

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ANDERSON ROMÉRIO AZEVEDO CERQUEIRA

Caracterização farmacológica da microemulsão de fase lamelar contendo um doador
de H₂S mitocondrial na resolução de lesão térmica cutânea: Avaliação in vitro e in
vivo

São Paulo
2023

ANDERSON ROMERIO AZEVEDO CERQUEIRA

Caracterização farmacológica da microemulsão de fase lamelar contendo um doador de H₂S mitocondrial na resolução de lesão térmica cutânea: Avaliação in vitro e in vivo

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira
Costa

Co-orientadora: Luciana Biagini Lopes

Versão Original

São Paulo

2023

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa, por toda a orientação, pela liberdade oferecida durante o projeto, pela compreensão em momentos conturbados e pelo rigor focado na qualidade, sem as quais eu não seria o profissional que me tornei.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes, pela orientação, paciência e disponibilidade a todos os momentos.

À Dra. Simone Aparecida Teixeira, por ter sido sempre presente durante os últimos anos, pelas discussões técnicas, ensinamentos, pela energia positiva e, acima de tudo, pela amizade.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Marcelo Muscará, pelas ideias, pelo conhecimento passado e pelo suporte oferecido nas discussões de resultados.

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda técnica oferecida durante todos esses anos.

Para os alunos de iniciação científica que auxiliiei, por estarem sempre dispostos a aprender e ajudar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPQ), projeto 870212/1997-4.

RESUMO

Cerqueira, ARA. Caracterização farmacológica da microemulsão de fase lamelar contendo um doador de H₂S mitocondrial na resolução de lesão térmica cutânea: Avaliação *in vitro* e *in vivo*. [Tese (Doutorado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O potencial terapêutico de moléculas doadoras de H₂S, incluindo de liberação espontânea ou lenta, híbridas ou com liberação de H₂S direcionado para mitocôndria vem sendo demonstrado para várias doenças, incluindo de cunho inflamatório. Nesse contexto, os efeitos e mecanismos do H₂S subjacentes à resolução e cicatrização de feridas resultantes de lesão térmica, uma das principais causas de morte por traumas, ocupando a 4^a maior causa de trauma são limitados e controversos. Apesar da diversidade dessas moléculas, muitas ainda estão longe de ser satisfatórias, seja por eficácia reduzida ou insolubilidade destas em água. Apesar de nanomateriais apresentarem citotoxicidade e incompatibilidades com fármacos ou princípios ativos (PA), os sistemas de entrega nanoestruturados visam aprimorar e fornecer concentrações efetivas destes no sítio de ação. Este estudo busca desenvolver e avaliar um sistema nanoestruturado de entrega tópica para o doador mitocondrial de H₂S, AP39, em modelo de lesão térmica na pele dorsal de camundongos magros e obesos e, também, em modelo de cicatrização *in vitro* (cultura de fibroblastos 2D; linhagem 3T3). Propõe-se também avaliar o papel biológico do H₂S no microambiente da lesão cutânea. A lesão cutânea (queimadura de 2^o grau) foi induzida pela aplicação tópica rápida (30 s) de uma placa esferoide (disco 5 mm) quente (80 °C) na pele dorsal depilada de camundongos fêmeas C57BL/6 (12 semanas) selvagens sob anestesia inalatória (isoflurano 5% em O₂). Os camundongos foram alimentados com dieta padrão (DP) após o desmame e, na 12^a semana de vida, foram submetidos à eutanásia e parâmetros inflamatórios e moleculares foram avaliados na pele e fluidos destes. A molécula AP39 foi incorporada com sucesso em quatro dos sistemas de entrega (nanopartícula, nanoemulsão e *beads*) desenvolvidos. O teste de citotoxicidade do AP39 em linhagem celular 3T3 mostrou que as células estavam viáveis em concentrações inferiores a 2 µM, enquanto a concentração de 0,2 µM foi capaz de induzir a migração destas células. De posse do sistema nanoestruturado ideal contendo AP39 (gel de fase lamelar composto por fosfatidilcolina 98% (30%),

monoleína (10%) e óleo de girassol (60%) foi possível observar que a aplicação tópica desta formulação na lesão cutânea induzida por placa quente (80°C. 30 s), 24 h após, não exerceu efeito citoprotetor e tampouco anti-inflamatório, uma vez que a atividade da MPO e o perfil histopatológico na pele lesada não diferiu do grupo com lesão térmica não tratado; todavia, esse mesmo tratamento por um período de 8 dias reduziu a concentração de proteínas carboniladas, e estimulou a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e glutathione s-transferase) paralelo ao aumento na expressão do Nrf2, mas não inibiu o infiltrado celular, medido pela atividade da MPO. Conclui-se que foi possível desenvolver um sistema de entrega compatível com o AP39; em modelo de cultura, a molécula promove a migração de fibroblastos; e o tratamento prolongado com o AP39 é capaz de aumentar a atividade antioxidante do tecido, promovendo melhoras no tratamento e redução da lesão.

Palavras-chave: Sulfeto de Hidrogênio. Microemulsão. Lesão térmica. Antioxidantes. AP39.

ABSTRACT

Cerqueira, ARA. Pharmacological characterization of lamellar phase microemulsion containing a mitochondrial H₂S donor in the resolution of cutaneous thermal injury: *In vitro* and *in vivo* evaluation. [Thesis (Ph. D. in Pharmacology)] – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

The therapeutic potential of H₂S donor molecules, including spontaneous or slow release, hybrids or H₂S directed to mitochondria, has been demonstrated for several diseases, including inflammatory conditions. In this context, the effects and mechanisms of H₂S underlying the resolution and wound healing resulted from thermal injury, one of the main causes of death from trauma, occupying the 4th largest cause of trauma, are limited and controversial. Despite the diversity of these molecules, many are still far from being satisfactory, either due to their reduced efficacy or insolubility in water. Although nanomaterials present cytotoxicity and incompatibilities with drugs or active ingredients, nanostructured delivery systems aim to improve and provide effective concentrations of these at the site of action. This study seeks to develop and evaluate a topic nanostructured delivery system for the mitochondrial H₂S donor, AP39, in a model of thermal injury on the dorsal skin of thin and obese mice and, also, in an *in vitro* healing model (2D fibroblast culture; lineage 3T3). It is also proposed to evaluate the biological role of H₂S in the microenvironment of the skin lesion. The cutaneous lesion (2nd degree burn) was induced by topical application (30 s) of a hot (80 ° C) spheroid plate (disc 5 mm) on the depilated dorsal skin of female C57BL/6 mice (12 weeks) under inhalatory anesthesia (5% isoflurane in O₂). The mice were fed with a standard diet (PD) after weaning and, at the 12th week of life, they were euthanized, inflammatory and molecular parameters were evaluated on their skin and fluids. The AP39 molecule was successfully incorporated into three delivery systems (nanoparticle, nanoemulsion and *beads*) developed. The cytotoxicity test of AP39 in 3T3 cells showed that the cells were viable at concentrations below 2 µM, while the concentration of 0.2 µM was able to induce migration of these cells. With the ideal nanostructured system containing AP39, a lamellar phase gel nanoemulsion composed of 98% phosphatidylcholine (30%), monolein (10%) and sunflower oil (60%) it was observed that the topical application of this formulation in the skin lesion, induced by hot plate (80 °C 30 s), 24 h after, did not

have a cytoprotective or anti-inflammatory effect, since the MPO activity and the histopathological profile on the injured skin did not differ from the group with untreated thermal injury; The same treatment for a period of 8 days reduced the concentration of carbonylated proteins, and stimulated the activity of antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and glutathione s-transferase), a increase in Nrf2 expression, but did not inhibit cell infiltrate. In conclusion, It was possible to develop a delivery system compatible with the AP39; in a cell model, the molecule promotes the migration of fibroblasts; and the prolonged treatment with the AP39 is capable to increase the antioxidant activity of the tissue, promoting improvements in the treatment and reduction of the lesion.

Keywords: Hydrogen Sulfide. Microemulsion. Burn injury. Antioxidants. AP39.

LISTA DE ABREVIATURAS

3MST	3-Mercaptopiruvato Sulfurtransferase
ADT-OH	5-(4-hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione
AINES	Anti-inflamatório Não Esteroidal
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Transaminase
AP39	[(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl) phenoxy)decyl) triphenyl phosphonium bromide]
ApoE -/-	Apolipoproteina E Knockout
AUC	Área sob a curva
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	cisteina aminotransferase
CBS	Cistationina- β -sintetase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CO ₂	Dioxido de carbono
CSE	Cistationina- γ -liase
DH	Dieta hiperlipídica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DP	Dieta Padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
GTT	Teste de Decaimento da Glicose
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona reductase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSH	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
GGY4137	p-methoxyphenyl)morpholino-phosphinodithioic acid
h	Horas
H&E	Hematoxilina e Eosina

H2O2	Peróxido de Hidrogênio
H2S	Sulfeto de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de Alta densidade
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HRP	horseradish peroxidase
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônia
IL	Interleucina
ITT	Teste de tolerância a insulina
KCl	Cloreto de Potássio
Keap1	Proteína 1 similar a Kelly associada a ECH
KITT	Constante de Decaimento da Glicose
MDA	Malonaldeído
MgCl2	Cloreto de Magnésio
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nrf2	nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O.N.	Over night
°C	Graus celsius
PBS	Solução Fosfato Salina
PC	Fosfatidilcolina
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
Pdi	Índice de polidispersão
PGC1a	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PVDF	poli(fluoreto de vinilideno)
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SQOR	sulfeto quinona oxiredutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico

TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBS	Tampão Tris Sódio
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP+	Trifenilfosfato
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
Vmax	Velocidade máxima
WHO	Organização Mundial da Saúde
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

1 ENUNCIADO DO PROBLEMA

1.1 Lesão térmica (queimadura) na pele e obesidade

Considerada o maior órgão de proteção do corpo humano (~ 2m²), a pele atua como interface sensível entre o organismo e o meio ambiente, limitando a penetração de agentes agressores, tais como estímulos externos biológicos, mecânicos, térmicos ou químicos. Desempenha funções importantes, como a termorregulação, controle de resposta imunológica e funções metabólicas, favorecendo a homeostase do organismo. Trata-se de um órgão altamente vascularizado e innervado por fibras nervosas sensitivas e motoras, que revestem vasos, glândulas e folículos capilares, além de possuir um sistema avançado de proteção, formado por células T, apresentadoras de antígenos e mastócitos (vide revisão: Di Meglio et al., 2011).

A pele compreende duas camadas principais, denominadas epiderme e derme. A epiderme contém queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel, enquanto a derme é constituída por fibras elásticas e colágenas, sendo também o local dos folículos, capilares, glândulas sudoríparas e unhas (vide revisão: Di Meglio et al., 2011). Quando o sistema de proteção (pele) é rompido por queimaduras, por exemplo, a integridade e as funções desse órgão são afetadas e, proporcionalmente, a homeostasia do organismo também (vide revisão: McGlone e Reilly, 2010; International Best Practice Guidelines, 2014).

Por definição, a queimadura é uma lesão traumática nos tecidos do corpo, mais tipicamente a pele, causada por calor excessivo isolado e não recorrente ou outras exposições agudas, como descarga elétrica, fricção, produtos químicos e radiação. Dentre todos os traumas, a lesão térmica é mais devastadora, pois causa sofrimento intenso e resulta em alta taxa de mortalidade e morbidade (WHO, 2004; Forjuoh, 2006; Peck, 2018). Essas lesões oneram globalmente os sistemas públicos de saúde e ocupam a 4^a posição mundial de eventos traumáticos (1.1:100.000 habitantes) (WHO, 2004; Institute for Health Metrics and Evaluation, 2012). No Brasil, de janeiro/2016 a julho/2017, registros DataSUS mostram que cerca de 39 mil casos de internações no sistema público de saúde correspondem aos pacientes com queimaduras, sendo que, destes, 1046 foram a óbito, principalmente na região sudeste (462 óbitos).

Em países mais desenvolvidos, a incidência e gravidade (óbitos) de internações para tratar lesões por queimadura reduziu nos últimos 20 anos (Aldana e Navarrete, 2015; Santos et al., 2016; Smolle et al., 2017), apesar da incidência global de tratamento para queimadura ainda superar a terapia de doenças infecciosas, como AIDS e tuberculose (Peck, 2018). Em áreas de conflitos permanentes, como as regiões do Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e Sudeste Asiático, as queimaduras por armas fogo estão cada vez mais comuns (WHO, 2004; Murray e Lopez, 2006; Peck e Pressman, 2013; Aldana e Navarrete, 2015). Por exemplo, em Bagdá, a incidência de lesões por queimaduras subiu de 30 para 117 habitantes para cada 100.000 indivíduos após a invasão americana (Stewart et al., 2016).

Historicamente, muito do conhecimento da fisiopatologia de lesões térmica foi baseado no modelo experimental descrito por Jackson, em 1947 (Hettiaratchy e Dziejulski, 2004), o qual ilustra a fisiologia e a dinâmica transitória dos ambientes conforme a gravidade da lesão, sendo dividida em três zonas distintas, mais interna para a externa: coagulação, estase e hiperemia. A Zona de coagulação ou necrose corresponde à região de contato ou próxima ao agente lesivo, onde ocorre a perda irreversível de tecido e inflamação local. Caracterizada por aumento da permeabilidade vascular (edema), infiltrado neutrofílico e liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) e fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), peptídeos catiônicos, eicosanoides e proteinases (elastase, catepsina G e ativador de plasminogênio tipo uroquinase) (Hart et al, 2002; Hur et al., 2015). Na fase tardia, a liberação de fatores de crescimentos VEGF, derivado de plaquetas [PDGF], TGF- β , TGF- α e FGF de células viáveis atuam como peças fundamentais na cicatrização tecidual e remoção de células apoptóticas (vide revisão: Koh e DiPietro, 2011; Haghdoost et al. 2013), favorecendo a formação de nova matriz celular (queratinócitos, células endoteliais), angiogênese e do tecido de granulação (fibroblastos, granulócitos, macrófagos e capilares; vide revisão: Nauta et al., 2011). A zona de estase consiste numa região de baixa perfusão tecidual, devido às alterações na microcirculação, como o aumento de permeabilidade, extravasamento plasmático e edema. A Zona de hiperemia corresponde ao processo inflamatório agudo, idêntico a qualquer outro processo inflamatório. Contém perfusão tecidual no tecido viável devido à vasodilatação local.

De longa data as queimaduras foram classificadas em feridas de 1º, 2º e 3º graus. A ferida de 1º grau afeta preferencialmente a epiderme e, ocasionalmente, a

derme. A de 2º grau atinge a região superficial ou profunda da derme. A de 3º grau acomete tecidos mais profundos (adiposo, tendões, músculo e ossos). De acordo com o sistema de classificação de lesão por queimaduras atual, tanto a extensão da lesão quanto do número de camadas (profundidade) de pele afetada deve ser considerada, onde a cicatrização segue um padrão de fases ordenadas com base nessa lesão (Tabela 1; Greenhalgh, 2007; Connolly et al., 2016).

Espessura	Grau	Profundidade	Características	Resolução/Sensibilidade
Epidérmica superficial	1º	Epiderme	Dor, rubor, edema discreto	3 a 6 dias (dolorosa)
Superficial parcial	2º	Derme, região papilar	Dor, bolhas, pele manchada, edema grave	7 a 21 dias (termonociceptiva)
Parcial profunda	3º	Derme, região reticular	Coriáceo, sem cor e sem muita dor	> 21 dias, geralmente requer tratamento cirúrgico (apenas percepção mecânica)
Parcial completa	-	Hipoderme, subcutâneo	Pele esbranquiçada a carbonizada-cinza, seca sem elasticidade, sem tato, escaras	Rara, a menos se tratado cirurgicamente (apenas pressão profunda)
Profunda completa (+)	-	Estende-se para fáscia e/ou músculo	Carbonizada a preto	Nunca, a menos se tratada cirurgicamente (pressão profunda)

Tabela 1. Características das queimaduras de acordo com a espessura/extensão. Adaptada: (<http://www.woundsource.com>)

Paralelamente, alterações complexas e inespecíficas ocorrem sistemicamente nos pacientes com queimaduras, que afetam os sistemas cardiovascular, imunológico e neuro-hormonal que, em muitos casos, evolui para um

quadro hipermetabólico. Essas atividades catabólicas (glicocorticoides) e anabolizantes elevadas, atuam como mecanismos de defesa do organismo, a fim de prover maior aporte energética e manutenção da homeostasia (Jeschke et al. 2007). Nesse contexto, dados interessantes da literatura mostram que pacientes com obesidade moderada (IMC: 30-34) que sofreram queimaduras, se beneficiaram das reservas calóricas durante o processo catabólico (Jeschke et al. 2013, Ray et al. 2015). Entretanto, os indivíduos com obesidade mórbida (IMC: >40) que sofreram queimaduras, suas reservas calóricas em excesso atuam como fatores de risco, uma vez que o metabolismo aumentado por tempo prolongado, leva ao catabolismo exagerado. Isto, associado à hipoperfusão esplênica, promove falência múltipla de órgãos e morte (Hettiaratchy e Dziwulski, 2004; Yarrow et al., 2009; Jeschke et al. 2011). Da mesma forma, lesões por queimaduras em pacientes com desnutrição aguda levaram a uma taxa maior de óbitos no Hospital Academia Nelson Mandela em Mthatha (África do Sul). (Kingu et al., 2011). Ademais, Dylewski et al (2010) observaram que o tempo de cicatrização da ferida por lesão térmica foi maior em pacientes desnutridos em relação aos pacientes saudáveis no Hospital das Crianças de Shriners (Boston, EUA).

