis of reduced glutathione from serum. **Clin Chim Acta**. 2001 Jun;308(1-2):55-67.

ROY, S. et al. Dermal wound healing is subject to redox control. **Mol Ther**, v. 13, n. 1, p. 211-220, 2006.

SAAD, M.J. **Cicatrização e diabetes**. In: 50 ANOS do Ambulatório de Endocrinologia (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP., 8 dezembro de 2007, Stream Palace. 2007.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SALVADOR, S.L.; MASSON, D.S.; FRADE, M.A. Antimicrobial Activity of *Copaifera langsdorffii* Oleoresin on Streptococcal Species. **Journal of Dental Research**, Alexandria, v.87, Special Issue, p.108, 2008.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTENCOURT, C.F.; ZANETTI, G.D.; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 122, n. 3, p. 523-532, 2009.

SCHULTZ, G.S.; DAVIDSON, J.M.; KIRSNER, R.S.; BORNSTEIN, P.; HERMAN, I.M. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 19, n. 2, p. 134-148, 2011.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SERGEEV, P. V.; UKHINA, T. V.; SHIMANOVSKIĬ, N. L. [Effect of steroid sex hormones on lipid peroxidation and antiperoxide system of glutathione in rat skin tissues]. **Biull Eksp Biol Med**. 1999 Dec;128(12):663-6

SHAI, A; MAIBACH, H.I. Antibiotics, antiseptics and cutaneous ulcers. In: _____. **Wound healing and ulcers of the skin**. Diagnosis and therapy – the practical approach. Germany: Springer, 2005. p. 135-150.

SISCO, M.; CHAO, J. D.; KIM, I.; MOGFORD, J. E.; MAYADAS, T. N.; MUSTOE, T. A. Delayed wound healing in Mac-1-deficient mice is associated with normal monocyte recruitment: **Wound Repair Regen**, v.15, n.4, p.566-571. 2007.

SLOMINSKI, A.; PISARCHIK, A.; SEMAK, I.; SWEATMAN, T.; WORTSMAN, J.; SZCZESNIEWSKI, A.; SLUGOCKI, G.; MCNULTY, J.; KAUSER, S.; TOBIN, D. J.; JING, C.;

JOHANSSON, O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **FASEB J.** 2002 Jun;16(8):896-8. 2002 Apr 23.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Tratamento e acompanhamento do diabetes *mellitus*: **diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: SBD, 2011.

STADELMANN, W.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, p. 26S-38S, 1998.

STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J.W.; SCHULTZ, G.S.; DAVIS, T.A.; ELSTER, E.A. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 111, n. 2, p. S70-S80, 2008.

STRONCEK, J.D.; BELL, N.; REICHERT, W.M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 90, p. 1230-1238, 2009.

SWAIN, S. D. et al. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.

TANAKA, M.; MIYAJIMA, A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 149, p. 39-52, 2003.

TEIXEIRA, L. B. **Isolamento, identificação e caracterização da atividade anti-inflamatória de Hev b 13, uma proteína derivada do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* – modelos experimentais de colite e artrite em camundongos.** 2011. 163 f. (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

VASSE, M. et al. Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 8, p. 1835-1842, 1999.

VELLOSO, L. A. et al. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. **Cardiovasc Res**, v. 40, n. 1, p. 96-102, 1998.

VELNAR T, BAILEY T, SMRKOLJ V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res.** Sep-Oct;37(5):1528-42 2009.

WALLACE, P. M. et al. Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5547-5555, 1999.

WEI, Y. H.; LU, C. Y.; LEE, H. C.; PANG, C. Y.; MA, Y. S. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. **Ann N Y Acad Sci.** 1998 Nov 20;854:155-70.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. **Wound Repair Regen**, v. 13, n. 5, p. 452-461, 2005.

YEOH-ELLERTON, S.; STACEY, M. Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. **J Invest Dermatol**, v. 121, n. 4, p. 918-925, 2003.

Aneæos

*"É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas a graça das graças é não desistir nunca."
_ Hélder Câmara*

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2008

Ofício nº 2038/2008
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5606/2008

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou “**AD REFERENDUM**” a proposta de “Criação do banco de amostras biológicas da Dermatologia” e a enquadrou na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento de guarda do material.**

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE
Depto. de Clínica Médica - Dermatologia

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 087/2008, sobre o projeto intitulado “*Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras dérmicas em ratos diabéticos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **30 de junho de 2008**.

(We certify that the protocol nº 087/2008, about “*Activity of natural latex biomembrane of Hevea brasiliensis rubber tree on wound healing in diabetic rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **06/30/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 30 de junho de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal