

LÚCIA ROBERTA DA CRUZ PAIÃO UMEZU

Caracterização da Biossíntese do Gasotransmissor Sulfeto de
Hidrogênio (H₂S) em Úlceras Venosas

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Versão Corrigida

São Paulo
2023

RESUMO

UMEZU, LRCPU. Caracterização da Biossíntese do Gasotransmissor Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) em Úlceras Venosas. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2023

A prevalência e incidência de úlceras venosas (UV) nos membros inferiores vêm aumentando globalmente e, paralelamente, aumenta-se o dispêndio financeiro para tais casos. A dor é um sintoma frequente e negligenciado em portadores de UV, que afeta particularmente, a população adulta, com maiores índices entre idosos, obesos e com baixas condições socioeconômicas. Estudos recentes, mostram grande potencial e vantagens no emprego de moléculas doadoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Moléculas doadoras de H₂S com cinética de liberação lenta ou moléculas híbridas anti-inflamatório não esteroide no tratamento e resolução da inflamação com componente sensitivo/nociceptivo. O objetivo desse estudo consistiu-se em avaliar e caracterizar a biossíntese do gasotransmissor Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) em úlceras venosas e eficácia de um sistema tópico nanoestruturado para doadores de H₂S (ATB-346 e GYY4137) na dor e cicatrização de UV de voluntários de ambos os sexos. Foram estudados 14 pacientes com UV de difícil cicatrização, 6 pacientes do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com média de idade de 64 anos para a caracterização da biossíntese de Sulfeto de Hidrogênio. Na segunda fase, foi realizado um estudo piloto, com doadores de H₂S com 3 pacientes do sexo feminino e 2 pacientes do sexo masculino, com média de idade de 53 anos e portadores de UV (classes I e II). Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Estomatoterapia, sendo esses distribuídos em 5 grupos randomizados (avaliados clinicamente por 20 dias quanto à evolução da área ulcerada (cicatrização), efeitos adversos, alodínia mecânica, escores da dor e de qualidade de vida, segundo às características sociodemográficas. Foram coletados debris das feridas dos pacientes para o grupo de caracterização da biossíntese assim como dos pacientes que iriam receber o tratamento, D₀, D₇, D₁₅ e D₂₀ pós-tratamento, para análise bioquímica de atividades enzimáticas, bem como a expressão de enzimas envolvidas na síntese de H₂S (CBS, CSE, 3MST, IL 1 β , MMP 1/8) por Western Blotting; expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina (NT), 4HNE e proteínas carboniladas por Slot Blot e determinação da atividade das enzimas metaloproteinases MMP 2, 9 e 3 por zimografia. Nesta primeira fase, mostramos que a triagem de diversos marcadores inflamatórios expressos de maneira distinta nos tecidos granuloso e rígido associados à expressão reduzida da CSE no tecido granuloso e a maior expressão da CBS no tecido rígido podem servir como marcadores

para avaliar a eficácia de novas intervenções terapêuticas voltadas para o processo de cicatrização de feridas crônicas (UV).

Os resultados obtidos na fase 2 demonstram que, para os pacientes que utilizaram a formulação com GYY, houve aumento da expressão de CBS, CSE, 3MST, NT e diminuição de 4HNE e proteínas carboniladas no D7. IL-1 β , MMP 2, 9 e 3 não tiveram alteração da expressão. O paciente que recebeu a formulação com ATB-346 teve o estudo interrompido e os dados de D₁₅ e D₂₀ foram semelhantes ao grupo controle. Dos 15 pacientes recrutados (7 masculinos e 8 femininos), 10 foram excluídos do estudo pelo abandono na continuidade do tratamento. A pandemia de SARS-COVID-19 impactou negativamente no recrutamento dos voluntários.

Palavras-chave: Dor, úlcera venosa, Sulfeto de Hidrogênio, moléculas doadoras de H₂S

ABSTRACT

UMEZU, LRCPU. Characterization of hydrogen sulfide gas biosynthesis (H₂S) in venous ulcers. [Dissertation (Master's in Pharmacology)] - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2023

The prevalence and incidence of venous ulcers (VU) in the lower limbs have been increasing globally and, at the same time, the financial expenditure for such cases is increased. Pain is a frequent and neglected symptom in patients with VU, which particularly affects the adult population, with higher rates among the elderly, obese and with low socioeconomic conditions. Recent studies show great potential and advantages in the use of hydrogen sulfide (H₂S) donor molecules. H₂S donor molecules with slow-release kinetics or nonsteroidal anti-inflammatory hybrid molecules in the treatment and resolution of inflammation with sensory/nociceptive component. The aim of this study was to evaluate and characterize the biosynthesis of hydrogen sulfide (H₂S) in venous ulcers and efficacy of a nanostructured topical system for H₂S donors (ATB-346 and GYY-4137) in the pain and healing of VU of volunteers of both sexes. We studied 14 patients with VU difficult to heal, 6 male and 8 female patients, with a mean age of 64 years for the characterization of hydrogen sulfide biosynthesis. In the second phase, a pilot study was conducted with H₂S donors with 3 female patients and 2 male patients, with a mean age of 53 years and patients with VU (classes I and II). The patients were recruited from the Stomatotherapy Outpatient Clinic, which were divided into 5 randomized groups, clinically evaluated for 20 days for the evolution of the ulcerated area (healing), adverse effects, mechanical allodynia, pain scores and quality of life, according to sociodemographic characteristics. Debris from the wounds of the patients were collected for the biosynthesis characterization group as well as from the patients receiving the treatment, D₀, D₇, D₁₅ and D₂₀ post-treatment, for biochemical analysis of enzymatic activities, as well as the expression of enzymes involved in the synthesis of H₂S (CBS, CSE, 3MST, IL 1 β , MMP 1/8) by Western Blot; expression of nitrotyrosine protein residues (NT), 4HNE and carbonyl proteins by Slot Blot and determination of the activity of metalloproteinases MMP 2, 9 and 3 by zymography. In this first phase, we show that the screening of several inflammatory markers expressed differently in the granulous and rigid tissues associated with the reduced expression of CSE in granulous tissue and the greater expression of CBS in rigid tissue can serve as markers to evaluate the efficacy of new therapeutic interventions aimed at the process of healing of chronic wounds (VU).

The results obtained in phase 2 show that, for patients who used the formulation with GYY, there was an increase in the expression of CBS, CSE, 3MST, NT and a decrease of 4HNE and carbonyl proteins in D₇. IL-1 β , MMP 2, 9 and 3 had no expression alteration. The patient who received the formulation with ATB-346 had the study interrupted and the data of D₁₅ and D₂₀ were similar to the control group. Of the 15 patients recruited (7 male and 8 female), 10 were excluded from the study due to abandonment in the continuity of treatment. The SARS-COVID-19 pandemic negatively impacted the recruitment of volunteers.

Keywords: Pain, venous ulcer, Hydrogen sulfide, H₂S donor molecules

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

1.1 Feridas (úlceras)

A pele é o maior órgão do corpo humano (15% do peso corporal), abrangendo uma área de até 2m², que corresponde a cerca de 16% do peso corporal em indivíduos adultos. É um órgão sensitivo, que atua como uma barreira protetiva entre o organismo e o meio ambiente, impedindo a penetração de agentes externos (microrganismos e radiação ultravioleta), de danos mecânicos e térmicos e auxiliando na regulação da temperatura corporal (Shai et al., 2009).

Por sua vez, qualquer dano ou quebra na superfície da pele, que pode ter origem acidental, como queimaduras, lesões, pequenos cortes e arranhões na pele, ou decorrente de procedimento cirúrgico, e que leve à solução de continuidade da pele é denominado “ferida” (Dealey, 2001). Como consequência, a pele lesada inicia imediatamente o processo de cicatrização, um processo dinâmico, que compreende diversas fases: alterações vasculares e celulares, como proliferação, epitelização e remodelagem.

A reação vascular é imediata e conduz à hemostasia e tentativa de remoção do agente agressor e restos celulares. A vasoconstrição é o processo subsequente que visa suprimir a perda sanguínea e, por isto, evidencia-se concentrações elevadas de plaquetas e trombos ou coágulos de fibrina, que culminam na ativação da cascata da coagulação e liberação de componentes dessa cascata para formação da matriz extracelular temporária, necessária para o processo de quimiotaxia e ativação dos mecanismos de proteção e resolução (cicatrização). Tais reações vasculares e celulares levam às clássicas manifestações clínicas da resposta inflamatória (rubor, calor, dor, edema), que podem ser transitórias ou duradouras. Na fase seguinte, da proliferação (granulação, epitelização e contração) e formação de um tecido novo, observam-se alguns fenômenos, como aumento da força da ferida (força de tração), capacidade de esta resistir às forças externas e não se romper, evoluindo assim para a fase de epitelização, também conhecido como fechamento da superfície da ferida, por meio da multiplicação das células epiteliais da borda, caracterizando-se pela redução da capilarização e do aumento do colágeno. Neste ponto a contração reduz o tamanho das feridas, com a ação especializada dos fibroblastos. Por fim, a remodelagem caracteriza-se pela diminuição da atividade celular, do número de vasos sanguíneos e a perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz. Ocorre então a reorganização do processo de reparação da lesão, com depósito de colágeno (Franco & Gonçalves, 2007).

A úlcera cutânea é uma ferida aberta, de várias etiologias, que se desenvolve na pele como resultado de corte/cirurgia, lesão, má circulação ou pressão. Essa pode levar muito tempo para cicatrizar e, caso não seja tratada, pode ser infectada, causando várias complicações médicas de difícil resolução. A úlcera pode se formar em qualquer área da pele, sendo mais comum nos membros inferiores (Nelson & Adderley, 2016). A ulceração intensa, tal como a úlcera de estase, consiste em um dos achados mais graves e debilitante de insuficiência venosa periférica crônica, que corresponde a 80% das ulcerações dos membros inferiores (O'Meara et al., 2008). Postula-se que as úlceras são incomuns em indivíduos saudáveis e, em geral, o surgimento dessa ferida está correlacionado aos fatores de risco, tais como doenças cardiovasculares, diabetes e, mais recentemente, a obesidade (Sen et al., 2009; Kelly & Gethin, 2019). Em geral, as úlceras nas pernas ocorrem em detrimento de déficit circulatório, complicações de retorno ou obstrução venosa (Nelson & Adderley, 2016). Estima-se que mais de 20% das pessoas com úlceras nas pernas têm alguma disfunção ou doença arterial, com ou sem distúrbios venosos.

Segundo recente levantamento estatístico de Kelly & Gethin (2019), envolvendo 50 pacientes com úlceras venosas (UV) abertas, em torno de 90% deste total possuíam pelo menos uma doença crônica, 60% eram hipertensos, 30% apresentavam fibrilação atrial, 18% eram diabéticos, 18% sofriam de insuficiência cardíaca e 28,6% apresentavam algum problema músculo esquelético. Todos apresentavam pelo menos um fator de risco para essa doença, sendo os mais frequentes: sobrepeso (30%), obesidade (30%), colesterol alto (22,2%) e pouca ou ausência de atividade física (22%). Outros autores mostram que dentre os fatores de risco para o surgimento das UV, destacam-se a idade avançada, sexo feminino, trauma, insuficiência cardíaca congestiva, imobilidade, ausência congênita de veias, trombose venosa profunda, flebite, predisposição genética, gestação múltipla e mutação no fator V de Leiden (Dantzer et al., 2008; Vasudevan, 2014; Do et al., 2016).

De acordo com Nelson & Adderley (2016), para cada 1000 indivíduos, por volta de 2 ou 3 possuem úlceras ativas nas pernas, sendo esta incidência maior conforme o avanço da idade (ex.: para cada 1000 pessoas com mais de 80 anos, pelo menos 20 destas apresentam UV). Corroborando essas evidências, Vieira e Araújo (2016) demonstraram que, no Brasil, com o aumento da população idosa, a incidência de feridas crônicas cutânea aumentou paralelamente, associada ao agravamento da qualidade de vida destes.

As feridas (úlceras) por pressão, diabética e vasculogênica crônica são as mais prevalentes, conforme relatórios de visitas e consultas médicas (Brito et al. 2013). Recente

estudo analítico transversal, realizado de janeiro a março de 2016, em um município brasileiro, revelou que, de 339 idosos atendidos nas unidades básicas de saúde local, a prevalência de lesão por pressão nessa população foi 5,0 %, sendo 3,2% destes diagnosticados como úlcera diabética e 2,9 % exibiam úlcera vasculogênica. De acordo com esses estudos, alguns fatores de risco como a falta de atividade física/mental, somado ao baixo poder aquisitivo contribuem para maior incidência dos casos de úlceras. Acredita-se que o número de indivíduos afetados por diversos tipos de feridas é ainda subestimado, pois muitos indivíduos não procuram assistência médica ou não têm acesso ao serviço público de saúde, buscando opções terapêuticas paliativas, que incluem uso de produtos naturais e até mesmo apoio religioso (Piriz et al., 2014; Silva et al., 2015).

A fisiopatologia da UV é complexa e, sabidamente, existe forte correlação desta com a deterioração ou falhas no retorno venoso periférico (complexo de veias profundas, superficiais e intercomunicantes), ou seja, dos membros inferiores (pernas) para o coração. Além disto, a UV é mais prevalente em uma parcela de pacientes que apresentam fatores de risco genético ou ambiental (O'Donnel et al., 2014). Portanto, falhas nos componentes da tríade (veias profundas, superficiais e intercomunicantes) resultam em hipertensão venosa, causando distensão e alongamento das alças capilares, que induz ao extravasamento de proteínas plasmáticas. A disfunção da bomba da panturrilha (músculos gastrocnêmio e sóleo), que desempenham a função de bomba muscular do retorno venoso, consiste em outro fator etiológico, que resulta em estase sanguínea, dano capilar, edema e falta de oxigenação local (hipóxia) na pele (Prakash et al., 2013; Samaniego-Ruiz et al., 2017).

O aumento da pressão hidrostática leva ao aumento da pressão venosa e reação inflamatória nas paredes e válvulas das veias que, como consequência, desenvolve o processo de transmigração e quimiotaxia de células e mediadores inflamatórios do espaço intravascular para o espaço intersticial. Essas alterações vasculares resultam, em parte, de mudanças na camada de células endoteliais “gaps”, que se tornam frouxas, favorecendo a mobilização dos leucócitos (quimiotaxia), extravasamento de fibrinogênio e o depósito de fibrina nos capilares, limitando a oxigenação no local (isquemia) e de outros nutrientes para a pele (Barbosa & Campos, 2010; Stechmiller et al., 2019). Em conjunto, essas alterações vasculares e celulares (inflamação) promovem a ativação de células inflamatórias, particularmente dos macrófagos e monócitos, além de linfócitos T e mastócitos (Rafetto, 2018). Nesse contexto, participam várias quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases da matriz e outras vias

regulatórias da resposta inflamatória, contribuindo assim para fisiopatologia das úlceras venosas (Rafetto, 2018; Stechmiller et al., 2019).

Em geral, a localização mais comum das UV é a região do maléolo e terço distal da perna (Figura 1). Associados à UV de perna, são comuns os sinais clínicos, como extremidade quente do membro afetado, edema, sensação de peso no membro, câimbras musculares, alterações cutâneas (eczema de estase, irritação), esclerose e hiperpigmentação ou pigmentação ocre (Stechmiller et al., 2019).



Figura 1. Ilustração de ferida de estase venosa em paciente. Nota-se região escurecida (seta), resultado de hiperpigmentação local, edema e alterações cutâneas (eczema, úlcera). Adaptada: Ministério da Saúde, 2002.

Dependendo da causa, as úlceras podem ser classificadas em cirúrgica e não cirúrgica e, com base nas características celulares e o tempo de manifestação e, também, de resolução/reparação, as úlceras podem ser agrupadas em aguda e crônica (Tabela 1, Ministério da Saúde, 2002).

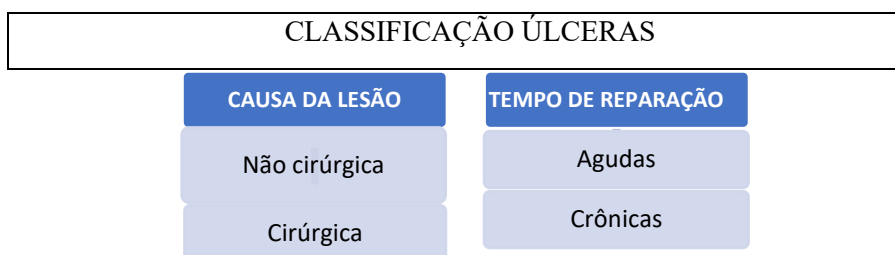


Tabela 1. Classificação das úlceras. Oriundas de lesão cirúrgica e não cirúrgica do tipo aguda ou crônica, dependendo da característica celular e tempo de manifestação. Adaptada: Manual do Ministério da Saúde, 2002

De acordo com a extensão do comprometimento das camadas da pele ou tecidos, a úlcera/ferida, independentemente da causa ou origem, pode ser graduada em tipo I, II, III ou IV (Tabela 2, Ministério da Saúde, 2002).

Graus	Alteração
I	Comprometimento da epiderme, a pele se encontra íntegra, mas apresenta sinais de hiperemia, descoloração ou endurecimento.
II	perda parcial de tecido envolvendo a epiderme ou a derme. A ulceração é superficial, em forma de escoriação ou bolha.
III	existe comprometimento da epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo).
IV	comprometimento da epiderme, derme, hipoderme e tecidos mais profundos.

Tabela 2. Classificação dos diferentes graus de ferida e o comprometimento do tecido da pele. Adaptado: Manual do Ministério da Saúde, 2002.

Apesar de pouco comum os casos fatais decorrentes de UV, essa doença promove elevada morbidade, desconforto e incapacidade laboral e física, afetando drasticamente a qualidade de vida desses indivíduos, que evoluem para depressão, baixa autoestima, baixo comprometimento com higiene e cuidados pessoais. Muito frequentemente, evoluem com dor em pontada/agulhada ou dor crônica/neuropática (Oliveira et al., 2015; Stechmiller et al., 2019).

A dor desponta como uma das principais manifestações clínicas nos indivíduos acometidos por ulcerações cutâneas e, muito comumente, essa manifestação clínica é terapêuticamente negligenciada (MS, 2002; Carmo et al., 2007, Oliveira et al., 2015; Stechmiller et al., 2019). Assim, conhecer as estratégias terapêuticas disponíveis para manejo da dor, selecionar a terapia ideal para cada paciente e buscar novas opções terapêuticas para o controle da dor podem ser meios eficazes de melhorar a assistência e, também, a resolução da ferida. A cronificação do quadro algico ou o mau tratamento de uma dor aguda corroboram para evolução de um quadro algico com componente neuropático. O diagnóstico é sugerido por dor desproporcional à lesão tecidual ou disestesia (p. ex., queimação, formigamento). O tratamento costuma ser feito com fármacos adjuvantes ao invés de analgésicos (p. ex., fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes, fármacos tópicos) ou com tratamentos não farmacológicos (p. ex., fisioterapia, neuromodulação). A dor neuropática pode resultar de atividade eferente (dor de manutenção simpática) ou da interrupção da atividade aferente (dor de desaferentação). Em estados crônicos, o nervo periférico desencadeia continuamente sinais ectópicos nociceptivos para o SNC. Esse bombardeamento de estímulos nociceptivos periféricos contínuos leva a alterações nos nociceptores receptivos, sensibilizando-os e interpretando estímulos menores, incluindo estímulos não dolorosos (alodínia), como uma dor substancial e proveniente de uma área mais ampla do que efetivamente é. Pode-se reverter essas alterações, pelo menos temporariamente, se for possível interromper os estímulos nociceptivos periféricos (Miranda et al, 2016).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP - International Association for Study of Pain), uma entidade criada em 1973, que têm como objetivo principal,

dentre outros, identificar, definir e classificar a dor em suas diversas formas, a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com uma lesão tecidual real ou potencial. Em 1994 a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) apresentou uma definição de dor neuropática (DN) como uma “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção ou perturbação transitória no sistema nervoso central ou periférico”. Este conceito gerou muita discussão, especialmente no termo “disfunção”, que poderia ser uma fonte de confusão. Após vários anos, em 2008, o Grupo de Interesse em Dor Neuropática da IASP propôs uma nova definição, “dor que ocorre como uma consequência direta de uma doença ou lesão que afete o sistema somatosensorial”. Com esta nova proposta faz-se uma alusão ao fato de que DN necessita ser diferenciada de dor secundária a neuroplasticidade no sistema nociceptivo (sensibilização central), como por exemplo, condições dolorosas inflamatórias que gerem intensa estimulação nociceptiva. Ainda, DN é diferente de dor musculoesquelética ou outra dor que ocorra indiretamente no curso de doenças neurológicas. O termo “doença” refere-se a processos patológicos específicos, como doenças autoimunes, e o termo “lesão” refere-se a um dano macro ou microscopicamente identificável. A DN é uma síndrome dolorosa crônica em que o mecanismo que gera a dor é encontrado em algum local das vias nociceptivas, sem inicialmente estimular os nociceptores, contrariamente ao que acontece com a dor nociceptiva ou fisiológica. Portanto, a dor envolve a percepção dos estímulos nocivos pelo Sistema Nervoso Central (SNC), quando receptores sensoriais especializados (neurônios nociceptivos periféricos) são ativados. Assim como outros sentidos, a dor possui seu próprio sistema neural, também conhecido como sistema nociceptivo. Adicionalmente, a dor contempla um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção, estado emocional e aprendizagem. Outros componentes da dor, tais como a nocicepção (sensação) e a sua percepção participam desse processo. A nocicepção (do latim *nocere*, ferir), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo, enquanto a percepção atua como uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas. (SBED, 2008).

Em indivíduos portadores da UV, as extremidades distais, pernas e pés, são comumente afetadas, os quais apresentam um padrão de dor persistente ou em pontada no local e, também, hiperalgesia (dor exacerbada causada por estímulos nocivos) ou alodínia (dor evocada por estímulos não nocivos) na periferia da lesão. Curiosamente, sabe-se que, em indivíduos que padecem com dor crônica, o autocuidado com a doença é reduzido, assim como a qualidade de vida (Althaus et al., 2012; Edwards et 2014; Alföldi et al., 2014; Kelechi et al., 2017).

Infelizmente, e muito comumente, a dor associada às UV não é gerenciada adequadamente pela equipe clínica, interferindo muito frequentemente no processo de cicatrização da ferida (Edwards et al., 2014; Lal, 2015; Rafetto, 2018). Ainda, indivíduos portadores de UV sofrem com dor crônica de intensidade moderada ou intensa, o que os leva a exibirem graus elevados de fadiga, depressão e ansiedade, contribuindo assim para maior incapacidade destes e aposentadoria precoce (Hellström, et al., 2016; Do et al., 2016). No Brasil, estudo qualitativo em ambulatório de angiologia de um Hospital Universitário da região central do Rio Grande do Sul, realizado de Janeiro a Fevereiro de 2013, com 14 portadores de UV, demonstrou que estes indivíduos realizam autoterapia com analgésicos, usam vários produtos naturais, chás, alguns buscam o serviço de saúde e, alguns, buscam até auxílio em crenças religiosas para o alívio da dor (Silva et al., 2015), reforçando assim a necessidade de maior assistência terapêutica a esses pacientes no manejo da dor.

1.2 Úlcera Venosa e Tratamentos

De acordo com vários estudos epidemiológicos e revisões sistemáticas (Franco & Gonçalves, 2007; Barbosa & Campos, 2010; MS, 2010; Silva et al., 2015; Rai, 2014; Stechmiller et al., 2019), para o tratamento da UV, pelo menos quatro manobras / condutas clássicas são adotadas: 1) tratamento da estase venosa, repouso; 2) terapia compressiva, 3) terapia tópica com diversos tipos de curativos, a fim de manter úmido e limpo o leito da ferida, que sejam capazes de absorver o exsudato e controlar a infecção (antibioticoterapia) e 4) prevenção de recidivas. Todavia, em conjunto, evidencia-se que o tratamento de UV é um desafio terapêutico, que requer um diagnóstico abrangente, e crucial para a indicação terapêutica inicial. Além disto, sugere-se que a pressão venosa aumentada deva ser controlada (reduzida), por meio da terapia de compressão, como uma opção de escolha. Em casos de pacientes com UV que não cicatrizam, que receberam terapia de compressão e não têm incompetência venosa profunda, recomenda-se a cirurgia venosa superficial, escleroterapia com espuma ou ligadura da veia afetada como um aspecto importante do plano geral de tratamento (Silva et al, 2017). A prevenção de recorrências inclui avaliações clínicas regulares, educação do paciente sobre cuidados com a pele, elevação do membro, exercício e terapia de compressão ao longo da vida (MS, 2002; Dantas, 2016). A aplicação de bandagem é a forma mais comum de terapia de compressão; contudo, essa aplicação pode levar a complicações, como circulação ainda mais afetada (Borges, 2005). Vários tipos de bandagens são propostos, incluindo a bota ou bandagem inelástica que contém a pasta de Unna, que consiste em uma atadura impregnada

com óxido de zinco, normalmente usada por 7 dias. Como ponto positivo, essa bandagem fornece maior proteção à lesão e, como ponto negativo, está a colocação inadequada em feridas exsudativas e mudança de pressão ao longo do tempo (Abbade et al., 2006).

Apesar da variedade de curativo ou bandagens para o tratamento das UV, a depender do grau da ferida e do tipo de paciente, o tratamento torna-se mais personalizado. Mesmo assim, uma grande parcela de estudos questiona as terapias adotadas para o tratamento das úlceras (Borges, 2005; MS, 2002; Rai, 2014). Por exemplo, segundo recentes diretrizes no tratamento da UV, Rai (2014) demonstrou que a administração do óxido de zinco não mostrou diferença significativa na cicatrização de UV. Também não foram encontradas evidências suficientemente forte e verdadeira que justificam o uso de flavonóides purificada micronizados e medicamentos flebotônicos na UV crônica. Apesar do envolvimento de eicosanóides (prostaglandinas) na inflamação, o uso de inibidores da ciclooxigenase não interferiu na evolução das UV e, portanto, ainda carece de dados suficientes para permitir uma recomendação. Também não existem evidências para demonstrar a eficácia do dobesilato de cálcio na cura da UV. O emprego associado do agente fibrinolítico (esteroide anabólico), como o estanozolol, juntamente com a terapia de compressão, mostrou potencial benéfico no tratamento da lipodermato-esclerose associada a UV, mas outros estudos precisam ser confirmados. Ainda não há evidências suficientemente fortes para apoiar o uso contínuo do ativador da enzima guanililciclase, sildenafil na terapia da UV. Por outro lado, sugere-se que a pentoxifilina pode ser eficaz na melhora da UV quando usada em conjunto com a terapia compressiva (Rai, 2014).

Contudo, com relação ao controle da dor e da cicatrização da UV, nota-se que mundialmente os padrões e esquemas terapêuticos disponíveis são frequentemente negligenciados, seja por falta de terapia adequada, da causa da ferida, do cuidado ao paciente ou da escolha da terapia tópica ideal para os diferentes tipos de úlceras (Borges et al., 2007; Oliveira et al., 2015). Desse modo, a busca por novas terapias para promover e estimular a resolução da ferida e dor associada representa uma opção de pesquisa em demanda.

Nesse contexto, vale ressaltar que inúmeros estudos mostram que o novo mediador endógeno, Sulfeto de Hidrogênio (H_2S), possui um papel fisiopatológico importante em doenças inflamatórias e dolorosas. Doadores de H_2S exibem efeitos terapêuticos, tanto em modelos inflamatórios e nociceptivos, quanto em estudos clínicos (Ekundi-Valentim et al., 2010; Liu et al. 2014; Rodrigues et al., 2017; Xu et al., 2019; Wallace et al., 2019).

Recentemente, Wu e col. (2019) demonstraram que um sistema de entrega (hidrogel), capaz de liberar o H_2S foi eficaz na reparação da ferida, via polarização *in situ* de macrófagos

M2. Esses dados são relevantes e mostram a potencialidade de moléculas doadoras de H₂S exercerem efeitos analgésico e cicatrizante na UV.

1.3 Eficácia do Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) na Dor e Inflamação

O Sulfeto de Hidrogênio (H₂S), previamente conhecido como poluente ambiental foi, em 1996, descrito pela primeira vez por Abe e Kimura como um neuromodulador endógeno em mamíferos. Desde então, a biossíntese e metabolismo do H₂S, assim como a síntese de doadores de H₂S vem sendo demonstrado em processos fisiológicos e patológicos, como anti-inflamatório, analgésico e citoprotetor (Ekundi-Valentim et al., 2010; 2013; Gemici et al, 2015; Herrera et al, 2015; Campos et al, 2016; Coavoy-Sanchez et al., 2016; Rodrigues et al., 2017 Coavoy-Sanchez, Costa & Muscará, 2018,2019; Mendes et al, 2019).

Atualmente, sabe-se que a produção endógena do H₂S resulta de três vias principais: as enzimas cistationina- γ -liase (CSE) e cistationina- β -sintase (CBS), que utilizam a L-cisteína como substrato e o 5'-fosfato de pirodoxal (vitamina B6), como cofator (Hosoki, Matsuki & Kimura, 1997). A L-cisteína, aminoácido obtido na dieta ou por meio de uma reação de condensação de serina com homocisteína, por ação da CBS, gera cistationina, que é convertida em cisteína, via ação da CSE. Outros substratos podem ser utilizados nestas vias catalíticas, como a homocisteína, a qual reage com a serina via reação catalisada pela CBS, formando a cistationina que, por sua vez, é hidrolisada pela CSE, em cisteína, amônia e cetobutarato. A terceira via capaz de sintetizar H₂S decorre da ação da 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST) juntamente com a cisteína aminotransferase (CAT). O metabolismo do H₂S pode ocorrer via oxidação na mitocôndria, formando o tiosulfato e, por fim, sulfato, pela ação da sulfito-oxidase (Kimura, 2012). Também sofre metilação no citosol das células, via ação da tiol-S-metiltransferase, resultando em metanotiol (CH₄S) ou metil mercaptano (CH₃S) e dimetilsulfeto (CH₃SCH₃). No plasma, a meta-hemoglobina pode interagir como o H₂S, formando sulfehemoglobina, excretada na forma livre ou conjugada pela via renal (Lowicka & Beltowski, 2007) (figura 2).

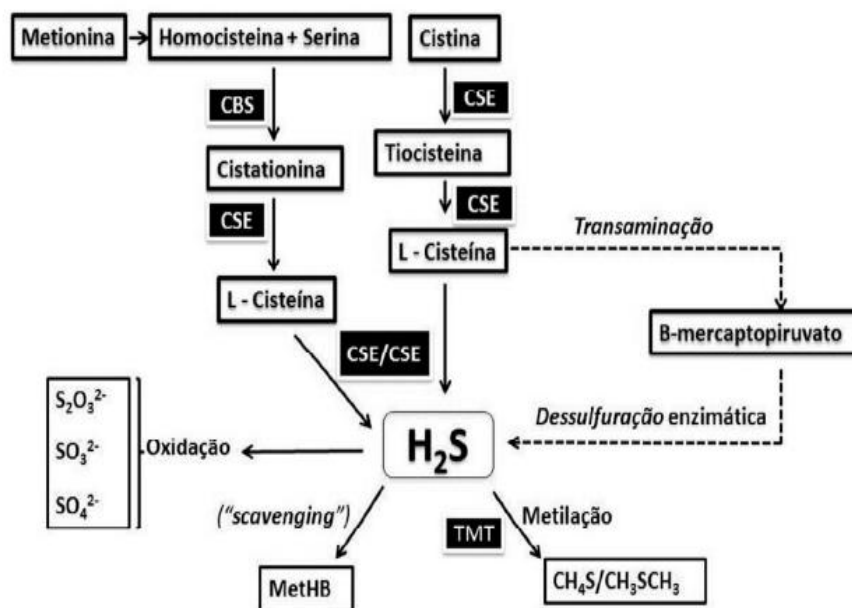


Figura 2. Mecanismos de síntese e metabolismo do H₂S *in vivo*. Adaptado de Whiteman & Moore, 2009.

As enzimas envolvidas na síntese endógena do H₂S estão distribuídas na periferia e SNC, sendo que a CBS está mais expressa no SNC (cerebelo, córtex e tronco cerebral), e a CSE está mais presente na periferia, como vasos (aorta, artéria mesentérica, veia porta), pulmões, pâncreas, estômago, fígado e rim (Powell et al. 2017). A 3MST é também encontrada em órgãos periféricos e em testículos (Tomita et al, 2016). Em regiões do encéfalo (hipocampo e hipocampo cerebelo) de roedores, a expressão da CBS e 3MST é maior em relação à periferia (Li et al, 2009).

Os compostos doadores de H₂S híbridos associados às moléculas de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que ainda não possuem um mecanismo de liberação bem definido, compreendem principalmente moléculas do grupo das ditioltionas (1,2-ditiole-3-thiones 4-carbamotioilpenil 2-(6-metoxinaftaleno-2-il) propanoato; AINE-DTTs), que liberam H₂S por hidrólise, e são também consideradas moléculas de fácil síntese, pois formam conjugados com AINES, como o 4-carbamotioilpenil 2-(6-metoxinaftaleno-2-il) propanoato (liberador de H₂S derivado de Naproxeno, ATB-346 (Figura 3), ou ácido 3-(3-benzoilfenil) propiônico (híbrido H₂S + cetoprofeno, ATB-352, Gugliandolo et al, 2018) e, mais recentemente, essas moléculas vem sendo testadas com anti-inflamatórios esteroides (dados não publicados).

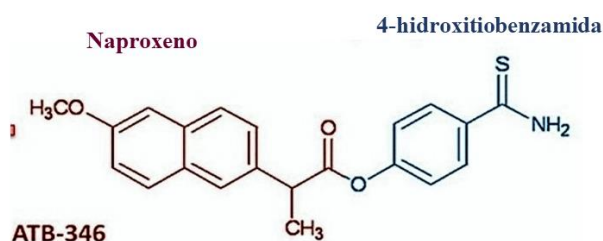


Figura 3. Estrutura molecular do ATB-346. Adaptado: De Cicco et al., 2016.

No contexto dos resultados com as moléculas híbridas, estudos prévios do nosso grupo e de outros, revelaram a eficácia e segurança dessas moléculas em modelos de dor resultante de lesão em nervos (dor neuropática; Di Cesare et al, 2017), dor inflamatória como artrite e sinovite (Ekundi-Valentim, 2010; 2013), dor pós-operatória (dados ainda não publicados) e, também, na condução do prurido agudo e crônico, uma modalidade de resposta sensitiva, que assim como a dor confere um caráter protetor ao indivíduo (Coavoy-Sanchez et al., 2016; Rodrigues et al., 2017). Apesar das evidências pré-clínicas e clínicas em patologias inflamatórias associadas ou não a um componente sensitivo, a eficácia e segurança dos doadores de H₂S híbridos com AINES (ATB-352 e ATB-346) ainda não foi avaliada na UV e dor relacionada. Vale ressaltar que, segundo estudo prévio do nosso grupo, o tratamento com doses equimolares do ATB-346 e Naproxeno, evocou efeito analgésico, anti-inflamatório e redução da perda óssea semelhante ao Naproxeno na periodontite induzida por ligadura em ratos, mas com maior vantagem sobre o AINE na prevenção da formação de úlceras gástricas (Herrera et al. 2015). Corroborando esse achado, em modelo de periodontite induzida por LPS em ratos, o novo doador híbrido de H₂S, ATB-352 (cetoprofeno) atenuou a infiltração de neutrófilos, mastócitos e da reabsorção óssea e, também, exibiu efeito gastroprotetor comparado ao cetoprofeno (Gugliandolo et al. 2018).

Até pouco tempo o papel do H₂S, dependente da concentração/dose e via pela qual é administrado, em algumas condições inflamatórias e nociceptivas foi considerado paradoxal, pois muitos estudos demonstraram respostas ambíguas (dual), ora com um papel protetor e em outro, deletério (Cunha et al. 2008; Distrutti et al. 2009, 2010; Kawabata et al. 2007; Donatti et al. 2014; Elies et al. 2016; Koroleva et al. 2017). Em termos farmacodinâmicos, as evidências científicas apontam que o efeito antinociceptivo do H₂S é mediado via bloqueio de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) e do sistema opioide (Cunha et al. 2008; Distrutti et al. 2009, 2010). Por outro lado, o efeito anti-inflamatório promovido pelo H₂S em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro* é mediado pela redução da migração e adesão celular (redução da

expressão de E-selectina, P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1), redução do estresse oxidativo, inibição da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias (ex.: IL-1 β , TNF- α) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) via NF- κ B, aumento de IL-10 e manutenção do sistema antioxidante endógeno (Zanardo et al. 2009; Esechie et al. 2009; Lee et al. 2009; Sidhapuriwala et al. 2009; Whitman et al. 2010; Kimura et al. 2014). Apesar de limitados, estudos recentes destacam um efeito controverso para o H₂S nos mecanismos de inflamação e regeneração subjacentes à lesão térmica (Wang et al. 2015; Ahmad & Szabo, 2016, Ahmad et al., 2017). Sabe-se que os efeitos deletérios do H₂S estão amplamente associados à dose / concentração empregadas, bem como o tipo do doador (liberação rápida) e a via de administração empregada, que pode resultar numa concentração local exagerada e, muitas vezes, tóxicas para as células. Com a síntese de novas moléculas doadoras de H₂S, com um perfil farmacocinético distinto, incluindo moléculas doadoras de H₂S de liberação lenta (ex.: GYY4137, SRHD e AP67), essas ações tóxicas foram eliminadas (figura 4).

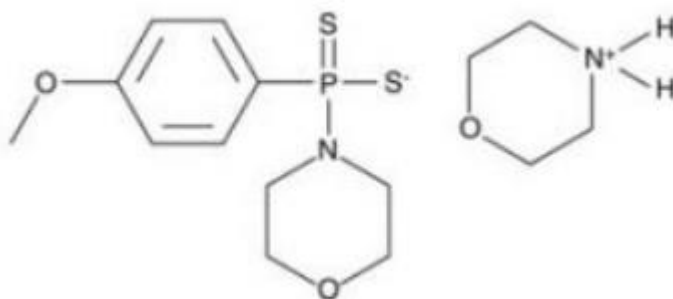


Figura 4. Estrutura molecular do GYY 4137. Adaptado de Santa Cruz Biotechnology.

O efeito anti-inflamatório de doadores de H₂S desperta o interesse do nosso grupo de pesquisa, o qual vem exaustivamente estudado e reforçado o potencial destas moléculas para o tratamento de diversas condições inflamatórias e dolorosas. Ekundi-Valentim et al. (2010) demonstrou que o reagente de Lawesson (doador de H₂S de liberação rápida) foi capaz de atenuar a nocicepção, edema e parâmetros inflamatórios (migração celular e liberação de IL-1 β) da sinovite induzida por carragenina em ratos. Em termos moleculares, dados parcialmente publicados pelo nosso grupo demonstraram que o GYY4137 (doador de H₂S de liberação lenta) inibiu tanto o prurido agudo via inibição histaminérgica e PAR-2, quanto a inflamação cutânea em modelo de psoríase, bem como da sinovite em ratos, via inibição do eixo NF- κ B-Caspase-1-IL-1 β , além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes em roedores (Ekundi et al. 2010; Coavoy- Sanchez et al. 2016; Rodrigues et al. 2017; Zhao et al. 2019).

Ademais, em resultados recentes do nosso grupo ainda não publicados, mas que resultou em patente depositada (BR 1020170031837), o desenvolvimento e emprego de microformulações e nanoformulações como sistema transportador tópico de moléculas doadoras do H₂S, de várias classes, reduz o prurido bem como os sinais clínicos de inflamação crônica no modelo de psoríase (Schimidt et al., 2016 dados não publicados; patente no. BR 1020170031837), possivelmente devido maior penetração do H₂S nas camadas mais profundas da pele e, importantemente, sem efeitos sistêmicos relevantes em relação ao corticóide.

1.4 Justificativa

A UV afeta entre 1 e 3% da população mundial (Nettel et al., 2013), sendo a incidência desse tipo de ferida maior na população adulta, com maiores índices em idosos ou indivíduos obesos e com baixas condições socioeconômicas (Tobón et al., 2008; Kelly & Gethin, 2019). Interessantemente, em estudos de análises comparativas entre pacientes portadores de UV no Brasil e de Portugal (Évora), foi demonstrado um melhor controle da dor e, conseqüentemente, maior qualidade de vida nos portadores dessa ferida em Portugal em relação aos brasileiros (Dias et al., 2013; Torres et al., 2014), reforçando a necessidade de maior atenção ao manejo da dor e cicatrização associada aos portadores da UV. Sabendo que os resultados da pesquisa básica e clínica vêm intensificando a relevância do H₂S como importante alvo no tratamento de doenças inflamatórias, assim como na cicatrização de feridas (Pinto et al. 2022), e que o desenvolvimento de sistemas de entrega tópico contendo doadores de H₂S foi capaz de reduzir os sinais clínicos de inflamação e prurido no modelo de psoríase (Schimidt et al. 2016, dados não publicados; patente no. BR 1020170031837), hipotetizou-se que essa manobra terapêutica pode ser eficaz na resolução da UV e dor associada. Assim, acredita-se que o emprego do sistema de entrega nanoestruturado contendo o produto teste doador de H₂S híbrido (ATB-352) ou lento (GYY4137) pode ser importante para a terapia dos portadores da UV.

5. RESULTADOS

PARTE 1

5.1 Associação do perfil socioeconômico dos pacientes portadores de feridas cutâneas e a origem das feridas

Conforme demonstramos, a tabela 5 resume o número e as características física e socioeconômica dos portadores de feridas cutâneas envolvidos na primeira etapa do presente estudo, na qual foi possível observar que a média (\pm DP) da idade desses voluntários foi $64,7 \pm 15,1$, sendo que 8 dos indivíduos são do sexo feminino e 7 do sexo masculino. A análise comparativa entre idade e sexo dos pacientes demonstra que não existe diferença significativa entre sexo e idade dos voluntários até 70 anos; todavia, após essa faixa etária verifica-se maior prevalência de indivíduos do sexo feminino (figura 10).

Com relação a figura 11, mostramos a distribuição por escolaridade dos voluntários, sendo que a maioria desses possui ensino fundamental ou médio incompleto e somente 4 deles (correspondente a 11 % da amostragem) são portadores de diploma de curso superior. Dos 14 pacientes analisados, 4 apresentavam Ensino Fundamental (EF) incompleto (35 %), 3 completaram o EF (27 %), totalizando 62% da amostra estudada. Dos pacientes que cursaram o Ensino Médio (EM), somente 3 completaram os estudos (27 %).

A origem das feridas cutânea é variada (Tabela 5), incluindo úlcera venosa ($n = 10$), úlcera de decúbito ($n = 2$), pós abscesso ($n = 1$) ou complicações pós queimadura ($n = 1$).

PACIENTE	IDADE	SEXO	PATOLOGIAS	VON FREY	DESCONFORT SOCIO ECONOMICO	INTERCORRENCIA	ALERGIAS	ITB	TTO	TAMANHO (cm)A	DOR	LESÃO
1 E.P.A.S.	38	F	MIOMA UTERINO (COIL)	0.60g - 3 cm da lesão	EM/ do lar	-	-	-	PAPAINA+ LIDOCAINA	10,5 x 15,5 x 7,5	5	SACRAL
2 O.M.O.	83	F	DAC+ REVASC+ DM+ DLP+ HAS	1.0g - na borda	EF incompl/do lar	sem casca	-	-	-	3,1 x 1,0 x 0,2	0	MIE
3 A.P.M.	86	F	HAS	1,4g - na borda	EF incompl/do lar	-	-	1,09	BOTA UNNA+ CURATIVO	1,0 x 0,9 x 0,2	0	MIE
4 M.R.E.	64	F	SD RAYNAUD	0.40g - 3 cm da lesão	superior/ empregado	-	AMOXA, PENICILINA	-	LIDOCAINA	0,6 x 0,6 x 0,2	6	MSD
5 A.G.	64	M	DM+ PSORIASIASE	1.4g - na borda	EF incompl/do lar	-	-	-	-	1,0 x 1,3 x 0,6	0	MIE
6 I.P.B.	62	F	DM+OSTEOMIELITE+HAS	2.0g - na borda	EF incompl/do lar	CAMARA HIPERBARICA	FIO SUTURA	-	-	0,8 x 0,3 x 0,2	0	MID
7 D.C.S.	36	M	ABSCESSO DENTARIO	1.0 - 1 cm da lesão	superior/ empregado	NOVA ABORDAGEM, LE_	-	-	ESPUMA COM PRATA	0,5 x 0,3 x 1,0	0	FACE
8 S.M.S.P.	75	F	HAS, VARIZES, DERMATITE OCRE	2.0g - na borda	superior/ do lar	-	CLONIDINA, DICLOFENACO, HC	-	CURATIVO	4,0 x 1,0 x 0,2	0	MID
9 C.P.	57	M	DM	2.0g - na borda	EF completo/aposentado	CAMARA HIPERBARICA	-	-	CURATIVO	1,5 x 3,3 x 1,5	0	MID
10 J.C.A.S.	63	M	DM	1.4g - na borda	EF completo/aposentado	HEMATOMA LOCAL	-	-	CURATIVO	2,0 x 1,7 x 0,2	0	MIE
11 J.C.F.	76	M	DM	0.40g - 3 cm da lesão	EM completo/aposentado	-	-	-	CURATIVO, LIDOCAINA	0,5 x 0,5 x 0,2	8	MIE
12 E.S.U.	61	M	QUEIMADURA	0.60g - 3 cm da lesão	superior/empregado	-	BIATAIN	-	CURATIVO	0,7 x 3,2 x 0,2	5	MID
13 R.T.O.	59	F	POS COVID	0.40g - 3 cm da lesão	EM completo/do lar	-	IODO	-	ESPUMA COM PRATA, LIDOCAINA	3,5 x 4,7 x 0,3	4	SACRO
14 F.A.S.	82	F	DM, HAS	0.40g - 3 cm da lesão	EF completo/do lar	EM USO DE CIPRO E BENZETACIL	-	-	CURATIVO, LIDOCAINA	13,5 x 18,5 x 0,3	8	MIE
MEDIA	64,71429											

Tabela 5. Análise descritiva dos portadores de feridas cutâneas envolvidos no estudo. Tamanho expresso em comprimento x largura x profundidade (cm). F= feminino, M= masculino.

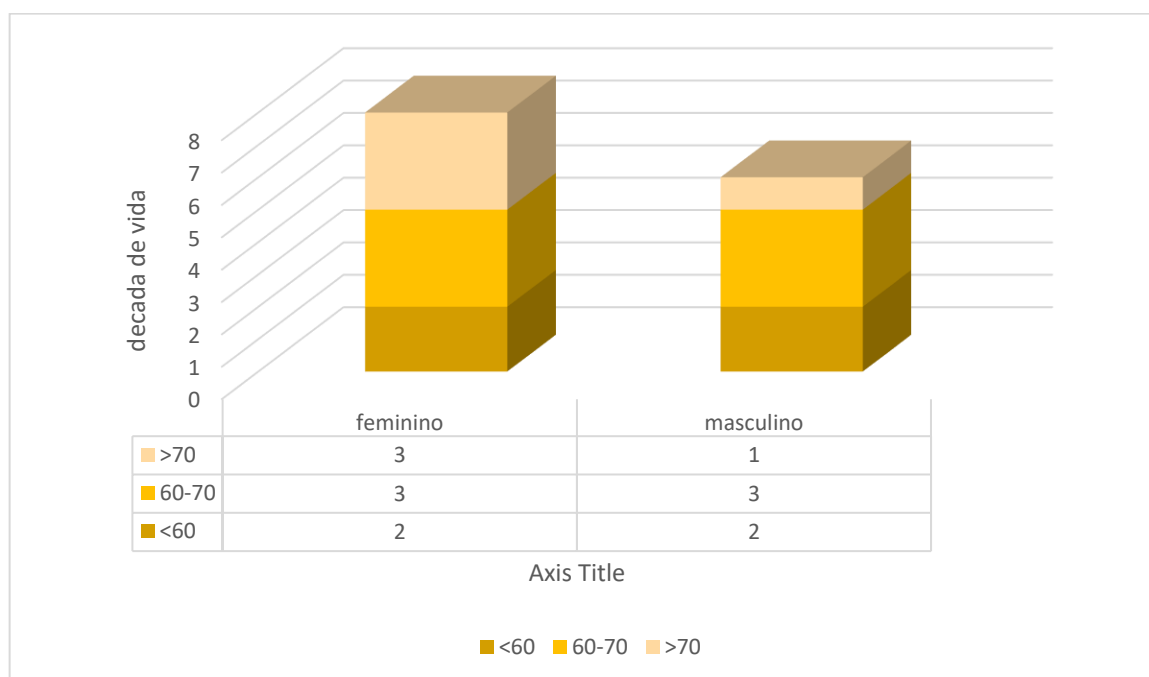


Figura 10. Análise comparativa entre o sexo e o número de indivíduos portadores de feridas cutâneas. Os dados estão apresentados como números absolutos para cada gênero por década de vida. O eixo y ilustra a distribuição da idade por década, enquanto o eixo x mostra a distribuição numérica por sexo.

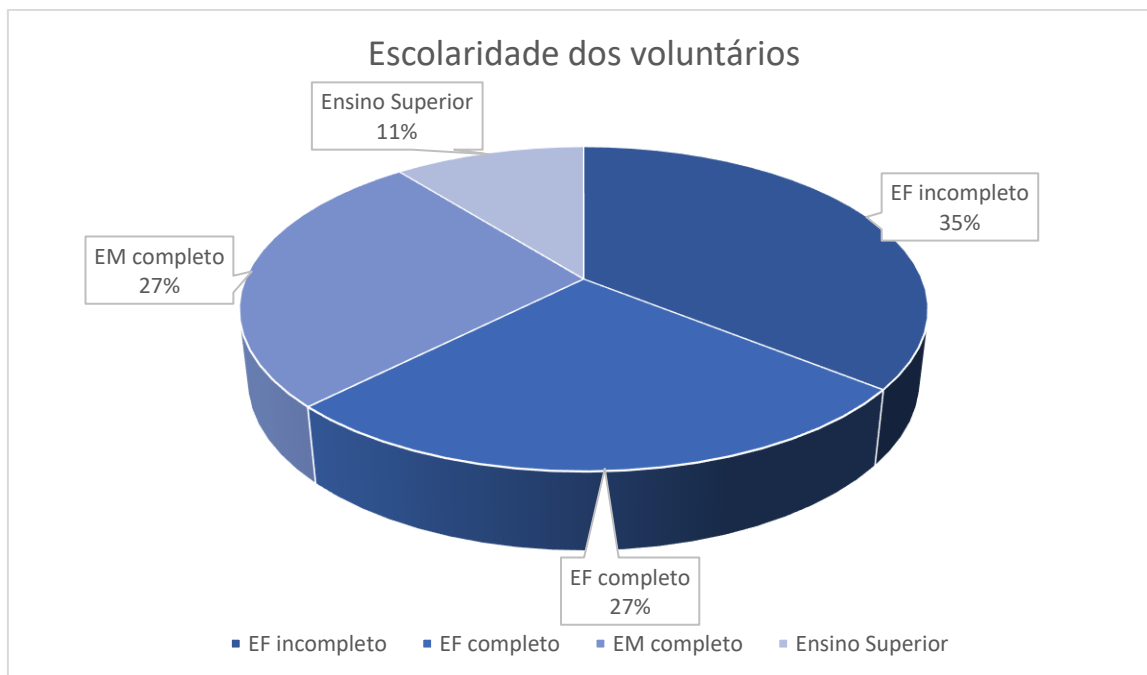


Figura 11. Análise comparativa entre o grau de escolaridade e o número de indivíduos portadores de feridas cutâneas. Os dados estão apresentados como números absolutos do número total de voluntários (n=14) classificados em diferentes graus de escolaridade, distribuídos em Ensino superior (ES), ensino fundamental (EF) ou ensino médio (EM) completo e incompleto.

Com relação a atividade física e grau de escolaridade, podemos observar na figura 12 que os voluntários com menor índice escolar apresentavam-se mais sedentários. Essa característica acaba sendo observada também quanto a alimentação e hábitos diários desses pacientes, quer por estar envolvidos em trabalhos braçais intensos, quer por baixo índice econômico.

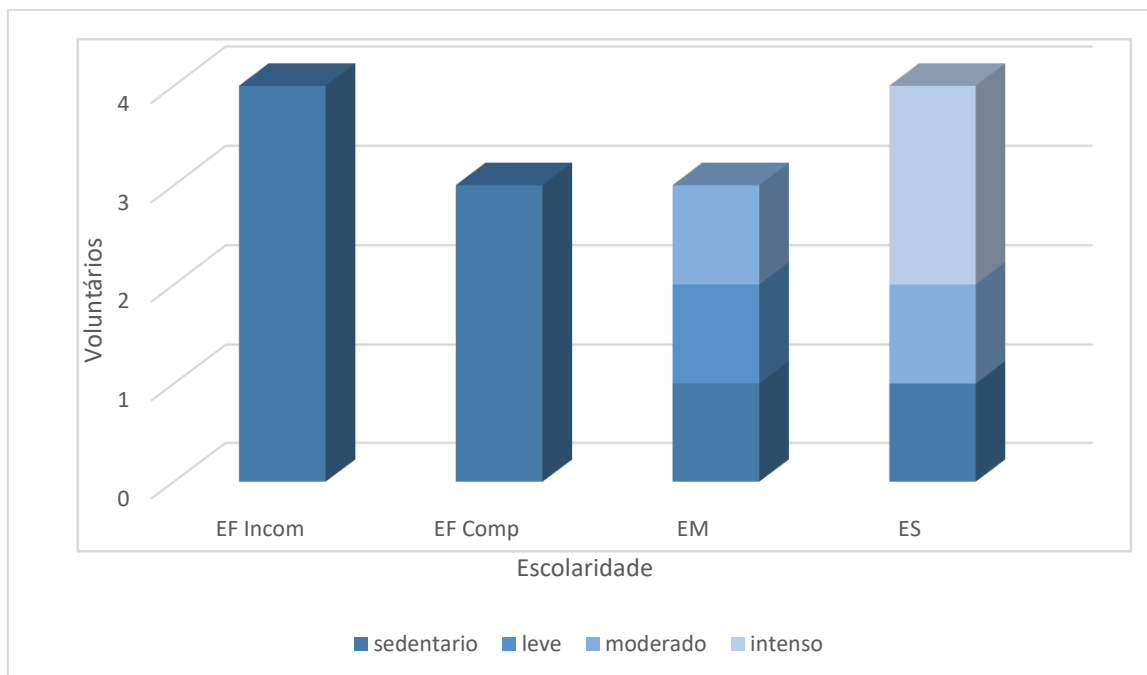


Figura 12. Análise comparativa entre o grau de escolaridade e a atividade física dos indivíduos portadores de feridas cutâneas. Os dados estão apresentados em números absolutos do total de voluntários (n=14) classificados em diferentes graus de escolaridade (eixo x) distribuídos em Ensino superior (ES), ensino fundamental (EF) ou ensino médio (EM) completo e incompleto. O eixo y demonstra o número total de voluntários em cada categoria.

5.2 Análise comparativa da nitração de proteínas (3-NT) em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

De acordo com a análise da expressão de resíduos de nitrotirosina (3-NT) em proteínas de amostras de tecido de desbridamento (conjuntivo) mole e rígido da ferida cutânea, feita pela técnica de *Slot Blot*, os resultados mostram, em unidades arbitrárias (UA), que o tecido conjuntivo mole não exibiu diferença significativa da expressão da 3-NT em relação àquela medida no tecido de desbridamento mais rígido (figura 13A). Essa avaliação foi realizada baseada em análise densitométrica, expressa em UA, a qual é obtida pela razão entre a densitometria mensurada com o anticorpo específico em relação a densitometria obtida pela marcação do Ponceau (figura 13B).

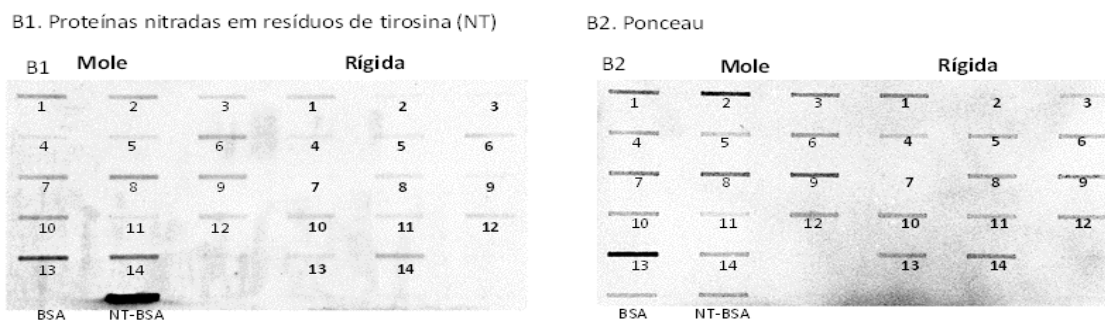
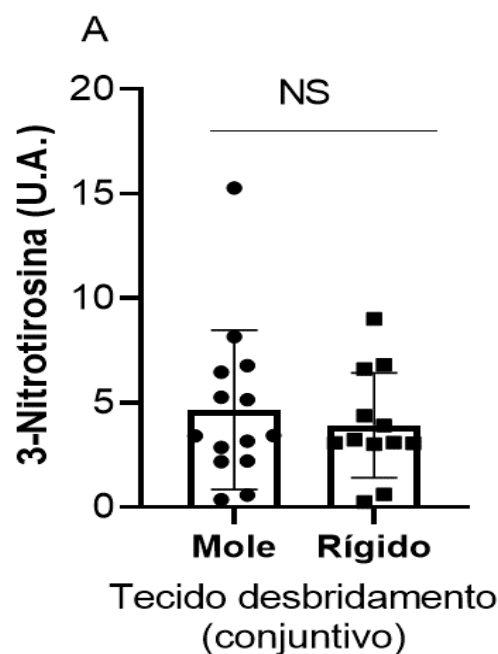
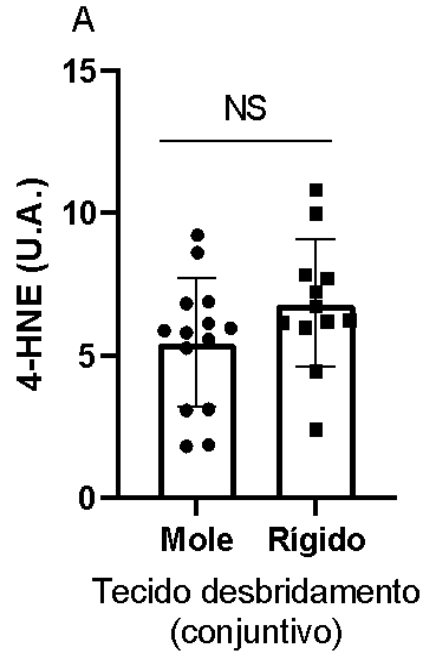


Figura 13. Análise do perfil de nitração de proteínas (3-NT) em indivíduos portadores de feridas cutâneas. (A) A expressão proteica da 3-NT foi avaliada com base na técnica de slot blot (B) e apresentados como média \pm D.P. (n = 12-14) em gráfico de dispersão com barras. A análise densitométrica expressa em UA, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-3-NT pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau, é mostrada no painel B para cada material biológico obtido de cada paciente. O Painel B1 mostra as bandas imunorreativas anti-nitrotirosina em amostras de tecidos moles e rígidos. O Painel B2 mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para normalização da quantidade de proteínas nas amostras. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras biológicas variadas (n=12-14). Albumina de soro bovino (BSA) foi usado como controle negativo e a BSA nitrada com peroxinitrito *in vitro* (NTBSA) foi usada como controle positivo.

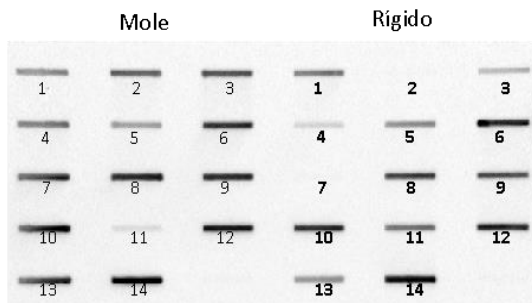
5.3 Análise comparativa da expressão proteica de 4-hidroxinonenal (4-HNE) em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

A figura 14A mostra que a análise feita pela técnica de *Slot Blot* em amostras de tecido de desbridamento (conjuntivo) mole e rígido, revelou que a expressão proteica da 4-HNE, medida em UA, não revelou diferença significativa da expressão dessa proteína entre os tecidos mole e rígido. A análise densitométrica, expressa em UA, é dada pela razão entre a

densitometria obtida com o anticorpo anti-4HNE em relação a densitometria obtida pela marcação do Ponceau (Figura 14 B1 e B2).



B1. Proteínas modificadas por 4HNE



B2. Ponceau

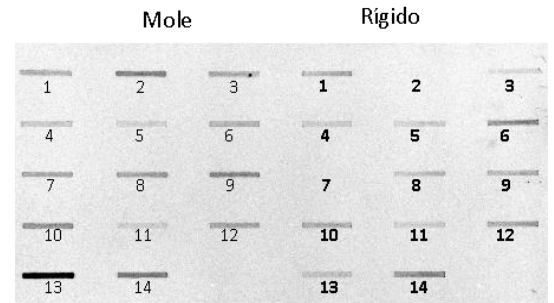


Figura 14. Perfil de expressão proteica da 4-HNE em indivíduos portadores de feridas cutâneas. (A) A expressão proteica da 4HNE foi avaliada com base na técnica de Slot Blot (B) e apresentados como média \pm D.P. (n = 12-14) em gráfico de dispersão com barras. A análise densitométrica expressa em UA, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-4HNE pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau, é mostrada no painel B para cada material biológico obtido de cada paciente. O **Painel B1** mostra as bandas imunorreativas anti-4HNE em tecidos moles e rígidos. O **Painel B2** mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras biológicas variadas (n=12-14).

5.4 Análise comparativa da expressão de proteínas carboniladas em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

Pela análise de *Slot Blot* no tecido de desbridamento de pacientes com UV, a expressão de proteínas carboniladas mostrou-se reduzida ($P < 0,05$) no tecido rígido em relação ao tecido conjuntivo mole (figura 15). Conforme ilustra a figura 15 B1, a expressão de proteínas carboniladas em amostras de desbridamento pode ser observada pelas bandas imunorreativas para anti-DNP (dinitrofenil) em amostras de tecido moles e rígidos. O painel 15 B2 mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas das amostras.

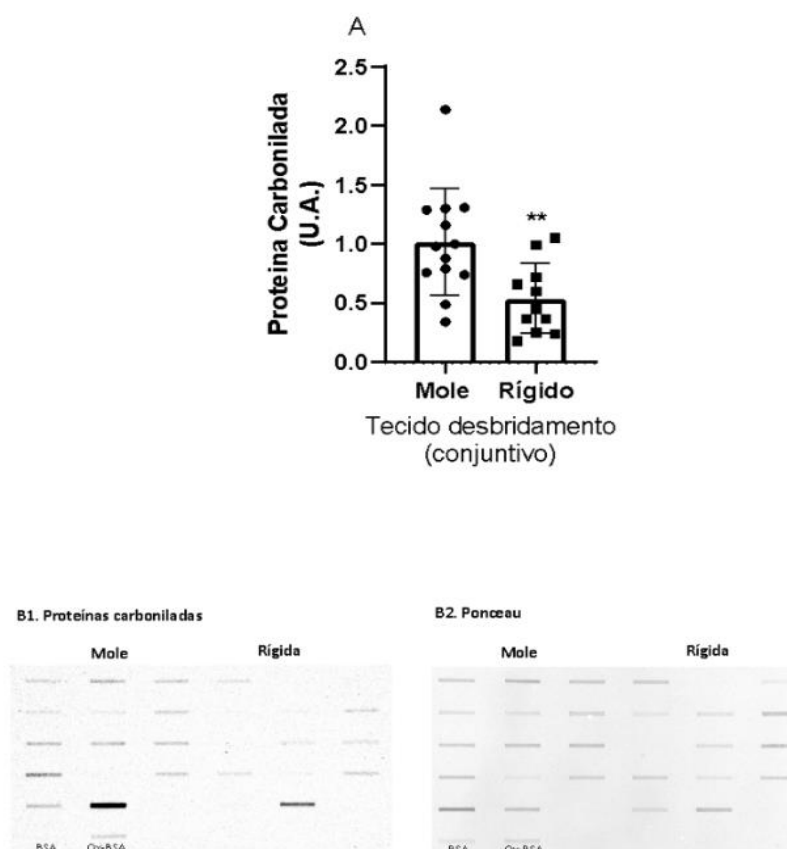


Figura 15. Perfil de expressão de proteínas carboniladas em indivíduos portadores de feridas cutâneas. (A) A expressão de proteínas carboniladas foi avaliada com base na técnica de Slot Blot e apresentados como média \pm D.P. ($n = 12-14$) em gráfico de dispersão com barras, em que $P < 0,05$ vs. tecido mole (Teste-t não pareado). A análise densitométrica expressa em UA, é dada pela razão entre a densitometria obtida com anti-BSAox pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau. O **Painel B1** mostra as bandas imunorreativas para proteínas carboniladas (BSAox) em tecidos moles e rígidos. O **Painel B2** mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras de pacientes diversos ($n=12-14$). Albumina de soro bovino (BSA) foi usado como controle negativo e a BSA oxidada na presença de H_2O_2 e $FeCl_3$ *in vitro* (BSAox) foi usada como controle positivo.

5.5 Análise comparativa da expressão proteica das enzimas envolvidas na síntese de H₂S (CBS, CSE e 3-MST) em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

A análise feita pela técnica de *Western Blotting* em amostras de tecido de desbridamento (conjuntivo) mole e rígido, revelou que a expressão proteica da CBS, medida em unidades arbitrárias (UA), apresentou-se significativamente reduzida em tecido rígido ($P < 0,05$) quando comparado com o tecido mole (Figura 16A). Ao contrário, a expressão proteica da CSE revelou-se marcadamente aumentada no tecido rígido em relação ao mensurado no tecido mole (Figura 16B). A análise da expressão proteica da 3-MST revelou ausência de diferenças significativas na expressão dessa proteína entre os tecidos (Figura 16C).

No painel B1 e B2 visualizamos as bandas imunorreativas para o anticorpo anti-CBS e CSE, menor expressão da 3-MST, em amostras de tecidos moles e rígidos, respectivamente. Para a quantificação da expressão proteica de todas as enzimas (CBS, CSE e 3-MST), a análise densitométrica, expressa em UA, foi calculada com base na razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-CBS, CSE ou 3-MST em relação a densitometria obtida pela marcação do Ponceau (Figura 16 B1 e B2, respectivamente).

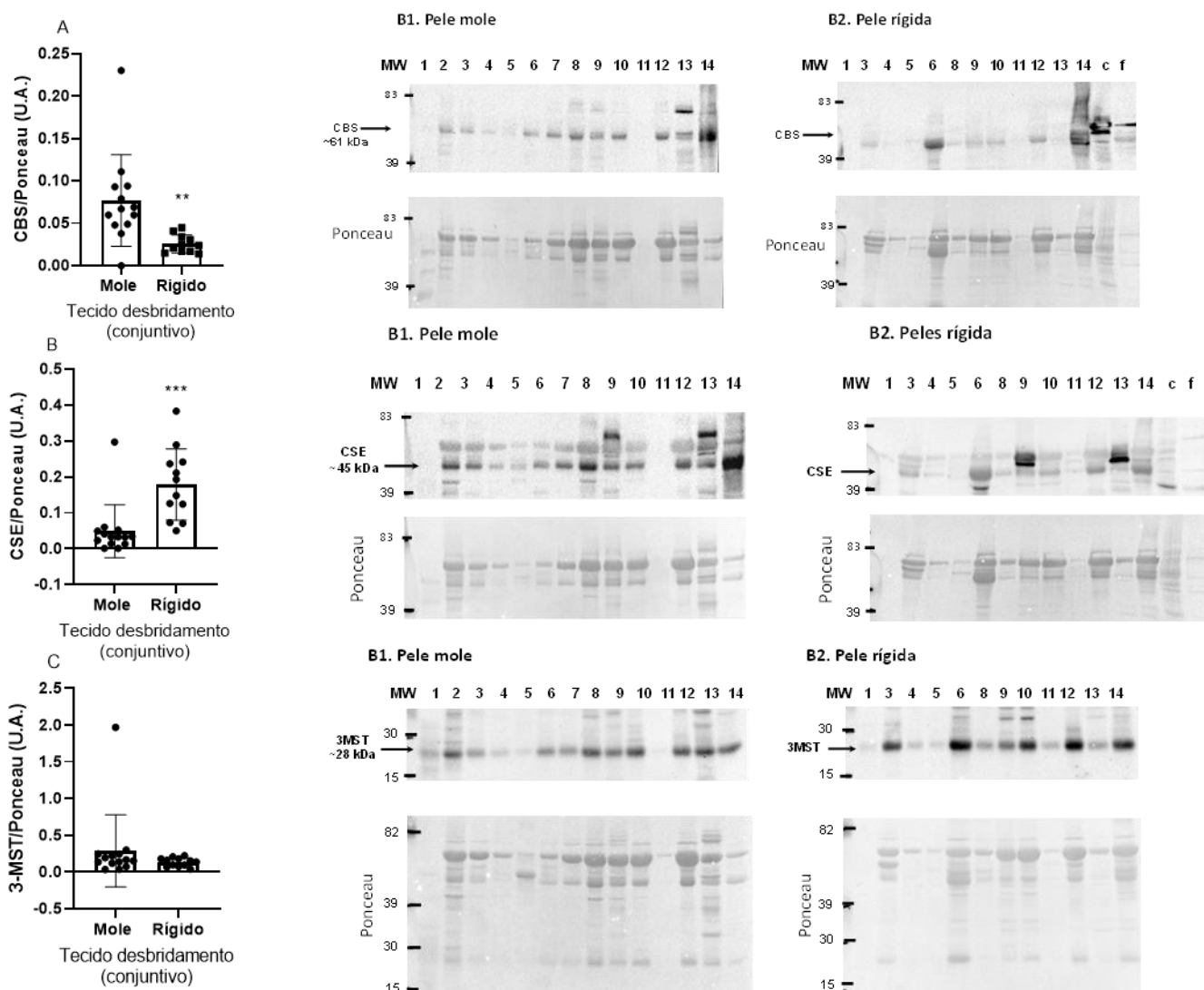


Figura 16. Perfil de expressão proteica das enzimas CSB, CSE e 3-MST envolvidas na biossíntese de H₂S em feridas cutâneas. A expressão proteica da CBS (A), CSE (B) e CSE (C) foi avaliada com base na técnica de Western Blotting e apresentados como média ± D.P. (n = 12-14) em gráfico de dispersão com barras. (A) P<0,05 vs. tecido mole teste paramétrico t-student não pareado e (B) análise não paramétrica e pós teste (Mann Whitney test). A análise densitométrica expressa em UA, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-CBS, CSE or 3-MST pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau, é mostrada nos respectivos painéis B para cada material biológico obtido de cada paciente. O **Painel B1** mostra as bandas imunorreativas anti-enzimas em tecidos moles e rígidos. O **Painel B2** mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras. Cada poço recebeu 2,5 µg de proteínas de amostras biológicas variadas (n=12-14).

5.6 Análise comparativa da expressão proteica da IL-1 β em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

A análise pela técnica de *Slot Blot* em amostras de tecido de desbridamento (conjuntivo) mole e rígido, revelou que a expressão proteica da IL-1 β , medida em UA, não demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) na expressão dessa proteína entre os tecidos mole e rígido. A análise densitométrica, expressa em UA, é dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-IL-1 β em relação a densitometria obtida pela marcação do Ponceau, conforme ilustra a figura 17B.

O painel B1 e B2 apresentam bandas imunorreativas para o anticorpo anti-IL 1 β em amostras de tecidos moles e em tecidos rígidos, demonstrando a expressão da IL-1 β . O painel na parte inferior mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas das amostras. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras de pacientes diversos (n=14). Albumina de soro bovino (BSA) foi usado como controle negativo e a BSA oxidada na presença de H₂O₂ e FeCl₃ in vitro (BSAox) foi usada como controle positivo.

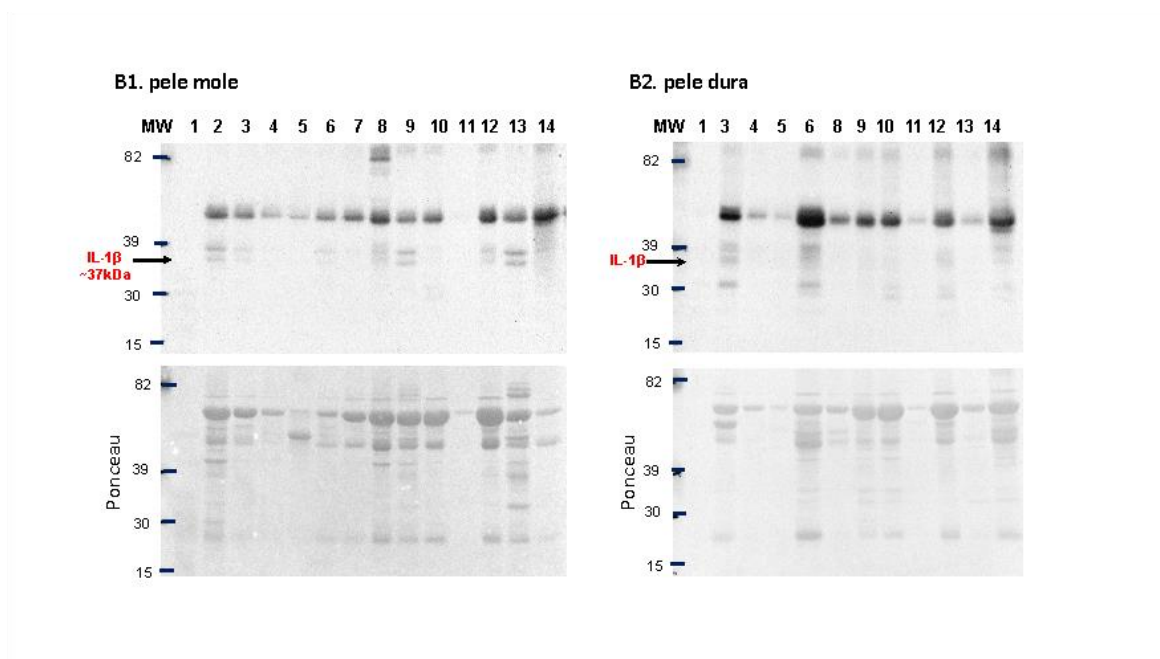
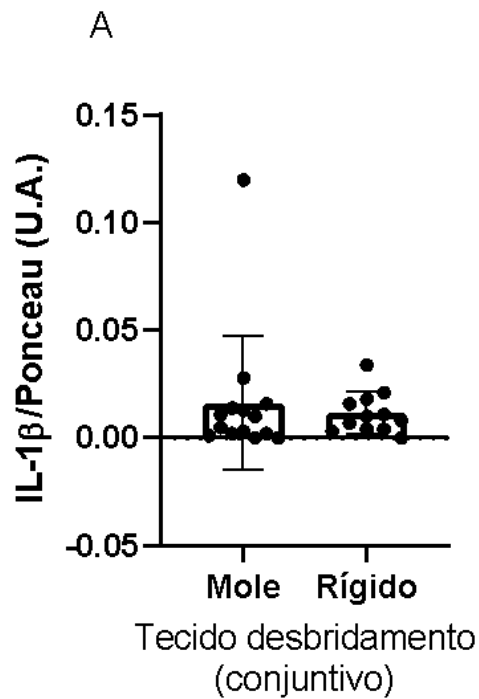


Figura 17. Perfil de expressão proteica da IL-1 β em feridas cutâneas. A expressão proteica da essa citocina foi avaliada com base na técnica de Slot Blot e apresentados como média \pm D.P. (n = 12-14) em gráfico de dispersão com barras (A). O Painel B1 mostra as bandas imunorreativas anti-enzimas em tecidos moles e rígidos. O Painel B2 mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras biológicas variadas (n=12-14).

5.7 Análise comparativa da expressão proteica e atividades de diferentes metaloproteinases (MMP 1-8, MMP 2 e 9, MMP 3) em tecido de desbridamento (conjuntivo) moles e rígidos obtidos de feridas cutâneas

A figura 18A mostra que a análise feita pela técnica de *Slot Blot* em amostras de tecido de desbridamento (conjuntivo) mole e rígido, para a expressão proteica da MMP 1-8 (região assinalada), medida em UA, não revelou diferença significativa da expressão dessa proteína entre os tecidos. A análise densitométrica, expressa em unidades arbitrárias, é dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo anti-MMP 1-8 em relação a densitometria obtida pela marcação do Ponceau, conforme ilustra a figura 18B. Painel B1 e B2 mostram a expressão da MMP 1-8 através de bandas imunorreativas para o anticorpo anti-MMP 1-8 em amostras de tecidos moles e em tecidos rígidos. O painel inferior mostra a coloração com vermelho de Ponceau utilizado para a normalização da quantidade de proteínas das amostras

As figuras 19A e B e 20A mostram que a % de ativação para MMP 9 e pró-MMP-3, mas não MMP2, é estatisticamente maior em tecido rígido do que em tecido de granulação. Essa análise feita por zimografia é demonstrada no painel C1 com as densitometrias das bandas para ativação de MMP 2, 3 e 9 em amostras de tecidos moles (granulação), e o painel C2 em tecidos rígidos, utilizando o método de zimografia.

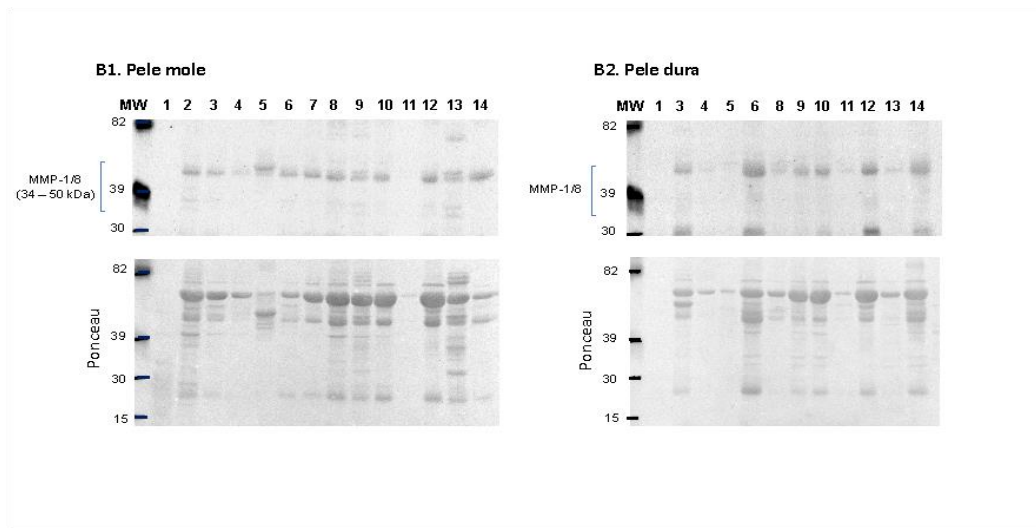
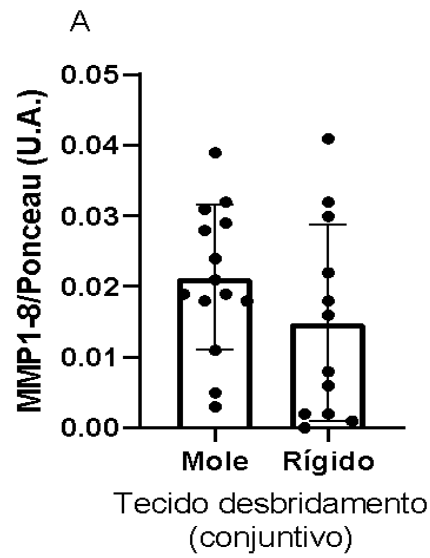


Figura 18. Expressão proteica da MMP 1-8 em tecido conjuntivo obtido do desbridamento de feridas cutâneas. Os dados estão expressos como média \pm DP para $n=12-14$. Cada poço recebeu 2,5 μ g de proteínas de amostras de pacientes diversos ($n=14$). Albumina de soro bovino (BSA) foi usado como controle negativo e a BSA oxidada na presença de H_2O_2 e $FeCl_3$ in vitro (BSAox) foi usada como controle positivo.

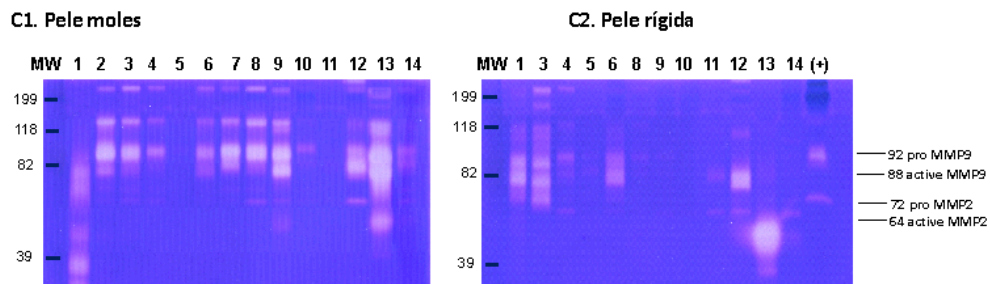
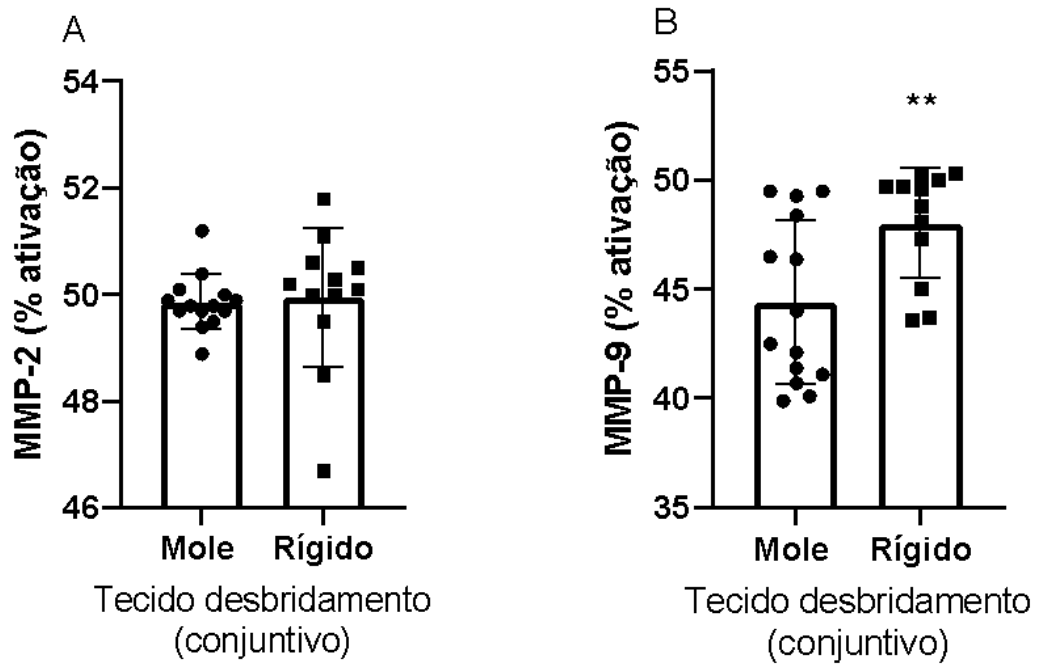


Figura 19. Percentual de ativação das MMP 2 e 9 no tecido conjuntivo obtido do desbridamento da ferida cutânea. (A) Os dados estão expressos como média \pm DP para $n= 12-14$. $**P < 0,01$ vs. tecido mole, (análise paramétrica – teste-*t* não pareado). Painéis C1 e C2 ilustram por análise de zimografia a densitometrias das bandas para ativação de MMP 2 e 9 em amostras de tecidos moles e rígidos, respectivamente. O método de zimografia foi feito com gelatina 1% como substrato, e soro fetal bovino (SFB) foi utilizado como controle positivo para a marcação das MMPs.

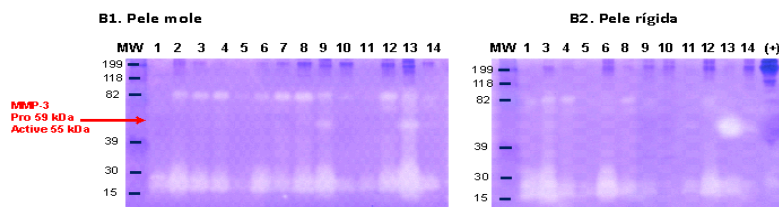
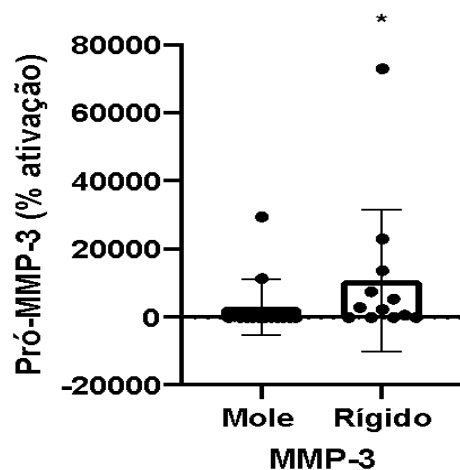


Figura 20. Percentual de ativação da pró-MMP 3 em tecido conjuntivo obtido do desbridamento da ferida cutânea. (A) Os dados estão expressos como média \pm DP para $n=12-14$. Painéis C1 e C2 ilustram por análise de zimografia a densitometrias das bandas para ativação de MMP 2 e 9 em amostras de tecidos moles e rígidos, respectivamente. O método de zimografia foi feito com gelatina 1% como substrato, e soro fetal bovino (SFB) foi utilizado como controle positivo para a marcação das MMPs. $**P<0,05$ vs. tecido mole, (teste não paramétrica – *Mann Whitney test*).

5.8. Correlação entre o escore de dor / alodínia mecânica e a idade dos pacientes portadores de feridas cutâneas

A figura 21A mostra a distribuição do escore de dor e a correlação com a idade dos voluntários, em que se observou o aumento no escore de dor não está diretamente relacionado com a idade dos indivíduos.