Por seu turno, achados experimentais mostram efeitos benéficos para as lipoproteínas de alta densidade (HDL) na cicatrização de feridas, uma vez que o tratamento tópico com as HDL em sistema de entrega em gel corrigiu a deficiência na cicatrização de ferida em camundongo obeso nocaute da Apolipoproteína E (Apo-E; Gordts et al., 2014). Está bem estabelecido que a Apo-E, proteína integrante de todas as lipoproteínas, exerce funções importantes no metabolismo dos lipídios e transporte de colesterol em vários tecidos (Phillips, 2014). Camundongos nocautes para Apo-E exibem atraso na resposta sensitiva, alterações morfológicas em fibras C não mielinizadas, regulação da angiogênese intraneural e VEGF (Pola et al. 2003). Em plasma de coelho submetido à lesão térmica observou-se hipertrigliceridemia e alterações na concentração das apolipoproteínas por longo período, possivelmente isto afeta o transporte lipídico na fase pós-lesão (Vega e Baxter, 1988).

1.2 Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) e seu efeito terapêutico no reparo tecidual da lesão térmica

Estudos recentes, porém, limitados e controversos, destacam um efeito protetor ou deletério para o sulfeto de hidrogênio (H₂S) nos mecanismos de inflamação e regeneração subjacentes à lesão térmica. Há, pelo menos, uma década, o H₂S despontou como um mediador endógeno, capaz de regular várias funções fisiológicas e fisiopatológicas nos sistemas vascular, imunológico e nervoso (Kimura 2014). Produzido por vários tipos celulares e órgãos de mamíferos, a partir de dessulfidação do substrato “cisteína”, via reação catalisada por enzimas presentes no citosol e dependentes de piridoxal-5-fosfato: a cistationina β-sintase (CBS) e cistationina gama-liase (CSE) (vide revisão: Wang et al, 2014). No rim, o H₂S é produzido por ação combinada da 3-mercaptopiruvato-sulfurtransferase (3-MST) e D-aminoácido oxidase. Enzimas produtoras de H₂S, predominantemente na mitocôndria, foram também caracterizadas (3-MST e a cisteína aminotransferase – CAT; Miyamoto et al., 2014), e vêm sendo alvos de estudos do papel do H₂S nas lesões por queimaduras (Ahmad e Szabo, 2016, Ahmad et al., 2017).

Em modelo de lesão térmica grave (30% da área corpórea) induzido por escaldamento na pele dorsal de camundongo, Ahmad e Szabo (2016) também observaram que o tratamento sistêmico dos animais com o doador de H₂S com alvo mitocondrial, o AP39 (trifenilfosfonio acoplado por ligação alifática a uma porção ditioneolona doadora de H₂S), reduziu significativamente parâmetros inflamatórios e de lesão celular (estresse oxidativo) na fase inicial (24 h) e tardia (7 dias) na pele acometida com a lesão térmica. Concomitantemente aos efeitos benéficos observados com o AP39 nesse modelo, observou-se redução significativa de marcadores sistêmicos da inflamação e ou de lesões/estresse celulares e tissulares em órgãos, como o pulmão, fígado, rim e pâncreas (atividade da mieloperoxidase, malondialdeído (MDA), IL-6, amilase, creatinina, fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT)). Curiosamente, empregando o mesmo protocolo experimental em animais deficientes da enzima CSE, Ahmed et al (2017) demonstraram que a concentração sérica de H₂S não foi alterada e tampouco das enzimas envolvidas na sua síntese (CSE, CBS e 3-MST) em relação ao aumento observado no respectivo grupo selvagem com a lesão por escaldamento. Os mesmos autores observaram que, paradoxalmente, os animais deficientes de CSE exibiram melhora dos parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos, assim como dos marcadores de estresse oxidativo e lesão tissular (citocinas, MPO, MDA, enzimas hepáticas e outras), indicando que a deficiência da CSE auxilia na melhora da função de órgãos alvo e reduz a resposta inflamatória

nesse modelo de lesão térmica. Corroborando esses achados, Zhang et al (2010) demonstraram em modelo de lesão térmica grave (>25% da área corporal) induzido por escaldamento na pele dorsal, que a inibição da síntese endógena de H₂S melhora os parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos da lesão térmica, enquanto o tratamento dos animais com um doador de H₂S (NaHS) potencializa o quadro de lesão térmica, sugerindo que o H₂S contribui para os eventos inflamatórios (local e sistêmico) nesse modelo.

Em contrapartida, em modelo de ferida induzida em rato diabético, a aplicação tópica do bissulfeto de sódio promoveu efeitos anti-inflamatórios e acelerou o processo de cicatrização da ferida, efeitos estes associados à menor expressão de TNF- α e aumento da expressão de VEGF e ICAM-1 (Wang et al. 2015). Em modelo de ferida diabética, o tratamento i.p. dos animais com o doador de H₂S de liberação rápida, NaHS, promoveu efeitos anti-inflamatórios (menor concentração de IL-6 e TNF- α) e angiogênese. Ao contrário, a administração de inibidores da síntese de H₂S em cultura de células HUVEC reduziu a concentração de VEGF (Papapetropoulos et al., 2009). Reforçando esses achados, em camundongos nocautes para CSE, o tempo de cicatrização (e revascularização) da ferida induzida por escaldamento foi significativamente maior em relação ao grupo selvagem (Papapetropoulos et al., 2009). Vale acrescentar que o metabolismo do H₂S ocorre, principalmente, nas mitocôndrias, onde sofre oxidação pela ação da enzima sulfeto quinona oxiredutase (SQOR) (Jackson et al, 2015), sendo convertido a sulfeto pela persulfeto dioxigenase e, por fim, em tiosulfato pela rhodanase (Kimura, 2014; Stein e Bailey, 2013).

Vários estudos, incluindo do nosso grupo, vêm destacando um papel promissor para o H₂S em doenças inflamatórias e processos sensitivos (dor e prurido), incluindo a pele, pulmão, cavidade oral e articulações (Ekundi-Valentim et al., 2010; 2013; Benetti et al., 2013; Szczesny et al. 2014; Herrera et al., 2015; Wang et al., 2015; Gemici et al., 2015; Campos et al., 2016; Coavoy-Sanchez et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; 2018). Entretanto, o envolvimento do H₂S nos mecanismos de ação subjacentes à inflamação e cicatrização resultante de lesão térmica ainda é bastante obscuro e foi apenas recentemente proposto.