Quando avaliado o limiar de alodínia mecânica na proximidade da ferida ($\cong 2$ cm), o teste de von Frey revelou que o limiar de alodínia mecânica nos portadores de ferida variou

entre $\cong 0,5$ e 2 g (figura 17B). Quando avaliado o limiar de resposta mecânica frente a idade dos indivíduos (Von Frey), verificou-se que mais de 50% dos estudados foram responsivos ao estímulo mecânico $<$ ou igual a 1 g (figura 17C).

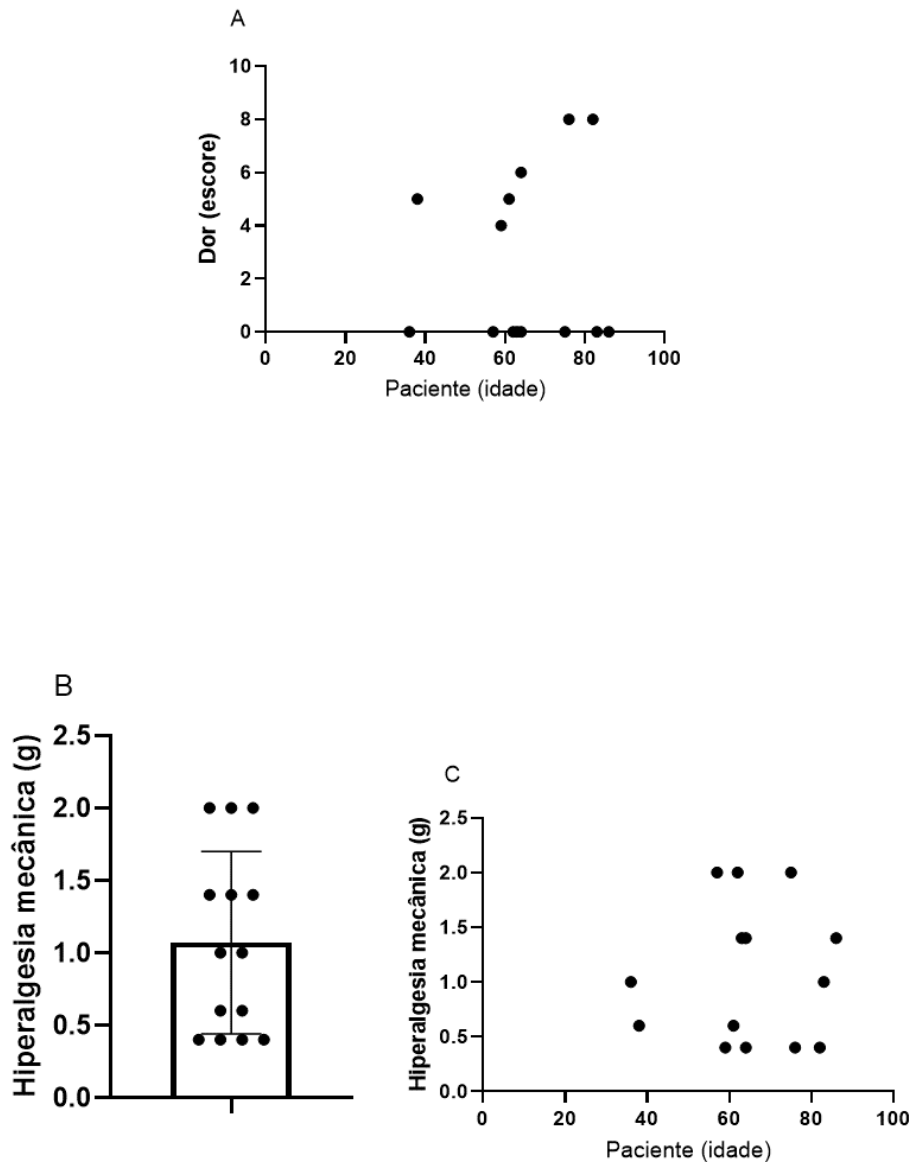


Figura 21. Análise do perfil nociceptivo e hipernociceptivo (alodínia mecânica) dos indivíduos portadores de feridas cutâneas. (A) Avaliação do escore de dor foi realizado baseado no ENV referido durante o exame físico realizado com os voluntários. (B) O limiar mecânico dos voluntários foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (**range de 0,08 – 4 g**) e apresentados como média \pm D.P. ($n = 14$) em gráfico de dispersão com barra. (C) esse mesmo limiar mecânico dos voluntários foi feito em relação a idade, utilizando filamentos de von Frey e apresentado como valor absoluto em relação a idade (**range de 0,08 – 4 g**).

5.9. Efeito da nanoformulação contendo ATB 346 na pele integra (naïve) de voluntários de ambos os sexos

A fim de avaliar a ação inócua do veículo (nanoformulação) para o doador de H₂S *per se*, o sistema de entrega desenvolvido no laboratório foi aplicado diariamente, ao longo de 20 dias, na pele integra de 6 voluntários de ambos os sexos (3 masculinos e 3 femininos), de idade variando entre 42 e 65 anos, sendo que dois deles relataram comorbidades como HAS e DM.

De acordo com a tabela 6, a análise de parâmetros visuais inflamatórios (hiperemia, descamação), assim como sensitivos (prurido/irritação) revelou que, dos 6 voluntários examinados, 2 deles (n= 2) apresentaram no 20º dia, mas não no 8º dia, discreta descamação local, sendo que, em um deles, esse efeito foi associado a hiperemia. Esse mesmo indivíduo referiu discreta hipersensibilidade local ao toque (hipersensibilidade mecânica), de grau brando.

Voluntário	Sexo	Irritação			Prurido			Hiperemia			Descamação		
		D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀
1	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+
2	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
4	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média		0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+

Tabela 6 - Avaliação da aplicação tópica da nanoformulação com ATB 346 em pele integra no período de 20 dias, aplicada diariamente. Parâmetros sensitivos e visuais inflamatórios forma observados. Dados apresentados de forma qualitativa.

5.10. Efeito analgésico e cicatrizante da nanoformulação contendo o doador de H₂S híbrido, ATB-346, na pele de um indivíduo portador de úlcera venosa de grau II

Considerando que a segurança da nanoformulação foi averiguada e considerada satisfatória na pele sadia de voluntários, o doador de H₂S híbrido ATB – 346 foi adicionado à formulação e o efeito desse sistema de entrega foi avaliado em um paciente portador de UV de grau moderado (II). Parâmetros inflamatórios distintos (descamação local e periférica, irritação/calor local e periférica, hiperemia, extensão da ferida e exsudato) e sensitivos (hiperalgesia mecânica, dor referida local e secundária) foram mensurados.

Voluntário do sexo masculino, 40 anos, portador de HAS há 5 anos, obeso, alimentação rica em sódio (fast food), sem atividade física diária, desempregado na ocasião, com

antecedente de trombose venosa profunda (TVP) em 2016 no mesmo membro, fazendo uso de anticoagulante Warfarina (Marevan[®]). Ferida inicial (3,2 x 1,9 cm), localizada em 1/3 inferior de perna direita há mais de 2 meses, resultante de acidente doméstico com arame de aço e de difícil cicatrização em tratamento prévio com Hidrogel[®] no Ambulatório de Estomatoterapia. Classificada como úlcera de grau II, a ferida apresentava bordas secas, sem fibrina local, pouco exsudato e pouco sangramento após a limpeza local. Ao primeiro exame, relatou, segundo os critérios pré-determinados, ardência na área central da UV (ENV = 5) e, também, ao redor da UV hiperalgesia local (ENV=10), alodínia até 5 cm da borda da lesão e hiperemia local moderada (++).

No D₀, antes do tratamento, a medida do limiar nociceptivo mecânico (alodínia mecânica), avaliado pelo teste de Von Frey na região (início a 5 cm da borda da UV) revelou redução importante desse parâmetro (tabela 7 e 8, anexo VII). Após orientação sobre o uso da fórmula teste, ressaltamos que os curativos teriam trocas diárias por um profissional da área da saúde.

Voluntário	Sexo	Irritação			Prurido			Hiperemia			Descamação		
		D ₀	D ₄	D ₆	D ₀	D ₄	D ₆	D ₀	D ₄	D ₆	D ₀	D ₄	D ₆
1	♂	++	+	++	+	0	+	+	++++	++++	+	++++	++++

Tabela 7. Avaliação da aplicação tópica da nanoformulação com ATB 346 em pele com úlcera grau II no período de 6 dias, aplicada diariamente. Parâmetros sensitivos e visuais inflamatórios forma observados. Dados apresentados de forma qualitativa.

De acordo com figura 22, o tratamento com o sistema de entrega contendo o ATB-346, diário, promoveu analgesia a partir do 1º. dia, que perdurou até o fim do tratamento. Paralelamente, o teste de Von Frey aplicado numa região peri lesão revelou diminuição da zona de alodínia mecânica, quando comparado ao dia inicial do tratamento (tabela 8).

Durante o tratamento, ao exame no D₄, o paciente reportou pouca queixa de ardência no interior da úlcera, nenhuma ardência ao redor da mesma, pouca queixa de dor ao redor da UV (ENV=1) e sem queixa de dor no interior da mesma (ENV=0), como demonstra a tabela 8.

Dia	Tamanho úlcera (cm)	ENV local	ENV periferia	Zona de alodínia (cm)	Hiperemia local	Von Frey início percepção (g)	Von Frey limiar (g)
D ₀	3,2 x 1,9	5	10	5	++	1,0	4,0
D ₄	5,5 x 3,5	0	1	0	++++	2,0	4,0
D ₆	9,0 x 5,0	5	9	6	++++	1,0	4,0

Tabela 8 - Evolução temporal das características físicas da lesão e da percepção dolorosa em paciente utilizando formulação com ATB 346. Sendo hiperemia ++ (moderada) e hiperemia ++++ (grave, com sangramento local)

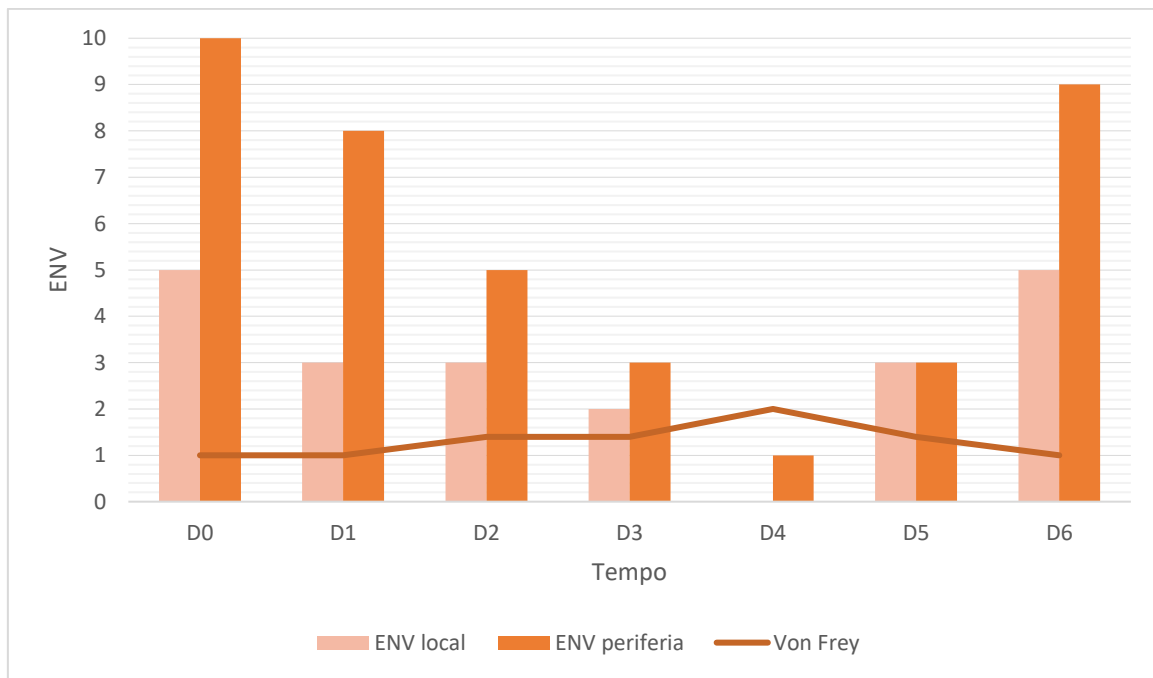


Figura 22. Avaliação da relação tempo (D0 a D6) - resposta de uso da formulação com ATB 346 e queixa álgica apresentada (ENV), zona de alodínia (cm) e teste de Von Frey (g).

Paralelamente, a análise da resolução da ferida inicial (3,2 x 1,9cm), localizada em 1/3 inferior de perna direita, revelou no 4º. Dia (D₄) de tratamento que o tamanho da ferida evoluiu com aumento importante da área ulcerada (5,5 x 3,5 cm), com o aspecto da lesão de forma macerada e úmida, inclusive com o surgimento de 2 novas lesões próximas a lesão inicial. Ao exame clínico, verificou-se que a pele ao entorno da UV apresentou-se com leve descamação local, intensa hiperemia ao redor da lesão e fragilidade cutânea exacerbada, apresentando sangramento ao leve toque. A zona de alodínia desapareceu, não apresentando mais esse tipo de queixa. Respondeu ao teste de Von Frey referindo início da percepção nociceptiva com cateter de 2,0g e início do limiar mecânico com 4,0g. Apesar da aparência pior das lesões, o paciente referia estar bem mais disposto inclusive para as tarefas diárias. Conseguia se movimentar e até iniciar uma caminhada (Anexo VII). A coleta das amostras de D₇ foram prejudicadas devidos ao sangramento local, sendo abortado esse procedimento. Houve necessidade de compressão local para diminuir o sangramento que ocorreu ao leve toque da região. Os sintomas apresentados (fragilidade da pele, hiperemia local, umidade) diminuíram após o D₆ e desapareceram a partir do D₁₀. Posteriormente notamos que as amostras colhidas em D₀ foram insuficientes para dosar todas as enzimas propostas no estudo. Devido a piora da lesão em termos de tamanho e condições locais, optamos por interromper o estudo com essa formulação. Foram colhidos debris em D₁₅ e D₂₀ para análise.

O follow-up revelou que, após 2 dias (D₆) de suspensão do tratamento, o paciente reportou dores de forte intensidade e a zona de alodínia aumentou para 6 cm das bordas. Foi encaminhado ao Ambulatório de Cirurgia Vascular, onde foi coletado exames bioquímicos e cultura bacteriológica do local da úlcera, foi prescrito antibióticos por suspeita de infecção associada e curativos com nitrato de prata. O paciente foi acompanhado por 4 meses até reportar melhora considerável. Os resultados dos exames bioquímicos coletados foram normais e não houve crescimento de bactérias ou fungos nos exames de cultura, descartando a hipótese inicial de infecção local.

5.11. Efeito da fórmula farmacopéica contendo doador lento (GYY 4137) na pele integra (naïve) de voluntários de ambos os sexos

A ação inócua do segundo sistemas de entrega (fórmula farmacopeica adaptada) para o doador de H₂S de liberação lenta GYY 417 *per se*, foi avaliada ao longo de 20 dias, na pele integra de 3 voluntários, com média de idade de 53 anos, sendo 2 do sexo masculino e 1 do

sexo feminino. Dois dos voluntários relataram comorbidades como HAS e DM tipo II em acompanhamento e tratamento. De acordo com a tabela 9, a análise de parâmetros visuais inflamatórios (hiperemia, descamação), assim como sensitivos (prurido/irritação) revelou que, dos 3 voluntários examinados, nenhum apresentou qualquer alteração como hiperemia, prurido ou descamação.

Voluntário	Sexo	Irritação			Prurido			Hiperemia			Descamação		
		D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀
1	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 9. Avaliação do curso temporal da aplicação tópica da fórmula farmacopeica em pele íntegra no período de 20 dias, aplicada diariamente. Parâmetros sensitivos e visuais inflamatórios foram observados. Dados apresentados de forma qualitativa.

Como observado, essa formulação não ofereceu qualquer sinal ou efeito desagradável nos usuários, não apresentando nenhum sinal de hiperemia ou prurido associado.

5.12 - Efeito comparativo do tratamento padrão hospitalar e a fórmula farmacopeica com e sem o doador de H₂S em pacientes portadores de UV de ambos os sexos

Nessa etapa obtivemos quatro voluntários para análise dos resultados, sendo que dois voluntários utilizaram o composto 1, um paciente utilizou o composto 0 e um paciente foi o controle com o tratamento padrão oferecido pelo hospital.

Voluntário 1: paciente controle, utilizou o tratamento padrão oferecido pelo Ambulatório de Estomatoterapia (curativo com Carvilon®, Nitrato de Prata – Exufiber AG® e Bota de Unna), masculino, 59 anos, negava alergias, HAS ou DM, negava uso de medicações de uso contínuo, úlcera grau II, em 1/3 superior de perna esquerda, medindo 2,2 x 2,9 cm, com prurido local intenso, exsudato seroso, hiperemia peri lesão, leito com tecido de granulação leve, negava queixa alérgica importante no interior da úlcera, porém com zona de alodínia importante de 2 cm peri lesão. Paciente sedentário, negava atividade física, profissão: segurança de depósito, nível escolar: EM incompleto.

Voluntário 2: paciente utilizou formulação denominada F0 (controle com apenas a fórmula farmacopeica) , feminino, 70 anos, negava alergias, HAS em uso de Losartana® (50 mg, 2x/dia)

e Hidroclorotiazida (25mg, 1x/dia), cardiopata (Digoxina 0,25 mg 1x/dia), apresentava úlcera grau II , em 1/3 médio de perna direita , medindo 1,0 x 0,7 cm , negava queixas álgicas no local da úlcera, porém zona de alodínia de 3 cm peri lesão com queixa importante, negava prurido, úlcera com pequeno exsudato seroso, discreta hiperemia peri lesão. Paciente sedentária, dona-de-casa, nível escolar: EM completo.

Voluntário 3: paciente utilizou formulação denominada F1 (formulação contendo GYY), feminino, 53 anos, úlcera pequena 0,5 x 0,3 cm em maléolo externo de perna esquerda, porém extremamente dolorosa, com zona de alodínia de 6 cm da borda da úlcera. Negava alergia, patologias prévias: HAS (em uso de Losartana 50mg 1x/dia) e Fator V de Leiden, já teve TVP 2 vezes no mesmo membro (última em 2016), discreta hiperemia peri lesão, sem exsudato. Paciente com atividade física leve (caminhadas a cada 2 dias), nível escolar: superior completo (diretora de escola).

Voluntário 4: paciente utilizou formulação denominada F1 (formulação contendo GYY), feminino, 41 anos, úlcera de grande extensão, quase toda face medial de perna direita, grau II, HAS em uso de Atenolol (25 mg 1x/dia), Losartana® (50 mg 2x/dia) e Hidroclorotiazida (25 mg 1x/dia), negava alergias. Devido à grande área dolorosa, paciente era extremamente resistente a realização de curativos, sendo normalmente realizado analgésicos endovenosos e Lidocaína 10% gel tópico antes do procedimento. Relatava que já havia abandonado o tratamento 2 vezes devido a intensa dor. Paciente sedentária, empregada doméstica desempregada, nível escolar: EF completo.

Na tabela 10 apresentamos os dados qualitativos das características apresentadas pelas úlceras e sua evolução temporal com o uso da formulação farmacopeica.

Voluntário	Sexo	Irritação			Prurido			Hiperemia			Descamação		
		D0	D8	D20	D0	D8	D20	D0	D8	D20	D0	D8	D20
1 – Controle	♂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2- F0	♀	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
3- F1	♀	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0
4- F1	♀	++	+	0	++	0	0	++	+	+	+	+	0

Tabela 10. Avaliação da aplicação tópica da fórmula farmacopeica em úlcera no período de 20 dias, aplicada diariamente. Avaliou-se qualitativamente alguns sinais como irritação, prurido, hiperemia e descamação

A tabela 11 mostra a evolução temporal da dor referida e da alodínia mecânica no membro afetado dos pacientes portadores de UV por um período de 20 dias. Demonstramos que tanto no paciente tratado com a terapia padrão (hospital) quanto com a fórmula sem GYY-4137, a dor referida foi discretamente reduzida no final do tratamento (D20); todavia, nos

pacientes tratados com a fórmula contendo GYY4137 e com maior grau de comprometimento da UV, foi possível observar ausência da dor referida ou redução importante da dor referida após 20 dias do tratamento.

Voluntário	ENV			Von Frey Início da percepção nociceptiva			Von Frey início do limiar mecânico		
	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀	D ₀	D ₈	D ₂₀
1-controle	5	6	5	1,0	0,6	1,0	4,0	4,0	4,0
2-F0	5	4	4	0,6	0,6	1,0	4,0	4,0	4,0
3-F1	10	5	0	0,4	1,0	1,4	4,0	4,0	6,0
4-F1	10	6	2	0,16	1,0	1,4	2,0	4,0	4,0

Tabela 11. Avaliação com relação aos parâmetros de analgesia segundo a ENV (Escala Numérica Visual – 0 sem dor, 10 a pior dor possível) e teste de Von Frey

Em relação à análise de limiar mecânico, na área primária da UV, foi possível observar que o tratamento com a terapia hospitalar, assim como com a fórmula sem o GYY4137 promoveu pequeno aumento do limiar mecânico em relação ao limiar mensurado antes do tratamento. Todavia, nos pacientes com UV de maior complexidade e cujos limiares mecânicos basais foram menores que 1, demonstramos que o tratamento com a fórmula contendo o GYY4137 aumentou marcadamente o limiar mecânico na região primária e, também, secundária após 8 e 20 dias de tratamento (tabela 11, figura 23).

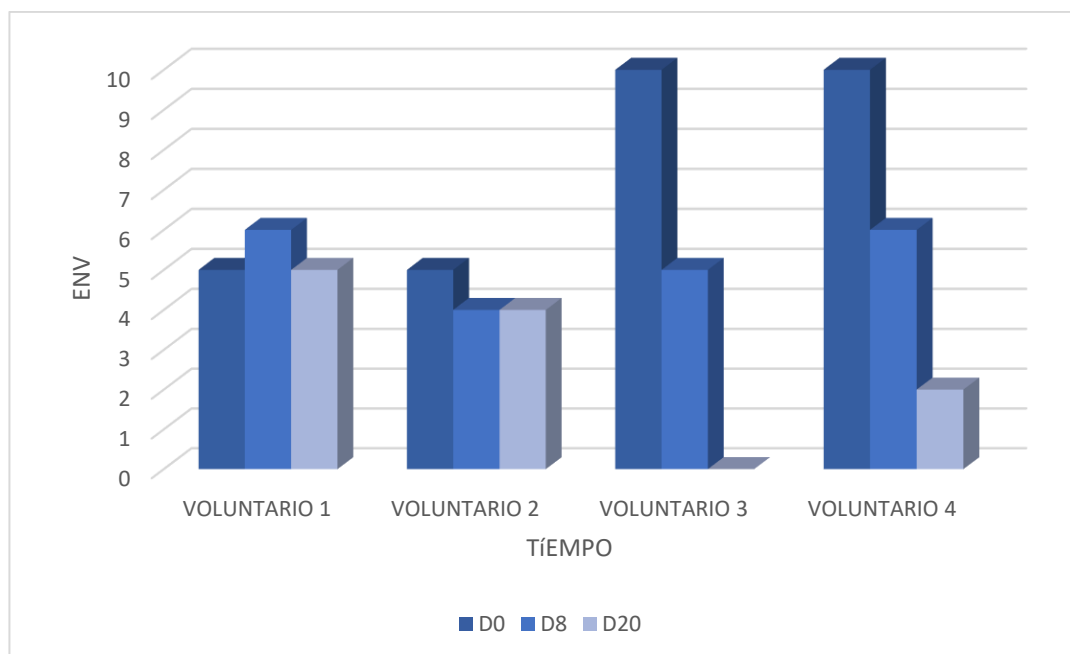


Figura 23. Análise quanto a relação tempo-evolução analgésica dos voluntários que utilizaram a formulação farmacopeica.

Pacientes que utilizaram a formulação F1 não referiram qualquer outra queixa ou piora do estado inicial do tratamento, fato que possibilitou a continuidade do estudo.

Na tabela 12 demonstramos as amostras relacionadas a cada voluntário durante os testes.

AMOSTRA	VOLUNTÁRIO
1	2 – D ₀
2	2 - D ₇
3	3 - D ₀
4	3 – D ₇
5	4 - D ₀
6	4 - D ₇
8	Paciente ATB D ₁₅
9	Paciente ATB D ₂₀
10	1 – D ₀

Tabela 12. Demonstrativa das amostras relacionadas aos voluntários

5.13- Avaliação de expressão protéica das enzimas geradoras de H₂S (CBS, CSE e 3MST), IL-1 β e MMP-1/8 por Western Blot

As amostras de debris coletadas da pele foram pulverizadas em nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 100 μ L de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF, leupeptina (10 μ g/ml), inibidor de tripsina (10 μ g/ml) e aprotinina (2 μ g/ml). Em seguida os homogenatos foram centrifugados 10000 g, 10 minutos e os sobrenadantes foram

submetidos a análise de proteínas (Bradford, 1977) utilizando-se uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 2,5 a 50 µg/ml. As amostras foram devidamente diluídas em água Milli-Q e reagente de Bradford foi adicionado. A leitura das absorbâncias a 595 nm foi realizada em leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, EUA).

As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e fervidas em banho-maria por 5 min.

Em seguida, as proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). Durante a eletroforese foi utilizado tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS e aplicada uma amperagem constante de 35 mA durante 2 horas. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas por eletroforese em sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (200 mA, ~65 V; 1,5 horas). Durante a transferência foi utilizado tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas por vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético 5%) que foram fotografadas em sistema ChemiDoc (Bio Rad, EUA). Em seguida os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 3% de albumina de soro bovino (BSA) em TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20). A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas (Tabela 13) e após lavagens apropriadas (6x 10 min com TBS-t) as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP). Novamente as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens (6x 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas mediante um kit de revelação, com emissão de quimioluminescência do tipo ECL em fotodocumentador Chemi Doc (Bio Rad, EUA). As bandas foram analisadas por densitometria e normalizadas pela densitometria dos respectivos *lanes* obtidas após coloração com vermelho de Ponceau.

Proteína	PM (kDa)	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
[⁵⁶⁵⁶⁶⁶ CBS	~60	Anti CBS (monoclonal, camundongo); Abnova, 1:1500	Anti camundongo + HRP (Bio Rad), 1:4000
CSE	43-45	Anti CSE (policlonal, coelho); Proteintech, 1:1000	Anti coelho + HRP (Sigma), 1:4000
3MST	~32	Anti MPST (policlonal, camundongo); Abnova, 1:1500	Anti camundongo + HRP (Bio Rad), 1:4000
IL-1 β	17-31	Anti IL-1 β (monoclonal, coelho); Cell Signaling, 1:1000	Anti coelho + HRP (Sigma Rad), 1:4000
MMP-1/8	~45	Anti MMP-1/8 (monoclonal, camundongo); Santa Cruz, 1:500	Anti camundongo + HRP (Bio Rad), 1:4000

Tabela 13. Anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas

5.14- Análise da expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina (NT), 4HNE e proteínas carboniladas por “slot blot”

As amostras preparadas para Western Blotting foram diluídas em tampão TRIS 50 mM, pH 7,4 contendo 1mM de PMSF e coquetel de inibidores de protease para uma concentração de proteínas totais de 12,5 μ g/mL. Em seguida, 2,5 μ g de proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do sistema slot blot utilizando-se vácuo. As membranas foram então coradas com solução de vermelho de Ponceau e fotografadas a fim de verificar-se a eficiência da transferência (e em seguida foram descoradas com água ou TBS-t).

No caso da análise das proteínas carboniladas, as amostras foram aplicadas em duas membranas, sendo que, uma das membranas foi submetida à reação de derivatização com o reagente DNPH 0,1 mg/mL (preparado em HCl 2N) durante exatamente 5 min e a outra não (não derivatizada, incubada somente com a solução de HCl 2N). Após 3 lavagens das membranas com solução de HCl 2N e depois com solução TBS-t + metanol (1:1), as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (BSA 3% em TBS-t) por uma hora, sob agitação contínua.

Após esse período, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos (mostrados na Tabela 14) durante 16h sob agitação contínua a 18 °C, lavadas com TBS-t (6x 10min) e incubadas com o anticorpo secundário por duas horas. Após nova série de lavagens, as membranas foram submetidas à revelação conforme descrito para western blotting.

Proteína	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
NT	Anti nitrotirosina (monoclonal, camundongo); Millipore, 1:1000	Anti camundongo (cabra) + HRP (Bio Rad), 1:4000
4HNE	Anti CSE (policlonal, cabra); Bio Rad, 1:1000	Anti cabra (burro) + HRP (Sigma), 1:4000
Anti-DNP	Anti DNP (policlonal, coelho); Abcam, 1:25.000	Anti coelho (cabra) + HRP (Sigma), 1:10.000

Tabela 14. Anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas

5.15. Determinação da atividade das enzimas metaloproteinases de matriz por zimografia: MMP2 e MMP9 através da atividade gelatinolítica e MMP3 pela atividade caseinolítica.

As amostras de debris coletadas da pele foram homogeneizadas em 100 µL de tampão TRIS 50mM, pH 7,4, contendo 1% triton X-100 e centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4 °C). Os sobrenadantes das amostras foram coletados e dosadas as proteínas por Bradford. Finalmente, as amostras foram preparadas em tampão não denaturante e aplicadas em gel de zimografia que consiste em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), próprio para avaliação de proteínas, contendo substrato enzimático (gelatina 1% para MMP-2 e MMP-9, e β-caseína 0,25% para MMP-3).

Em cada gel foram aplicados o padrão de peso molecular (Precision Plus, Bio-Rad, Canadá) e controle positivo (soro fetal bovino, 1,25 µL). As amostras foram pipetadas nos respectivos géis (2,5 a 5 µg por poço) e submetidas à eletroforese (120 V, 20 mA, 90 min). Os géis foram então lavados em solução contendo 2,5% de Triton X-100 para eliminar o dodecil sulfato de sódio (SDS) e em seguida, foram incubados durante 18 h, sob temperatura de 37°C, em tampão Tris-HCl 200 mM pH 7,4 contendo CaCl₂ 10 mM, para que as enzimas renaturassem e degradassem o substrato proteico (Kuntze et al., 2014). Após a incubação, o gel foi corado durante 30 minutos com Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,05% de Coomassie Blue, 10% de ácido acético e 30% de metanol) e descolorido na mesma solução sem o corante por tempo suficiente para a visualização das bandas.

As atividades das MMP2 e 9 (gelatinolíticas) e MMP3 (caseinolítica) foram detectadas como bandas descoloridas em contraste com o fundo azul do gel. As imagens dos géis foram escaneadas e a quantificação densitométrica destas bandas foi realizada utilizando-se o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os valores de densitometria das MMPs ativas presentes nas amostras foram expressos em % com D.

5.16. Avaliação de expressão protéica das enzimas geradoras de H₂S (CBS, CSE e 3MST), IL-1 β e MMP-1/8 por Western Blot

Para a expressão da enzima CBS, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a mesma no D₇ (amostras 1 e 2). Da mesma forma, a formulação com GYY-4137 aumentou a expressão de CBS no D₇ (amostras 3 e 4, 5 e 6). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 também reduziu esta expressão no dia D₂₀ em relação ao D₁₅ do tratamento (amostras 8 e 9, figura 24).

Para a expressão da enzima CSE, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a mesma 7 dias na amostra D₇ (amostras 1 e 2). Da mesma forma, a formulação com GYY aumentou a expressão de CSE no D₇ (amostras 3 e 4, 5 e 6). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 também reduziu esta expressão no D₂₀ em relação ao D₁₅ do tratamento (amostras 8 e 9).

Já para a expressão da enzima 3-MST, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a mesma no D₇ (amostras 1 e 2). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 não alterou esta expressão (amostras 7, 8 e 9). Porém, a formulação com GYY aumentou a expressão de 3-MST 7 dias após o início do tratamento (amostras 3 e 4).

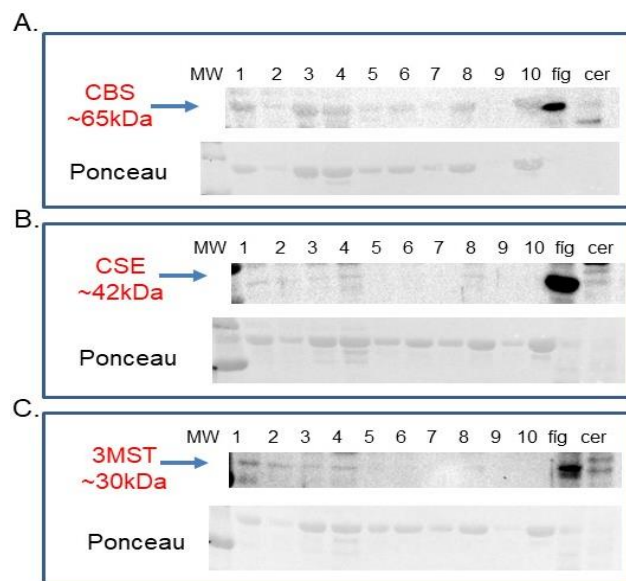


Figura 24. Expressão proteica das enzimas geradoras de sulfeto em amostras de debris de pele por análise de Western blotting. O painel A mostra as bandas imunorreativas para a enzima CBS, o painel B para a CSE e o painel C para a 3MST em amostras de debris de pele (10 ug de prot /poço) de pacientes controle (1, 2, 10) e pacientes submetidos à formulação (3,5,4,6,7,8,9). A figura obtida pela coloração com vermelho de Ponceau foi usada para controle interno de carregamento de proteínas. Homogenatos de fígado e cérebro de camundongo foram utilizados como controle positivo.

Para a expressão de IL-1 β , apenas observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a mesma 7 dias após o início do tratamento (amostras 1 e 2). Os demais tratamentos não alteraram esta expressão (figura 25).

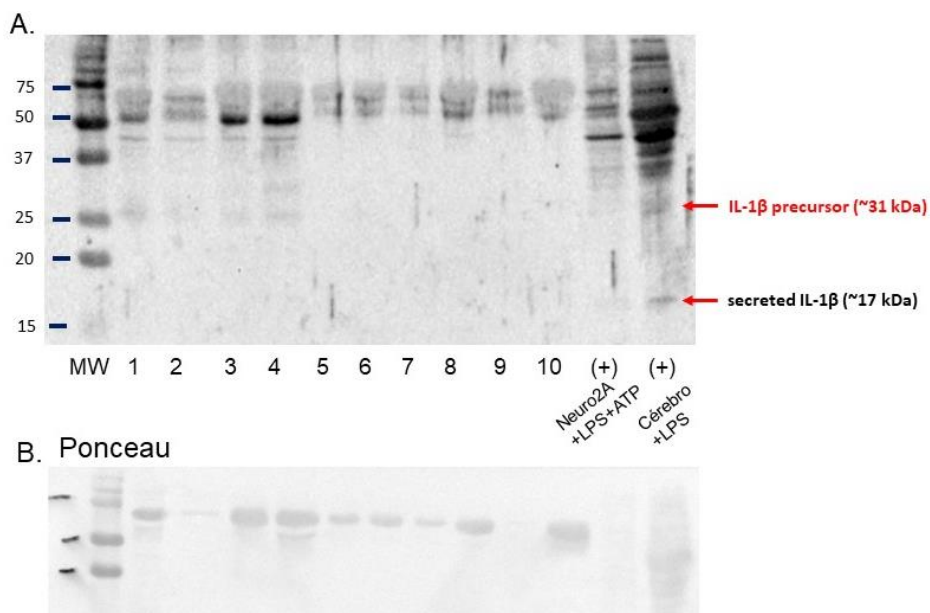


Figura 25. Expressão proteica de IL-1 β em amostras de debris de pele por análise de western blotting. O painel A mostra as bandas imunorreativas para a o anticorpo anti IL-1 β amostras de debris de pele (10 ug de prot /poço) de pacientes controle (1, 2, 10) e pacientes submetidos à formulação (3,4,5,6,7,8,9). Células do tipo Neuro 2A estimuladas com LPS + ATP e homogenatos de cérebro de rato tratado com LPS foram utilizados como controle positivo. O painel B mostra a coloração com vermelho de Ponceau que foi usada para controle interno de carregamento de proteínas.

Para a expressão da MMP1/8, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a mesma 7 dias após o início do tratamento (amostras 1 e 2). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 também reduziu esta expressão no dia 20 em relação ao dia 15 do tratamento (amostras 8 e 9). Os demais tratamentos não alteraram a expressão deste marcador (figura 26).

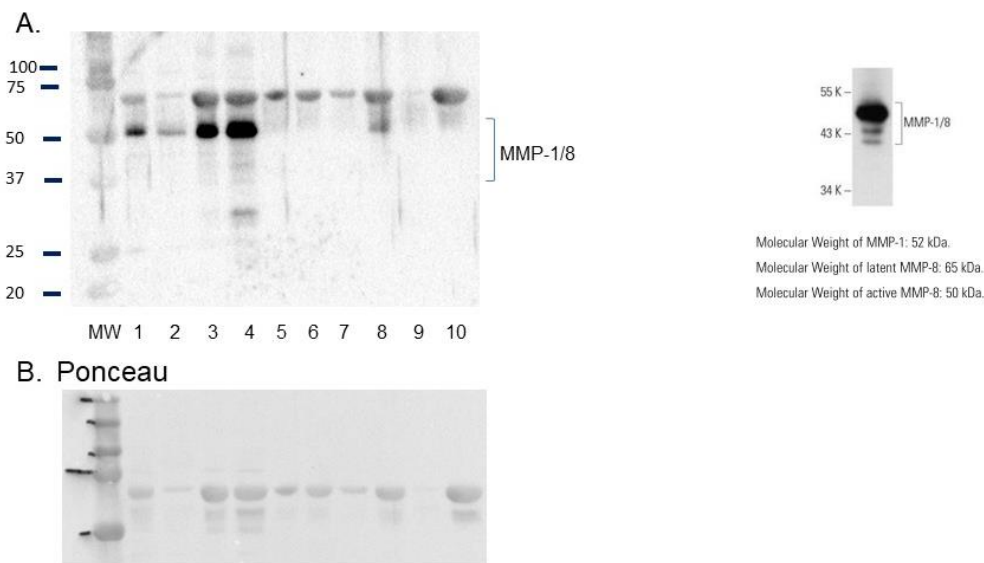


Figura 26. Expressão proteica de metaloproteases 1/8 (MMP1/8) em amostras de debris de pele por análise de western blotting. O painel A mostra as bandas imunorreativas para a o anticorpo anti MMP-1/8 em amostras de debris de pele (10 ug de prot /poço) de pacientes controle (1, 2, 10) e pacientes submetidos à formulação (3,4,5,6,7,8,9). O painel B mostra a coloração com vermelho de Ponceau que foi usada para controle interno de carregamento de proteínas.

5.17. Determinação da atividade das enzimas metaloproteinases de matriz por zimografia: MMP2 e MMP9 através da atividade gelatinolítica e MMP3 pela atividade caseinolítica

Para a avaliação da atividade de MMP2, não foram observadas alterações após o tratamento com o controle com clorexidina, com a formulação com GYY 4137, nem com a formulação contendo ATB 346. Da mesma forma, os diferentes tratamentos também não alteraram a atividade de MMP9. A densitometria do tratamento padrão com curativo de prata para MMP2 e MMP9 foram de 39,8 e 41,4, respectivamente (amostra 10, Figura 27).

Zimografia – MMP2 e MMP9

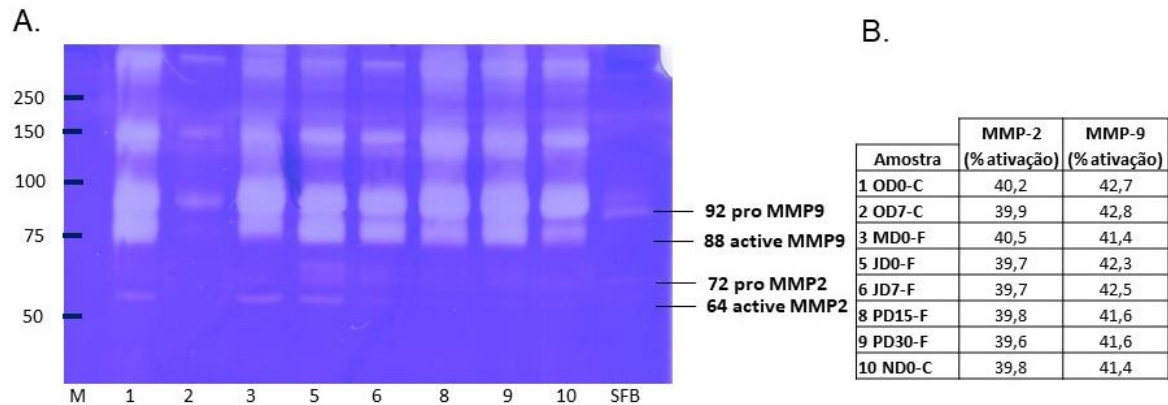


Figura 27 - Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 em amostras de debris de pele. No painel A as bandas representam a atividade proteolítica das metaloproteinases 2 e 9 de amostras de debris de pele (5 ug de prot /poço) de pacientes controle (1, 2, 10) e pacientes submetidos à formulação (3,5,6,8,9), utilizando o método de zimografia com gelatina 1% como substrato. Soro fetal bovino (SFB) foi utilizado como controle positivo para a marcação das MMPs. O painel B mostra a densitometria das bandas de zimografia para ativação de MMP-2 e MMP-9.

A análise dos debris dos voluntários também não demonstrou alteração na atividade de MMP3 (figura 28).

Zimografia – MMP3

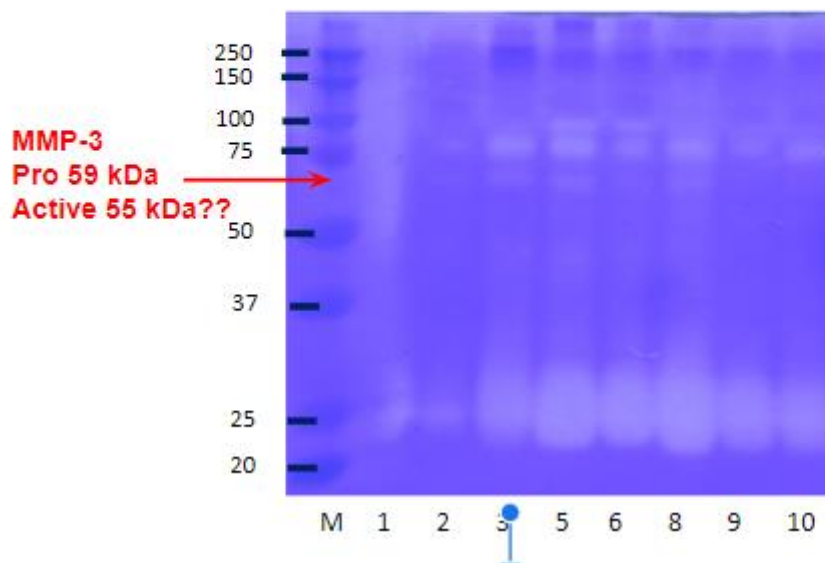


Figura 28. Detecção das metaloproteinases de matriz MMP-3 em amostras de debris de pele. As bandas representam a atividade proteolítica das metaloproteinases 3 de amostras de debris de pele (5 ug de prot /poço) de pacientes controle (1, 2, 10) e pacientes submetidos à formulação (3,5,6,8,9), utilizando o método de zimografia com B-caseína 0,25% como substrato. Nenhuma ativação de MMP-3 foi observada nas amostras analisadas.