Durante muitos anos as feridas por queimaduras foram tratadas com curativos ou bandagens embebidas em solução fisiológica. Recentemente, a introdução de curativos sintéticos e biológicos, assim como as terapias não farmacológicas (ex.: técnicas cirúrgicas de enxerto) têm contribuído para acelerar o

processo de resolução/cicatrização das feridas por queimaduras. Em pacientes com queimaduras extensas, de 30 a 75 % da superfície da área corporal, provocadas por líquido quente ou chama, o tratamento com curativos biológicos (Xenoderm) acelerou o processo de cicatrização, e reduziu a taxa de mortalidade em relação ao tratamento convencional (Hosseini et al. 2009). Em queimaduras de espessura parcial com múltipla profundidade, de ocorrência comum, um protocolo eficiente de terapia farmacológica ainda não está bem estabelecido, muito embora a terapia com fatores de crescimento recombinante transformador (TGF- β), epidermal (EGF) e PDGF vem sendo proposto. Apesar do resultado positivo, esta terapia se torna inacessível devido ao alto custo e do risco de desenvolver outras doenças, como o câncer (vide revisão: Rowan et al., 2015; Margadant e Sonnenberg 2010).

Estudos em modelos experimentais, que mimetizam vários dos parâmetros e aspectos de queimaduras observados em humanos são muito úteis e, de longa data, vêm sendo empregados para ampliar o conhecimento da fisiopatologia da queimadura, sua resolução, as respostas sistêmicas, celulares e moleculares associadas e, principalmente, no estudo de novas moléculas (Hettiaratchy e Dziewulski, 2004; Abdullahi et al., 2014; vide revisão: Rowan et al., 2015). Estudos in vitro (culturas de células) também fornecem subsídios úteis para melhor compreensão da complexidade de respostas na ocorrência de lesão térmica, muito embora se deva admitir que, também, possui limitações, que exhibe maior ou menor relevância translacional (Qu e Nourbakhsh 2017).

1.3 Justificativa do estudo e objetivos

A taxa de mortalidade de pacientes com lesões por queimaduras, particularmente os obesos ou com sobrepeso, tem crescido, em parte, porque a população (adultos e crianças) mundial de obesos quase triplicou nos últimos 30 anos (Jeschke et al., 2013; Ogden et al. 2014). Em contrapartida, a terapia farmacológica das lesões por queimaduras não progrediu da mesma forma (Stubhaug et al. 2007, Franz et al., 2007; Huang et al. 2015, WHO 2018), embora o emprego de novas abordagens terapêuticas tópicas, como os curativos tópicos contendo como base polímeros aquosos (hidrogel), que aceleram o processo de cicatrização, quando associados (ou não) à antibióticos (Ghadiri et al., 2014), fatores de crescimento, como o PDGF, VEGF e EGF (Ribeiro et al. 2013) e as endopeptidases (ex.: lisostafina; Cui

et al. 2011). Entretanto, o alto custo dessa terapia limita o acesso e a adesão dos pacientes, em particular daqueles que residem em países de baixa renda ou em desenvolvimento (Madaghiele et al., 2014).

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, vale ressaltar que em resultados recentes do grupo ainda não publicados, mas que resultou em patente depositada (BR 1020170031837), o desenvolvimento e emprego de 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 (Figura 1; 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.

Diante desse cenário, hipotetizamos que a aplicação tópica do doador de H₂S mitocondrial AP39, por meio de sistemas micro e nanoestruturados de entrega que otimizaram a biodisponibilidade de moléculas doadores de H₂S em camadas profundas da pele, possui também potencial elevado como alvo de tratamento da inflamação e lesão cutânea por queimaduras. Acredita-se que estudos nesta direção são necessários e auxiliarão numa melhor compreensão sobre os efeitos do H₂S (AP39) e mecanismos de ação subjacentes às lesões e inflamação oriundas de queimaduras na pele de indivíduos obesos (e normais).

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver e testar sistemas de entrega (nano- e micro- estruturados) tópico para o doador de H₂S mitocondrial, AP39;
2. Padronizar um modelo de lesão térmica (2º grau) cutânea superficial parcial decorrente da aplicação cutânea do disco de metal quente (80 °C, 30 s);
3. Padronizar um modelo de obesidade em camundongos deficientes de ApoE alimentados com DH durante 12 semanas;
4. Avaliar respostas inflamatórias e de resolução (cicatrização) na pele dorsal de camundongos no percurso temporal de 24 h e 08 dias em animais selvagens (C57BL/6) alimentados com DP;

5. Averiguar o efeito terapêutico da formulação 1.5 isolada e incorporada ao AP39 sobre a lesão térmica de camundongos C57bl/6 alimentados com DP e DH;
6. Averiguar o efeito terapêutico da formulação 1.5 isolada e incorporada ao AP39 sobre a lesão térmica de camundongos ApoE -/- alimentados com DP e DH;
7. Avaliar a viabilidade celular da cultura de fibroblastos linhagem 3T3 na presença de concentrações crescentes de AP39.
8. Avaliar o efeito do AP39 na cicatrização *in vitro* em modelo de fechamento de ferida 2D com fibroblastos linhagem 3T3 na presença de concentrações crescentes de AP39.

7 CONCLUSÃO

Por fim, conclui-se que:

1. Foi possível desenvolver um sistema de entrega (formulação 1.5) compatível com a molécula teste AP39;
2. Em cultura de células 3t3, empregando o modelo de cicatrização, o AP39 foi capaz de aumentar a migração de fibroblastos, indicando potencial no processo de regeneração de feridas;
3. O emprego da placa esferoide quente, na temperatura de 80 °C, durante 30 segundos na região dorsal dos camundongos anestesiados, resultou dentre as demais temperaturas testadas (65, 70 e 75 °C), numa lesão cutânea característica de queimadura de 2º grau, caracterizada por lesão da epiderme, derme e redução da vascularização;
4. A dieta hiperlipídica foi capaz de provocar aumento na gordura branca de animais nocautes ApoE, mas não em animais selvagens e foi capaz de induzir resistência à insulina e tolerância a glicose nesses animais.
5. O tratamento tópico com o sistema de entrega contendo AP39 (150 nM/g) sobre as lesões cutânea pela aplicação do estímulo térmico foi capaz de aumentar a atividade antioxidante do tecido, promovendo melhoras no tratamento da lesão.
6. O tratamento tópico aumentou a reepitelização em animais C57bl/6 alimentados com DH, mas teve efeito reverso nos animais nocautes ApoE.

9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERIODO

9.1 Disciplinas cursadas

BMF5884 - Farmacologia Cardiovascular.

QBQ5789 - Bioenergética Mitocondrial: Abordagens in situ e in vivo.

BMF5889 - Neurofarmacologia sem Fronteiras.

ICB5769 - Divulgação Científica.

BMA5894 - Neuromodulação da Dor.

BMF5881 - Medicina Personalizada: Contribuições da Farmacogenômica e da Nanotecnologia.

BMF5895 - Atualização em Farmacologia – Módulo 3.

BMF5874 - Atualizações em Farmacologia (Módulo 2): Novos Conhecimentos em Produtos Naturais, Descoberta de Medicamentos e Sistemas de Entrega em Doenças de Pele.

ENC5943 - Ensaio Clínico sobre Cuidados com a Pele e Feridas: Prática de Enfermagem Baseada em Evidências.

9.2 Trabalhos Publicados

Oliveira, Janaíne P. ; Abreu, Fabíula F. ; Bispo, José Marcos M. ; **Cerqueira, Anderson R. A.** ; Santos, José Ronaldo Dos ; Correa, Cristiane B. ; Costa, Soraia K. P. ; Camargo, Enilton A. Myrtenol Reduces Orofacial Nociception and Inflammation in Mice Through p38-MAPK and Cytokine Inhibition. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 01, 2022.

Santamarina, AB; Moraes, RCM; Nehmi Filho, V; Murata, GM; De Freitas, JA; De Miranda, DA; **Cerqueira, ARA**; Costa, SKP; Ferreira, AFF; Britto, LR; De Camargo, JA; Rodrigues De Oliveira, D; De Jesus, FN; Otoch, JP; Pessoa, AFM. The Symbiotic Effect of a New Nutraceutical with Yeast β -Glucan, Prebiotics, Minerals, and Silybum marianum (Silymarin) for Recovering Metabolic Homeostasis via Pgc-1 α , Il-6, and Il-10 Gene Expression in a Type-2 Diabetes Obesity Model. *Antioxidants*, v. 11, p. 447, 2022.

Livia L Camargo, Alexandre Denadai-Souza, Lidia M Yshii, Carla Lima, Simone A Teixeira, **Anderson R A Cerqueira**, Mayara C F Gewehr, Elizabeth S Fernandes,

André A Schenka, Marcelo N Muscará, Emer S Ferro, Soraia K P Costa. The potential anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of rat hemopressin (PVNFKFLSH) in experimental arthritis. *Eur J Pharmacol.* 2020, Oct 11.

Chaves Cayuela, Natalie ; Kiyomi Koike, Marcia ; Jacysyn, Jacqueline De Fátima ; Rasslan, Roberto ; Azevedo Cerqueira, **Anderson Romério**; Pereira Costa, Soraia Katia ; Picanço Diniz-Júnior, José Antônio ; Massazo Utiyama, Edivaldo ; Frasson De Souza Montero, Edna . N-Acetylcysteine Reduced Ischemia and Reperfusion Damage Associated with Steatohepatitis in Mice. *International journal of molecular sciences*, v. 21, p. 4106, 2020.

Simone A. Teixeira, Gabriel Luciano Gomes, Leandro Rodrigues, Flavia Neto de Jesus, Antonio G. Soares, **Anderson Romério Azevedo Cerqueira**, Karla B. Feitosa, Karina Barbosa Alves, Larissa Regina Silva de Oliveira, Eliana Hiromi Akamine, Marcelo Nicolas Muscará, Soraia K.P. Costa. Caracterização da geração do sulfeto de hidrogênio (H₂S) em tecidos de camundongos com senescência acelerada (SAMP8). *Tópicos multidisciplinares em ciências biológicas* 3, capítulo 7. 2020.

Cerqueira, Anderson R.A.; Bolin, A. P. *Farmacologia da Inflamação*. In: Alice Cristina Rodrigues; Paola Cristina Branco. (Org.). *Métodos em Farmacologia Atualidades e Desafios*. 01ed.SÃO PAULO: Payá, 2019, v. 01, p. 11-21.

9.3 *Eventos*

(Apresentação oral) **Cerqueira, A.R.A**; Teixeira, S.A. ; Coavoy-Sanchez, S. A. ; Oliveira, J.P. ; Wood, Mark E. ; Whiteman, M. ; Muscará, M.N. ; Lopes, Luciana. B. ; Costa, S.K.P. . Efficiency of a delivery system for the mitochondrial hydrogen sulfide donor AP39 in burn wound treatment. **Pharmacology, 2021**.

(Apresentação oral) **Cerqueira, A.R.A**; Teixeira, Simone A. ; Coavoy-Sanchez, S. A. ; Oliveira, J.P. ; Wood, M. ; Whiteman, M. ; Muscará, M.N. ; Lopes, Luciana. B. ; Costa, Soraia K.P. Antioxidant effect of mitochondrial H₂S donor (AP39) in topical treatment for burn injury. **51st Brazilian congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2021**.

(Apresentação oral) **Cerqueira, A. R. A.**; Matos, J. K. R. ; Spadari, C. C. ; Teixeira, S.A. ; Whiteman, M. ; Muscará, M.N. ; Lopes, Luciana. B. ; Costa, S.K.P. . Development and challenges of topical mitochondrial target hydrogen sulphide based-nanocarrier system for burn skin wound. **51st Brazilian congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.**

(Apresentação oral) **Cerqueira, A.R.A.** Nanohealing - Moléculas doadoras de sulfeto para feridas. **Emerge search ICB, 2019.**

(Avaliador) **27º SIICUSP** - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo.

(Avaliador) **26º SIICUSP** - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo.