5.18- Análise da expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina (NT), 4HNE e proteínas carboniladas por “slot blot”

Para a marcação com nitrotirosina, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a da densitometria da NT pelo Ponceau 7 dias após o início do tratamento (amostras 1 e 2). O tratamento com a formulação com GYY aumentou a expressão de NT 7 dias após o início do tratamento (amostras 5 e 6) e o tratamento com a formulação contendo ATB 346 não alterou esta expressão nos dias 15 e 20 dias após o início do tratamento (amostras 8 e 9). Por fim, a densitometria de NT no início o tratamento padrão com curativo de prata foi de 3,6 (amostra 10, figura 29).

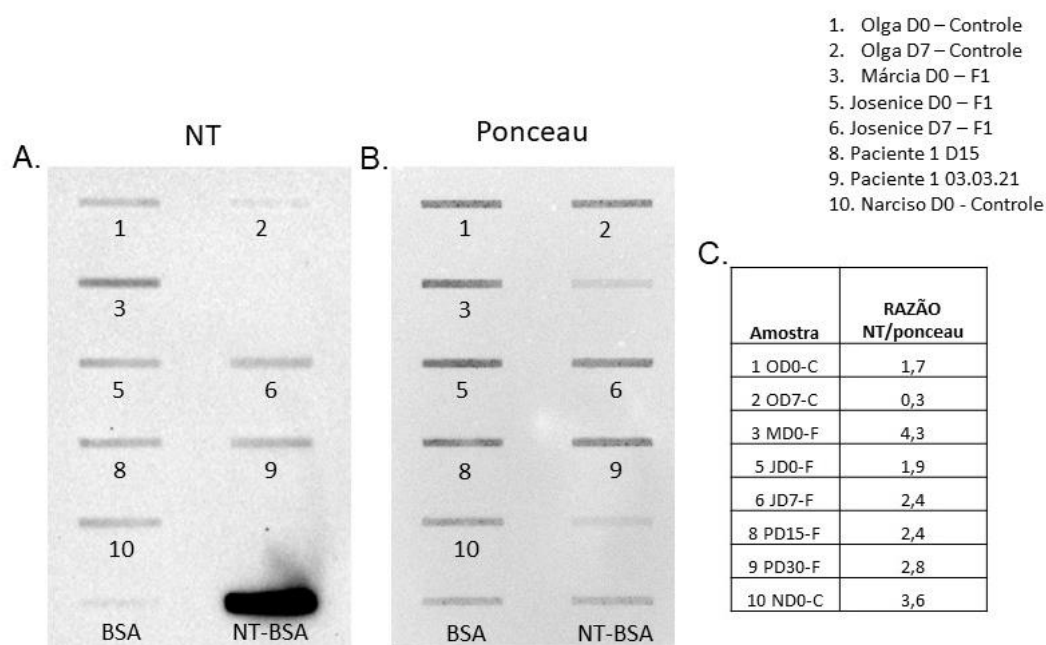


Figura 29. Expressão de resíduos de nitrotirosina em proteínas de amostras de debris de pele pelo método de slot blotting. Painei A: bandas imunorreativas para o anticorpo antinitrotirosina, Painei B: coloração com vermelho de Ponceau para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras e Painei C: análise densitométrica expressa em unidades arbitrárias, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo específico pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau. Cada poço recebeu 2,5 ug de prot sendo que as amostras 1, 2 e 10 são de pacientes controle e os as 3,5,6,7,8 e 9 de pacientes submetidos à formulação. Albumina de soro bovino (BSA) foi usado como controle negativo e a BSA nitrada com peroxinitrito *in vitro* (NTBSA) foi usada como controle positivo.

Para a marcação com 4-hidroxinonal, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu razão da densitometria da 4-HNE pelo Ponceau 7 dias após o início do tratamento (amostras 1 e 2). Da mesma forma, a formulação com GYY reduziu a expressão de 4-HNE 7 dias após o início do tratamento (amostras 5 e 6). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 também reduziu esta expressão no dia 20 em relação ao dia 15 do tratamento

(amostras 8 e 9). Por fim, a densitometria de NT no início o tratamento padrão com curativo de prata foi de 2,9 (amostra 10, figura 30).

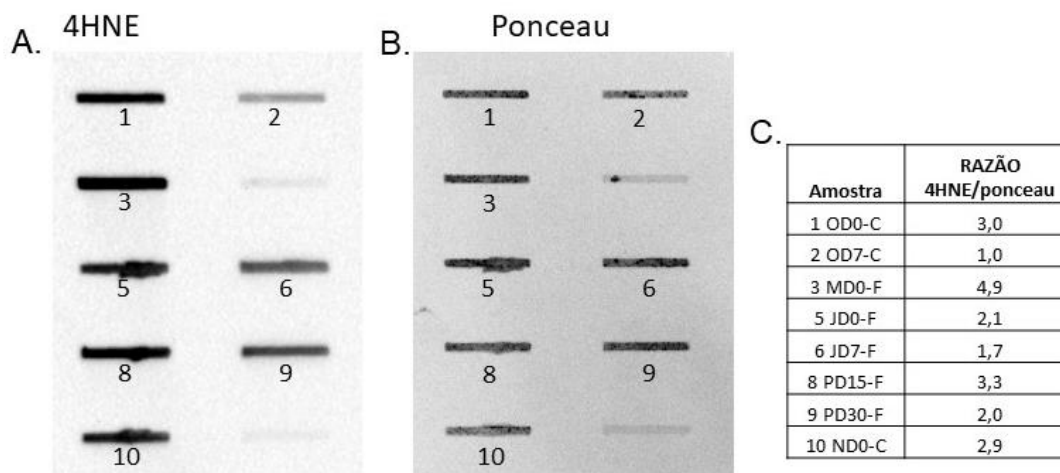


Figura 30. Expressão de proteínas modificadas por 4HNE em amostras de debris de pele pelo método de slot blotting. Painei **A**: bandas imunorreativas para o anticorpo anti 4HNE, Painei **B**: coloração com vermelho de Ponceau para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras e Painei **C**: análise densitométrica expressa em unidades arbitrárias, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo específico pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau. Cada poço recebeu 2,5 ug de prot sendo que as amostras 1, 2 e 10 são de pacientes controle e os as 3,5,6,7,8 e 9 de pacientes submetidos à formulação.

Para a marcação das proteínas carboniladas, observou-se que o tratamento controle com clorexidina reduziu a razão da densitometria das proteínas carboniladas pelo Ponceau 7 dias após o início do tratamento (amostras 1 e 2). Da mesma forma, a formulação com GYY reduziu a expressão de proteínas carboniladas 7 dias após o início do tratamento (amostras 5 e 6). O tratamento com a formulação contendo ATB 346 também reduziu esta expressão no dia 20 em relação ao dia 15 do tratamento (amostras 8 e 9). Por fim, a densitometria de NT no início o tratamento padrão com curativo de prata foi de 0,64 (amostra 10, figura 31).

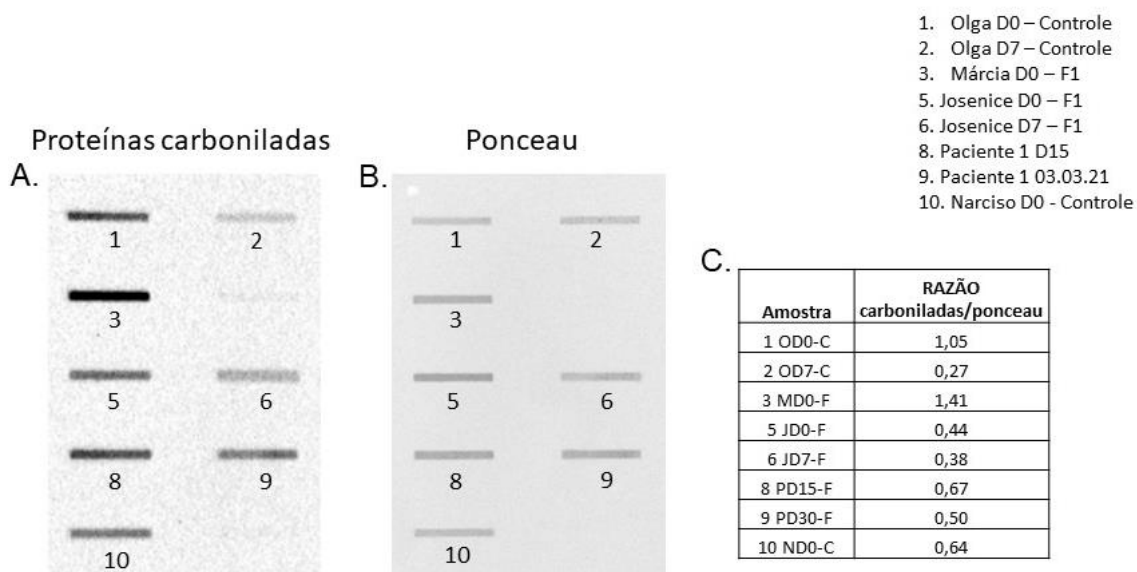


Figura 31. Expressão de proteínas carboniladas em amostras de debris de pele pelo método de slot blotting. Painei **A:** bandas imunorreativas para o anticorpo anti-DNP (dinitrofenil), Painei **B:** coloração com vermelho de Ponceau para a normalização da quantidade de proteínas nas amostras e Painei **C:** análise densitométrica expressa em unidades arbitrárias, dada pela razão entre a densitometria obtida com o anticorpo específico pela densitometria obtida pela marcação do Ponceau. Cada poço recebeu 2,5 ug de prot sendo que as amostras 1, 2 e 10 são de pacientes controle e os as 3,5,6,7,8 e 9 de pacientes submetidos à formulação.

Os resultados obtidos nas dosagens enzimáticas estão representados na tabela 15.

	GY- 4137 D ₇	ATB 346 D ₂₀	CLOREXIDINE D ₇
CBS	↑	↓	↓
CSE	↑	↓	↓
3 MST	↑	-	↓
IL- 1β	-	-	↓
MMP 1/8	-	↓	↓
NT	↑	-	↓
4 HNE	↓	↓	↓
PROT.CARBONILADAS	↓	↓	↓
MMP 2	-	-	-
MMP 9	-	-	-
MMP 3	-	-	-

Tabela 15. Resultados obtidos, sedo ↑ aumento da expressão; ↓ redução da expressão e – não alterou a expressão

Os voluntários 1 e 2 não apresentaram diferença significativa com relação a melhora do quadro algico ao longo do tempo do estudo. O voluntário 1 era o controle, onde não houve interferência sobre o tratamento utilizado pelo hospital. O voluntário 2, que recebeu a formulação denominada F0, referiu melhora do aspecto da úlcera, mantendo as bordas mais hidratadas e delgadas. Ambos negaram queixas alérgicas ou qualquer outro sintoma correlato. Mantivemos o follow-up e após o período de 30 dias, apresentavam pouca alteração em relação aos sintomas iniciais.

O voluntário 3, que apresentava úlcera de dimensões pequenas, porém extremamente dolorosa e incapacitante, referiu melhora de 50% do quadro álgico no D₄ mantendo esse escore até o D₈. A partir do D₁₀ houve remissão completa do quadro álgico. O aspecto da úlcera também apresentou melhora importante, tornando-se seca, sem exsudato, o que dificultou a retirada de debris. Como a úlcera apresentava-se cicatrizada, optamos por não manipular a região para retirar mais material biológico, evitando-se o risco de criar uma nova lesão no local. O aspecto geral também demonstrou melhora, desaparecendo a área de hiperemia peri-lesão. A remissão do quadro álgico perdurou até o D₃₀ assim como a cicatrização da úlcera. O paciente recebeu alta do Ambulatório de Estomatoterapia no D₂₅ do estudo.

O voluntário 4, que inicialmente estava resistente a qualquer manipulação para os curativos, necessitando de analgésicos prévios, referiu que no D₃ iniciou melhora álgica de 30%, alcançando o índice de melhora de 40% no D₈. Apresentou melhora progressiva tanto do aspecto da lesão quanto da dor ao longo do estudo, diminuindo a área de hiperemia, exsudato e zona de alodínia. No D₂₀, apresentava melhora álgica de 80%. Conseqüentemente, permitia a manipulação local adequada. Durante o follow-up, referiu que as queixas álgicas começaram a retornar no D₂₅, porém de menor intensidade comparado com o início do estudo, demonstrando que houve uma manutenção da analgesia ao longo do tempo. No D₃₀, paciente referia que a zona de alodínia estava retornando, mas mantinha o acompanhamento a cada 2 dias no Ambulatório de Estomatoterapia.

6. DISCUSSÃO

PARTE 1

Feridas crônicas que não cicatrizam, como as UV, contribuem grandemente para o sofrimento de uma elevada parcela da população na população idosa ou com algum tipo de comprometimento motor. De fato, com uma população envelhecida e obesa, o incremento no número de feridas crônicas tende a aumentar e vem sendo uma preocupação médica cada vez mais relevante nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Moraes Silva et al, 2023).

Apesar das opções terapêuticas e as perspectivas de cura atuais, o acesso da terapia ou cura para esses pacientes pode variar de acordo com a localização / região em que vivem, possivelmente pela ausência do tratamento da ferida ou da condição (insuficiência venosa crônica), que leva ao quadro grave da doença, como a ferida

aberta. Nesse contexto, a terapia para feridas crônicas é de mais difícil controle, uma vez que o processo de resolução da resposta inflamatória / reepitelização fica comprometido (Vasudevan, 2014; Raffetto et al., 2014).

Nos Estados Unidos estima-se que custo do tratamento de feridas crônicas (ex. úlceras de pé diabético, úlceras venosas de perna, feridas traumáticas que não cicatrizam e úlceras de pressão) possui grande impacto socioeconômico, com custos médicos em torno de US\$ 58 bilhões (Ammons, 2010).

Nesta primeira fase do estudo, foram avaliados 6 voluntários do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com a média de faixa etária de 64,7 anos. Nessa amostra estudada, a diferença entre idade e sexo não se mostrou significativa até a faixa etária dos 70 anos; porém, após essa idade, as mulheres se mostraram mais cuidadosas em procurar auxílio médico e ambulatorial para o tratamento das UV. Desses voluntários, 35% possuíam Ensino Fundamental incompleto e outros 27% concluíram o Ensino Fundamental. Dos pacientes que prosseguiram nos estudos, 27% completou o Ensino Médio e 11% concluíram o Ensino Superior. Os pacientes com menor nível escolar apresentavam trabalhos com maior esforço físico ou atividades no lar, enquanto os pacientes com maior nível sociocultural, apresentavam atividades ligadas a escritórios e consultorias, conseguindo realizar atividades físicas constantes e de maior impacto. Não houve diferença entre nível sociocultural e falta de cuidado com as feridas.

Em geral, em indivíduos saudáveis e sem imunocomprometimento o processo de cicatrização de feridas deve iniciar-se imediatamente e segue uma sequência de etapas caracterizadas por hemostasia, inflamação, granulação, epitelização e maturação (McGuckin et al., 2003; Vasudevan, 2014; Raffetto et al., 2014).

Feridas crônicas e agudas inicialmente progridem pelos mesmos estágios de cicatrização (McGuckin et al., 2003). Na ferida crônica, contudo, a resolução da inflamação não ocorre e a ferida permanece em estado persistente de inflamação ativa persistente e, em geral, m dos principais fatores que contribui para a persistência da ferida é a carga biológica na forma de bactérias colonizadoras (Bjarnsholt et al., 2008). Além das citocinas e biocarga (microorganismos), muitos fatores contribuem para a manutenção da condição anormal da ferida crônica, tais como a degradação do colágeno por metaloproteinases de matriz (MMPs) específicas, que são produzidas por células no local da ferida, incluindo fibroblastos, granulócitos e macrófagos. À medida que a remodelação da ferida continua, a atividade das MMP diminui e a atividade dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) aumenta. A densidade de macrófagos e fibroblastos é reduzida por apoptose. Com o processo de remodelamento

contínuo, o crescimento dos capilares não progride, e o fluxo sanguíneo para a área é reduzido e a atividade metabólica na área diminui (Vasudevan, 2014; Raffetto et al., 2014). Por seu turno, a presença de radicais livres derivados do oxigênio (ROS) tem sido implicada na manutenção e desenvolvimento de UV. De fato, a remoção de radicais livres pelo tratamento com antioxidantes foi associada a uma melhora no processo de cicatrização de UV (Salim, 1991). Está bem estabelecido que o óxido nítrico (NO) reage com radicais livres, com o íon hidroxila ($-\text{OH}$), formando o peroxinitrato (ONOO^-), um potente agente oxidante (radical livre), que causa destruição tecidual. Portanto, a superexpressão desses marcadores, além do NO pode estar envolvida direta ou indiretamente no retardo na cicatrização das feridas crônicas, em particular, pela presença em grandes quantidades do oxidante ONOO^- , que exerce efeitos inflamatórios e lesivos na vasculatura (Abd-El-Aleem et al., 2000). Corroborando essa sugestão, Howlander e Smith (2002) observaram que concentrações elevadas plasmáticas de NO estavam foram mensuradas em pacientes com lesões cutâneas graves.

No tocando ao novo mediador gasoso, H_2S , recentes evidências mostram que esse mediador está presente em baixas concentrações no plasma e pele de pacientes com queloides, e que a suplementação exógena de H_2S suprimiu as expressões de α -SMA, PCNA, colágeno I e colágeno III, reduzindo ainda o ânion superóxido intracelular e o superóxido mitocondrial em modelo animal (Li et al., 2022). Pesquisas anteriores mostraram que o H_2S promoveu a cicatrização de feridas na pele por inibição da inflamação, supressão do estresse oxidativo e aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Pinto et al., 2022, Xu et al., 2019, Wang et al., 2015), bem como aliviou significativamente o prurido da pele em camundongos (Rodrigues et al., 2017) e bloqueou a ativação de fatores nucleares- κB (NF- κB), inibindo o crescimento de células tumorais (De Cicco et al., 2016). Assim, verifica-se que o H_2S exerce efeitos protetores contra várias doenças de pele. Como visto, o H_2S desempenha um papel vital em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, inclusive no tecido cutâneo (Coavoy-Sanchez et al., 2020). Neste estudo, a triagem inicial mostrou que todos os indivíduos reportaram dor referida e, também, apresentaram hipersensibilidade secundária frente ao estímulo mecânico na proximidade da ferida. No tecido avaliado (granuloso e rígido), foi possível observar que esse comportamento de dor e formação da ferida pode estar associado ao desbalanço na expressão das enzimas produtoras de H_2S . A CBS, mas não a CSE, mostrou-se aumentada no tecido granuloso em relação ao tecido rígido. Ao contrário, a expressão da CSE mostrou-se significativamente maior no tecido granuloso em relação ao tecido rígido. Curiosamente, evidências mostram que a geração do H_2S na pele é regulada, principalmente, pela catálise da CSE (Xu et al., 2021). Em conjunto, esses dados indicam que a baixa expressão da CSE no tecido granuloso pode estar

relacionada direta ou indiretamente com o estado patológico (ferida) dos indivíduos. A expressão da 3-MST no tecido granuloso e rígido não foi distinta. Adiante, verificou-se que a detecção na expressão da 3-NT e 4-HNE (um dos principais produtos da peroxidação lipídica) não foi distinta entre os tecidos granuloso e rígido. Por outro lado, verificou-se que a carbonilação de proteínas (biomarcador do estresse oxidativo na pele) do tecido rígido foi significativamente menor do que do tecido granuloso, indicando que o processo de estresse oxidativo está mais ativo na proximidade da lesão e, por isso, pode contribuir para a manutenção da ferida e dor associada.

A ferida crônica é caracterizada pela presença de expressão das citocinas inflamatórias, como a IL-1b, IL-6, TNF- α dentre outras (Ammons, 2010). Entretanto, em nosso estudo, não observamos diferenças significativa na expressão da citocina IL-1 β entre os tecidos avaliados, sugerindo que ambos tecidos estão envolvidos na produção dessa citocina, que contribui para o processo inflamatório da UV. Conforme discutido anteriormente, a presença de MMPs, produzidas por células no local da ferida, representa um importante alvo marcador da ferida ativa. Neste estudo, observou-se a expressão e ativação de diferentes MMPs nos tecidos granuloso e rígido, tais como MMP-1-8, MMP-2,9 e Pró-MMP-3. Diferentemente das demais, a ativação da MMP-9 mostrou-se significativamente maior no tecido rígido. Importaneamente, outros estudos sugerem que a expressão tecidual específica de MMP-9 serve como marcador prognóstico da cicatrização de UV crônicas (Rayment et al., 2008).

Desse modo, em conclusão nesta primeira fase, mostramos que a triagem de diversos marcadores inflamatórios expressos de maneira distinta nos tecidos granuloso e rígido associados à expressão reduzida da CSE no tecido granuloso e a maior expressão da CBS no tecido rígido podem servir como marcadores para avaliar a eficácia de novas intervenções terapêuticas voltadas para o processo de cicatrização de feridas crônicas (UV).

PARTE 2

Foram recrutados 15 pacientes para a segunda fase do estudo, utilizando a nanoformulação e a formulação farmacopeica, sendo 7 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, porém, devido aos critérios de descontinuidade, permaneceram no estudo 5 pacientes, sendo 1 paciente masculino para o grupo de nanoformulação com ATB-346 e 4 pacientes com a nova formulação farmacopeica. Desse subgrupo, 1 paciente masculino para o grupo controle, 1 paciente feminino para o grupo F0 e 2 pacientes femininos para o grupo F1 (GYY- 4137).