9.4 Posters

Gois, G.A. ; **Cerqueira, A.R.A** ; Oliveira, J.P. ; Costa, S.K.P. . Investigação farmacológica do potencial cicatrizante e analgésico de doadores de H₂S na lesão térmica: influência da obesidade. **SIICUSP, 2021.**

Amorim L.O. ; **Cerqueira, A.R.A** ; Serra C.S.M. ; Costa, Soraia K.P. . Caracterização Farmacológica De Doadores De Sulfeto De Hidrogênio (H₂s) Na Inflamação E Resolução. **SIICUSP, 2020.**

Moreira, L.M.O. ; **Cerqueira, A.R.A** ; Teixeira, Simone A. ; Costa, Soraia K. P. Padronização de metodologias in vitro e ex vivo para determinação da atividade anti-inflamatória do extrato da glândula salivar do mosquito *Aedes aegypti*. **SIICUSP, 2020.**

Cerqueira, A.R.A; Matos, J. K. R. ; Spadari, C. C. ; Teixeira, S.A. ; Whiteman, M. ; Muscará, M.N. ; Lopes, Luciana. B. ; Costa, S.K.P. . Development and challenges of topical mitochondrial target hydrogen sulphide based-nanocarrier system for burn skin wound. In: 51st Brazilian congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics,

2019, Maceió. **51st Brazilian congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.**

Teixeira, S.A. ; Gomes, G. L. ; Rodrigues, L. ; **Cerqueira, A. R. A.** ; Alves, K. B. ; Oliveira, L. ; Nascimento, N. ; Silva, G. B. ; Akamine, E. ; Whiteman, M. ; Muscará, M.N. ; Costa, S.K.P. . The effects of aging on the production of hydrogen sulfide (H₂S) in the murine skin. **51st Brazilian congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019.**

Morais, T. N. ; **Cerqueira, A. R. A.** ; Sa-Nunes, A. ; Costa, S.K.P. . Atividade farmacológica de frações isoladas do extrato de glândula salivar de mosquitos *Aedes aegypti* sobre o infiltrado de células inflamatórias na pele de camundongos. **26th SIICUSP, 2019.**

Oliveira, I. C. V. ; **Cerqueira, A.R.A** ; Sa-Nunes, A. ; Costa, S.K.P. . Atividade anti-pruritogênica de compostos bioativos isolados do Extrato da Glândula Salivar do *Aedes aegypti*. **26th SIICUSP, 2019.**

Leite, C. C. G. ; **Cerqueira, A.R.A** ; Lopes, Luciana. B. ; Costa, S.K.P. ; Muscará, M.N. Desenvolvimento de sistemas nanocarreadores para incorporação de moléculas doadoras de sulfeto de hidrogênio e a influência destas na pele saudável e inflamada. **26th SIICUSP, 2019.**

Cerqueira, A.R.A. Nanohealing - Moléculas doadoras de sulfeto para feridas. **Emerge Search ICB, 2019.**

Cerqueira, A.R.A; Rodrigues, L. ; Teixeira, S.A. ; Taniguchi, E. Y. ; Cassola, A. C. ; Sa-Nunes, A. ; Costa, S.K.P. . *Aedes aegypti* salivary gland extract alleviates acute itching by blocking TRP channels. In: **22nd International Symposium on Regulatory Peptides, 2018**, Acapulco.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullahi, A., S. Amini-Nik & M. Jeschke (2014) Animal Models in Burn Research. *Cell Mol Life Sci*, 71, 3241-55.
- Ahmad A, Druzhyzna N, Szabo C. Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn. *Burns*. 2017 Aug;43(5):1021-1033. doi: 10.1016/j.burns.2017.02.011.
- Ahmad, A. & C. Szabo (2016) Both the H₂S biosynthesis inhibitor aminooxyacetic acid and the mitochondrially targeted H₂S donor AP39 exert protective effects in a mouse model of burn injury. *Pharmacol Res*, 113, 348-355.
- Ahmad A, Druzhyzna N, Szabo C. Effect of 3-mercaptopyruvate Sulfurtransferase Deficiency on the Development of Multiorgan Failure, Inflammation, and Wound Healing in Mice Subjected to Burn Injury. *J Burn Care Res*. 2019 Feb 20;40(2):148-156. doi: 10.1093/jbcr/irz007. PMID: 30649358.
- Abbas OL, Özatik O, Terzi YK, Özatik FY, Nar R, Turna G. The Notch Signaling System Is Involved in the Regulation of Reparative Angiogenesis in the Zone of Stasis. *J Burn Care Res*. 2017 Nov/Dec;38(6):e923-e933. doi: 10.1097/BCR.0000000000000522. PMID: 28319529.
- Aldana MC, Navarrete N. Epidemiology of a decade of Pediatric fatal burns in Colombia, South America. *Burns* 2015; 41:1587.
- American Burn Association White Paper. Surgical management of the burn wound and use of skin substitutes. Copyright 2009. www.ameriburn.or (Accessed on January 04, 2010).
- Azevedo, F., A. Pessoa, G. Moreira, M. Dos Santos, E. Liberti, E. Araujo, C. Carvalho, M. Saad & M. H. Lima (2016) Effect of Topical Insulin on Second-Degree Burns in Diabetic Rats. *Biol Res Nurs*, 18, 181-92.
- Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 5;698(1-3):463-9.
- Beltowski J. Synthesis, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Hydrogen Sulfide: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2019;2007:1-8. doi: 10.1007/978-1-4939-9528-8_1. PMID: 31148102.