Considerando que a primeira nanoformulação foi avaliada em estudos pré-clínicos em pele naïve de camundongos e, também, nesse estudo em pele humana saudável, tendo

demonstrado um grau de segurança compatível com ambas as peles, avaliou-se a seguir o efeito desses sistemas de entrega contendo o doador de H₂S híbrido, ATB – 346, na pele de paciente portador de UV de grau moderado (II). O tratamento da UV com a nanoformulação contendo ATB 346, aplicado topicamente na frequência de 1x/dia durante 4 dias, foi realizado e diferentes parâmetros inflamatórios (descamação local e periférica, irritação/calor local e periférico, hiperemia, extensão da ferida e exsudato) e sensitivos (hiperalgesia mecânica, dor referida local e secundária) foram mensurados.

O voluntário, que recebeu a nanoformulação com ATB 346, apresentou melhora significativa do quadro doloroso, inclusive retornando as atividades diárias, iniciando uma atividade física leve (caminhada) sem qualquer queixa. Porém, devido a piora do aspecto da úlcera, que se apresentava muito úmida e com as bordas maceradas, optamos por suspender o estudo e reestruturar uma outra formulação. O objetivo quanto ao controle álgico foi alcançado, porém houve piora do aspecto da úlcera, levando a maceração da pele local, aumento da hiperemia e fácil sangramento, causado pela intensa angiogênese local. A coleta de material (D7) foi prejudicada devido ao sangramento após a retirada dos debris, necessitando de compressão local para que parasse o sangramento. A maceração da pele pode ter sido causada, pois a formulação manteve a forma oleosa, não se tornando lamelar. O paciente confirmou que, após sentir os benefícios analgésicos, passou a comprimir mais o curativo, pois acreditava que faria a formulação “penetrar” mais na pele e curar com maior rapidez. Após esse relato, entendemos que seria necessário um controle mais rígido quanto aos curativos e orientações aos voluntários. Informamos a Comissão de Ética sobre a interrupção do estudo devido aos efeitos ocasionados e acompanhamos o paciente durante 4 meses até a resolução da UV, sem sequelas. A quantidade dos debris de D0 mostraram-se insuficientes para a dosagem de enzimas geradoras de H₂S.

Os outros voluntários que receberam a nova formulação farmacopeica com GYY-4137, de característica um pouco mais sólida (gel) adaptaram-se bem a formulação, não houve queixas de prurido, alergia ou piora nos aspectos das úlceras. Os dois pacientes que receberam a formulação 1 apresentaram diminuição expressiva do quadro álgico após o D3, com melhora de 50 % do quadro álgico após D8. Houve remissão completa da dor na voluntária 3 a partir de D10.

A paciente que utilizou a formulação 2 não observou qualquer mudança com relação a dor, porém percebeu que as bordas da úlcera estavam mais uniformes e delgadas, facilitando a realização dos curativos, sem tanto incômodo durante a retirada do curativo e limpeza do mesmo.

O paciente que foi o controle, recebendo o tratamento padrão do ambulatório de estomatoterapia, manteve queixa álgica importante.

A voluntária 4, que recebeu a formulação 1, percebeu que a melhora do quadro álgico foi tão significativa que estava mais receptiva em receber os curativos realizados pelas profissionais da enfermagem mesmo após o término do estudo. Além da melhora do quadro álgico, foi perceptível macroscopicamente, a melhora dos aspectos das úlceras, que passaram a apresentar bordas mais delgadas, de fácil limpeza, sem descamações grosseiras ou sangramentos. Também foi notado a presença de leve hiperemia peri lesão, porém sem característica pruriginosa ou irritativa, podendo caracterizar um quadro mais moderado de angiogênese peri lesão. Nenhuma das voluntárias que receberam a formulação F1 referiu prurido ou sensações desagradáveis após o início da utilização.

Durante a primeira coleta de debris, os pacientes referiram um pouco de desconforto à manipulação, porém durante a utilização das formulações, os voluntários deixaram de apresentar esse incômodo. O aspecto geral das úlceras era mais delgado e hidratado, sem áreas ressecadas que dificultassem a coleta de material.

Com as amostras coletadas conseguimos dosar enzimas geradoras de H₂S (CBS, CSE e 3MST); IL-1 β , MMP 1/8; MMP 2,9 e 3, demonstrando que a formulação contendo GYY 4137 foi capaz de aumentar a expressão de CBS, CSE, 3 MST e NT assim como diminuir a expressão do 4HNE e das proteicas carboniladas em D7. As MMP 2, 9 e 3 não sofreram interferência nesse estudo. Algumas amostras foram perdidas durante o preparo das soluções.

Uma das dificuldades encontradas durante o estudo foi o surgimento da pandemia de SARS-COVID-19 que alterou a rotina do Hospital onde foi realizado o estudo, pois as enfermarias e ambulatórios tornaram-se pontos de acolhimento de pacientes infectados pelo coronavírus. Alguns pacientes recusaram-se a ir ao Ambulatório, devido ao terror crescente em se infectar.

Outro ponto de dificuldade encontrado foi a primeira formulação, que era baseado em estudos realizados previamente em nosso laboratório. A formulação a ser usada em voluntários humanos deveria ser produzida em ambiente estéril e controlado, com aval de funcionamento pela ANVISA, para que não houvesse contaminação por patógenos. No caso, a opção encontrada foi solicitar manipulação da formulação em uma farmácia de manipulação com farmacêutico responsável. Como não conhecíamos o grau de pureza da Tricaprilina (ac. Octanóico) em farmácias de manipulação, não sabíamos se essa permaneceria estável. De fato, a formulação não evoluiu para a forma lamelar, mantendo-se viscosa. Porém acreditamos que o primeiro paciente analisado, em vista da melhora do quadro álgico causado pela formulação,

acabou utilizando de forma inadequada curativos protetores na região, inclusive realizando curativo oclusivo compressivo que pode ter sido a causa da maceração local. Todos os testes alérgicos realizados previamente não evidenciaram maceração da pele. O paciente se recuperou bem da úlcera, sem sequelas. A elaboração de uma nova formulação que fosse viável ao doador de H₂S, assim como localizar uma farmácia de manipulação capacitada e apta a realização do mesmo também dispensou tempo e recursos.

Com a segunda formulação mais estável, não oferecendo qualquer incômodo ou prejuízo aos voluntários, o estudo pode manter o acompanhamento de novos voluntários, fornecendo mais dados para serem analisados. Observamos que deveríamos ter coletado mais material para a realização dos testes imuno-histoquímicos, pois algumas amostras mostraram-se insuficientes durante os testes. Porém a coleta de material foi realizada de acordo com a quantidade que não oferecesse prejuízo físico ao voluntário. Ao longo do estudo percebemos que novas questões foram formadas, dando margem para que possamos nos aprofundar mais nessas questões.

Até o presente momento, pudemos observar que, clinicamente, a formulação farmacopeica contendo moléculas doadoras de H₂S produz importante melhora no controle alérgico de lesões ulcerosas, melhorando o aspecto local e diminuindo a zona de alodínia peri lesão. Deste modo, acreditamos que uma formulação tópica com esse perfil possa somar-se ao arsenal terapêutico para o tratamento da dor em úlceras venosas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADE, L.P. et al – Venous Ulcer: epidemiology, physiology, diagnosis and treatment; *Int.J. Dermatol.*; 2005, 44: 449-56.
- ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*, 1996.
- ABD-EL-ALEEM.SA, FERGUSON MW, APPLETON I, KAIRSINGH, S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 2000; 191(4): 434-42.
- AHMAD, A. & SZABO, C. - AP39, a mitochondrially- targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress in vitro and in acute renal injury in vivo. *Shock*. 2016 January; 45(1): 88–97.
- AHMAD, P. et al- Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-11, 2016.
- ALFÖLDI, P. et al - Comorbid insomnia in patients with chronic pain: A study based on the Swedish quality registry for pain rehabilitation (SQRP). *Disability and Rehabilitation*, 36, 1661–1669, 2014.
- ALTHAUS, A. et al- Development of a risk index for the prediction of chronic post-surgical pain. *European Journal of Pain*, 16, 901–910, 2012.
- AMMONS MC. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 2010; 5(1):10–7. PMID: 19807676.
- BARBOSA, J.A.G. & CAMPOS, L.M.N.- Diretrizes para o tratamento de úlcera venosa; *Rev. Enfermería Global*, out 2010 (20).
- BJARNSHOLT, T, KIRKETERP-MOLLER K, JENSEN PO, et al. Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 2–10.
- BORGES, E.L- Tratamento tópico de úlcera venosa: proposta de uma diretriz baseada em evidências. Tese de doutorado, Escola de Enfermagem – USP Ribeirão Preto, 2005.
- BRITO, K.K.G., SOUSA, M.J, et al.- Feridas crônicas: abordagem da Enfermagem, 2013.

- CAMPOS, M.G.C.A. et al – Feridas Complexas e Estomias – aspectos e manejo clínico, 2016, ISBN 978-85-463-0133-1
- CARMO, S.S, et al - Atualidades na assistência de enfermagem a portadores de úlcera venosa, Rev. eletrônica enferm; 9(2) ago. 2007.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. Journal of Neuroscience Methods, 1994.
- COAVOY-SÁNCHEZ, S. A. et al. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. Pharmacological Research, 2016
- COAVOY-SÁNCHEZ, S. A.; COSTA, S. K. P.; MUSCARÁ, M. N. Hydrogen sulfide and dermatological diseases. British Journal of Pharmacology, 2020.
- CUNHA, T.M. et al – Dual role of Hydrogen Sulfide in mechanical inflammatory hypernociception; Eur.J. Pharm, 590, 127-135, 2008.
- DANTAS, D.V.; et al - Validação clínica de protocolo para úlceras venosas na alta complexidade; Rev. Gaúcha Enferm. (Online) 37 (4); 2016, <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2016.04.59502>.
- DANTZER, R. et al – From Inflammation to sickness and depression: When the Immune System subjugates the brain; 2008; Nature Reviews- Neuroscience (9), 49-56
- DEALEY, C. – The Care of Wounds: A guide for nurses, 2001.
- De CICCIO, P., PANZA, E., ERCOLANO, G., et al. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma.
- De MORAES SILVA, M.A., NAKANO, L.C., et al. Balneotherapy for chronic venous insufficiency. Cochrane Database Syst Rev. 2023 Jan 9;1(1): CD013085. evelopment in vivo. Pharmacological Research. 2016; 114:67–73.
- DIAS, T.Y. et al - Qualidade de vida de pessoas com úlcera venosa: estudo comparativo Brasil/Portugal. Online Braz J Nurs. 2013;12(2):491-500

- Di CESARE, L. et al -Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H₂S-releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels; *Neuropharmacology*, jul 15, 121: 49-59, 2017
- DISTRUTTI, E. et al. Hydrogen sulphide induces μ opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. *Molecular Pain*, 2010.
- DISTRUTTI, E. et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006DU, J. et al- Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chin Med J (Engl)* 126: 930–936, 2013
- DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1980.
- DONATI, A. F. et al. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2014.
- ECKELI, F.D. et al – instrumentos de avaliação da dor neuropática; art. revisão, *Rev. Dor* 17(1), 2016.36
- EDWARDS, D. et al.– Psychological aspects of wound care: Implication for Clinical Practice; *Journal of Community Nursing*, abr 2014, 28 (2), p 52-57
- EKUNDI-VALENTIM, E. et al. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat: Research paper. *British Journal of Pharmacology*, 2010.
- EKUNDI-VALENTIM, E. et al. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. *Medical Gas Research*, 2013.
- ELIES, J. et al – Hydrogen Sulfide as possible mediator; *Journ. Physiol.*, 594, p. 4119-4129, 2016.
- ESECHIE, A. et al – Beneficial effect of Hydrogen Sulphide donor (sodium sulphide) in a ovine model of burn and smoke induced acute lung injury; *Br. J. Pharmacol.* , 2009, nov 158 (6), 1442-1453.

- FRANCO, D., GONÇALVES, L.F,et al - Feridas cutâneas : a escolha do curativo adequado, Scielo, 2007.
- GEMICI, B. et al. H₂S-releasing drugs: Anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. Nitric Oxide - Biology and Chemistry, 2015
- GUGLIANDOLO, E. et al. Anti-inflammatory effect of ATB-352, a H₂S –releasing ketoprofen derivative, on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. Pharmacological Research, 2018
- HELLSTRÖM, A. et al – Leg ulcers in olders people: a national study addressing variation in diagnosis, pain and sleep disturbance; BMC Geriatr., jan 21; 16-25; 2016.
- HERRERA, B. S. et al. The H₂S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. Medical Gas Research, 2015.
- HINE, C. et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. Cell, 2015.
- HOSOKI. R, et al – The possible role of Hydrogen Sulfide as na endogenous smooth muscle relaxant in synergy with Nitric Oxide; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, aug 28; 237 (3) 527-31.
- HOWLADER, M.H., SMITH, P.D.- Increased plasma total nitric oxide among patients with severe chronic venous disease. Int Angiol 2002; 21(2): 180-86.
- KAWABATA, A. et al – Hydrogen Sulfide as a novel nociceptive Messenger; Pain,nov 132 (1-2); 74-81, 2007KELECHI, T.J. et al – Chronic venous disease and venous leg ulcers: na evidence-based update; Journal of Vascular Nursing, 33 (2), jun (2015), p 36-46
- KELLY, M., GETHIN, G.- Prevalence of Chronic Illness and Risk Factors for Chronic Illness Among Patients with Venous Leg Ulceration: A Cross-Sectional Study. Int J Low Extrem Wounds. 2019 Sep;18(3):301-308. doi: 10.1177/1534734619850444. Epub 2019 May 29
- KHALIL, Z. et al – Effects of aging on neurogenic vasodilatador responses evoked by transcutaneous eletrical nerve stimulation: relevance to wound healing, J.Gerontol. A.Biol. Sci. Med., jun 55(6) 257-63, 2000.

- KIMURA, H. et al. - Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochemistry International*, 2013.
- KOROLEVA, K. et al – Receptor Mechanisms Mediating the Pro-Nociceptive Action of Hydrogen Sulfide in Rat Trigeminal Neurons and Meningeal Afferents, *Cell. Neurosc.* 2017. LI, T. et al. Neuroprotective roles of L-cysteine in attenuating early brain injury and improving synaptic density via the CBS/H₂S pathway following subarachnoid hemorrhage in rats. *Frontiers in Neurology*, 2017.
- LAL, B. K., et al.- Venous ulcers of the lower extremity: Definition, epidemiology, and economic and social burdens. *Seminars in vascular surgery*, 28(1), 3–5, 2015
- LEÃO, K.A.S. et al- Centro Multidisciplinar de Dor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- LEE, H. S. et al. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β . *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009.
- LIU, F.; CHEN, D.D. et al - Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes; *Diabetes*. 2014 Jun;63(6):2183
- LOWICKA, E. & BELTWSKI, J.: Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* 2007, 59, 4-24.
- McGUCKIN, M., GOLDMAN, R., et al. - The clinical relevance of microbiology in acute and chronic wounds. *Adv Skin Wound Care* 2003; 16(1): 12–23; [quiz 4–5].
- MENDES, J.A. et al – Hydrogen Sulfide inhibits apoptosis and protect the bronchial epithelium in na allergic inflammation mice model; *Int. Immunopharm.* 73: 435-441, 2019. Ministério da Saúde – Manual de Úlceras, Tratamento e conduta, 2002. ARTIGOS DE REVISÃO • Rev. dor 17 (suppl 1) • 2016 • <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160037> COPIAR
- MIRANDA, C.C.V.; et al - Nova classificação fisiológica das dores: o atual conceito de dor neuropática; *Artigos de Revisão; Rev. Dor*, 17 (supl 1);2016; <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160037>
- NELSON, E.A.& ADDERLEY, U.- Venous leg ulcers. *Clinical Evidence* 2016; 01:1902. Review.
- NETTEL, S.J et al- *Inorganic substancies*, Ed. 2013

- O'DONNELL, T.F. et al – The Real Cost of Treating Venous Ulcers in a Contemporary Practice; J. Vasc.Surg. Ven.Lymphat. Disord, 2014, oct 2(4) 355-61
- OLIVEIRA, A.C. et al – Parameters used in eletrophotherapy for wound healing: a scope review, Rev. Research, Society and Development, vol 10 (6), 2015.
- O'MEARA, S., AL-KURDI, D. and OVINGTON, L.G.- “Antibiotics and Antiseptics for Venous Leg Ulcers, “Cochrane Database Systematic Reviews, No. 1, 2008, Article ID: CD003557.
- PANDEY, S.K et al - A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide; Trends in Analytical Chemistry, vol 32, feb 2012, p 87-99.
- PEPE, F. et al - Parametric Study of Hydrogen Sulfide Adsorption on Chromium-Based MIL-101 in a Fixed-Bed; jun 2017, Journal of Computational and Theoretical Nanoscience 23(6):6007-6009.
- PINTO, R.V.; CARVALHO S., et al. - Emerging nitric oxide and hydrogen sulfide releasing carriers for skin wound healing therapy. ChemMedChem. 2022;17(1, article e202100429) doi: 10.1002/cmdc.202100429.
- PIRIZ, M.A., LIMA, C.A.B, et al.- Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.3, p.628-636, 2014.
- POWELL, C. R.; DILLON, K. M.; MATSON, J. B. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. Biochemical Pharmacology, 2018.RAI, R.- Standard guidelines for management of venous leg ulcer. Indian Dermatol Online J. 2014 Jul-Sep; 5(3): 408–411.
- PRAKASH et al., Indigenous Traditional Knowledge and Usage of Folk Bio-Medicines among Rongmei Tribe of Tamenglong District of Manipur, India; Afr J Tradit Complement Altern Med. (2014) 11(3):239-247.
- RAFFETTO, J.D.- Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers; Surgical Clinics, vol 98 (2), p. 337-347, 2018.
- RAYMENT, E.A., UPTON, Z., SHOOTER, G.K.- Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. Br J Dermatol.,2008;158(5):951-61.
- RODRIGUES, L. et al. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cellmediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. Pharmacological Research, 2017;115:255–266.

- RODRIGUES, M. et al – Wound Healing: a cellular perspective; *Physiological Reviews*, vol 99 (1), 2017.
- SALIM, A.S. et al. - The role of oxygen-derived free radicals in the management of venous (varicose) ulceration: a new approach. *World J Surg* 1991; 15(2): 264-69.
- SAMANIEGO–RUIZ, M.J. et al – Avaliação das feridas crônicas no adulto – uma revisão integrativa. *Rev. Da Escola de Enfermagem USP*; 2017 (52)
- SBED (Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor) - Comitê de Dor Neuropática; [Dor Neuropática 02 \(sbed.org.br\)](http://DorNeuropatica02(sbed.org.br))
- SEN, C.K. et al – Human Skin Wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy; *Wound Repair Regen*. Nov-dec, 2009, 17 (6): 763-71.
- SHAI, A., MAIBACH, H.I., BARAN, R. – *Handbook of Cosmetic Skin Care*, Informa UK, Ltd., 2nd Ed, p 34-40, 2009. 1.
- SIDHAPURIWALA, J.N et al – Effects of Hydrogen Sulfide on Inflammation in caerulein induced acute pancreatitis; *J. Inflamm*, dec 30,6:35, 2009.
- SILVA, J. et al - Improved burn wound healing by the antimicrobial peptide LLKKK18 released from conjugates with dextrin embedded in a carbopol gel. *Elsevier, Acta Materialia*, 26 (2015) 249-262.
- SILVA, M.A.M, et al, - Impacto da escleroterapia com espuma de polidocanol guiada por ultrassom em pacientes com úlcera venosa; *J. Vasc. Bras.* 16 (3); Set 2017; <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2016.04.59502>
- STECHMILLER, J. K. et al. Guidelines for the prevention of pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, n. 2, p.151-168, mar. 2008.
- TOBÓN, J.L. et al - Nutritional status and wound severity of overweight and obese patients with venous leg ulcers: a pilot study. *J Vasc Nurs.* 2008 Jun;26(2):43-52.
- TOMITA, M. et al - Expression of 3 mercapto pyruvate sulfur transferase in the mouse. *Molecules* 21: e1707, 2016.
- TORRES, G.V. et al - Comparação dos domínios da qualidade de vida de clientes com úlcera venosa. *Rev Enferm UERJ.* 2014;22(1):57-64. 7.

- VASUDEVAN, B., et al.- Venous Leg Ulcers – Pathophysiology and Classification; Indian Dermatol Online J. Therapeutic Guidelines, 2014; Jul, vol 5 (3): 366-70.
- VIEIRA, C.P.B. & ARAUJO, T.M.E.- Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. Rev Esc Enferm USP · 2018;52:e03415. científica da pós-graduação. Rev Enferm UFPE [Internet]. 2013 [citado 2017 fev. 20]; 2(7):414-21.
- WALLACE, J. L.; WANG, R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: Exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. Nature Reviews Drug Discovery, 2015.
- WANG, G., LI, W., et al.- Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. International Journal of Experimental Pathology. 2015;8(5):5097–5104.
- WHITEMAN, M. et al. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. Antioxidants and Redox Signaling, 2010.
- WU, J., et al - H₂S-Releasing hydrogel for wound repair via in situ polarization of M2 macrophages. Biomaterials. 2019 Nov;222
- XU, M., et al- Exogenous hydrogen sulphide supplement accelerates skin wound healing via oxidative stress inhibition and vascular endothelial growth factor enhancement. Exp Dermatol. 2019 Jul;28(7):776-785.
- XU, M., ZHANG, L., et al.- Hydrogen sulfide: recent progress and perspectives for the treatment of dermatological diseases. Journal of Advanced Research. 2021; 27:11–17.
- ZANARDO, R. C. O. et al.- Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte mediated inflammation. The FASEB Journal, 2006.
- ZHAO, H., LU, S., et al. -Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation. Journal of Diabetes and its Complications 2017;31(9):1363–1369.
- ZHAO, X.; LIU, L.; et al - A hydrogen sulfide-releasing alginate dressing for effective wound healing; Acta Biomaterialia 104 (2020), 85-94