- Bian X, Ma K, Zhang C, Fu X. Therapeutic angiogenesis using stem cell-derived extracellular vesicles: an emerging approach for treatment of ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Jun 3;10(1):158. doi: 10.1186/s13287-019-1276-z. PMID: 31159859; PMCID: PMC6545721.
- Campos D, Ravagnani FG, Gurgueira SA, Vercesi AE, Teixeira SA, Costa SKP, Muscará MN, Ferreira HHA. Increased glutathione levels contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide and inducible nitric oxide inhibition in allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2016 ;39:57-62.
- Chatzianastasiou A, Bibli SI, Andreadou I, Efentakis P, Kaludercic N, Wood ME, Whiteman M, Di Lisa F, Daiber A, Manolopoulos VG, Szabó C, Papapetropoulos A. Cardioprotection by H₂S Donors: Nitric Oxide-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Sep;358(3):431-40. doi: 10.1124/jpet.116.235119. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27342567; PMCID: PMC6047225.
- Cheung, M. C., P. B. Spalding, J. C. Gutierrez, W. Balkan, N. Namias, L. G. Koniaris & T. A. Zimmers (2009) Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *J Surg Res*, 153, 326-31.
- Coavoy-Sánchez SA, Rodrigues L, Teixeira SA, Soares AG, Torregrossa R, Wood ME, Whiteman M, Costa SK, Muscará MN. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):686-694.
- Connolly S. *Clinical Practice Guidelines: Burn Patient Management.* 2014.
- Covarrubias AE, Lecarpentier E, Lo A, Salahuddin S, Gray KJ, Karumanchi SA, Zsengellér ZK. AP39, a Modulator of Mitochondrial Bioenergetics, Reduces Antiangiogenic Response and Oxidative Stress in Hypoxia-Exposed Trophoblasts: Relevance for Preeclampsia Pathogenesis. *Am J Pathol.* 2019 Jan;189(1):104-114. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.09.007. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30315766; PMCID: PMC6854435.
- Cui, F., G. Li, J. Huang, J. Zhang, M. Lu, W. Lu, J. Huan & Q. Huang (2011) Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promotion wound healing properties. *Drug Deliv*, 18, 173-80.
- Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function.

- Dylewski ML¹, Prelack K, Weber JM, Keaney T, Ryan CM, Sheridan RL, Fagan SP. Malnutrition among pediatric burn patients: A consequence of delayed admissions. *Burns*. 2010 36(8):1185-9.
- Ekundi-Valentim E, Mesquita relação aFP, Santos KT, de Paula MA, Florenzano J, Zandoni CI, Rodrigues L, de Nucci G, Teixeira SA, Ferreira HH, Wallace JL, Costa SK, Muscará MN. 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. *Med Gas Res*. 2013 16;3(1):24.
- Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zandoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol*. 2010;159(7):1463-74.
- Ermolov, A. S., S. V. Smirnov, V. B. Khvatov, L. P. Istranov, O. I. Koniushko, E. G. Kolokolchikova, M. V. Sychevsky & V. S. Bocharova (2008) The use of bioactive wound dressing, stimulating epithelial regeneration of IIIa-degree burn wounds. *Bull Exp Biol Med*, 146, 153-7.
- Forjuoh SN. Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. *Burns* 2006; 32:529.
- Gemici B, Elsheikh W, Feitosa KB, Costa SK, Muscara MN, Wallace JL. H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. *Nitric Oxide*. 2015 30;46:25-31.
- Ghadiri, M., W. Chrzanowski & R. Rohanzadeh (2014) Antibiotic eluting clay mineral (Laponite(R)) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*, 25, 2513-26.
- Goelz MF, Mahler J, Harry J, Myers P, Clark J, Thigpen JE, Forsythe DB. Neuropathologic findings associated with seizures in FVB mice. *Lab Anim Sci*. 1998 Feb;48(1):34-7. PMID: 9517887.
- Gordts SC, Muthuramu I, Amin R, Jacobs F, De Geest B. The Impact of Lipoproteins on Wound Healing: Topical HDL Therapy Corrects Delayed Wound Healing in Apolipoprotein E Deficient Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014 Apr 3;7(4):419-32.
- Greenhalgh DG. Consequences of excessive scar formation: dealing with the problem and aiming for the future. *Wound Repair Regen*. 2008 Jul-Aug;16(4):582.

- Haghdoost F1, Baradaran Mahdavi MM, Zandifar A, Sanei MH, Zolfaghari B, Javanmard SH. Pistacia atlantica Resin Has a Dose-Dependent Effect on Angiogenesis and Skin Burn Wound Healing in Rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:893425.
- Hart DW, Wolf SE, Chinkes DL, Lal SO, Ramzy PI, Herndon DN. Beta-blockade and growth hormone after burn. *Ann Surg.* 2002 Oct;236(4):450-6; discussion 456-7.
- Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, Teixeira SA, Costa SK, Wallace JL, Spolidorio LC, Muscara MN. The H₂S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. *Med Gas Res.* 2015 Feb 27;5:4.
- Hettiaratchy, S, Dziewulski, P. Pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004 July 17; 329(7458): 148.
- Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstuhl C, Lee BC, Brace L, Longchamp A, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Ozaki CK, Wang R, Gladyshev VN, Madeo F, Mair WB, Mitchell JR. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell.* 2015 15;160:132-44.
- Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of Paclitaxel: impact of the monoglyceride. *Pharm Res.* 2013 Mar;30(3):694-706. doi: 10.1007/s11095-012-0908-0. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23135821.
- Hosseini, S. N., S. N. Mousavinasab, H. Rahmanpour & M. Fallahnezhad (2009) A biological dressing versus 'conventional' treatment in patients with massive burns: a clinical trial. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 15, 135-40.
- Huang, G., B. Liang, G. Liu, K. Liu & Z. Ding (2015) Low dose of glucocorticoid decreases the incidence of complications in severely burned patients by attenuating systemic inflammation. *J Crit Care*, 30, 436.e7-11.
- Hur J, Yang HT, Chun W, Kim JH, Shin SH, Kang HJ, Kim HS. Inflammatory cytokines and their prognostic ability in cases of major burn injury. *Ann Lab Med.* 2015 ;35(1):105-10.
- Institute for Health Metrics and Evaluation. The Global Burden of Disease: 2010 Update. IHME, Seattle, 2012. viz.healthmetricsandevaluation.org/gbd-compare/. (Accessed on July 01, 2013).
- International Best Practice Guidelines. Best Practice Guidelines : Effective Skin and Wound Management of Non-Complex Burns. *Wounds Int.* 2014.

- Jackson MR, Melideo SL, Jorns MS. Role of human sulfide: quinone oxidoreductase in H₂S metabolism. *Methods Enzymol.* 2015;554:255-70.
- Jeschke, M. G., C. C. Finnerty, F. Emdad, H. G. Rivero, R. Kraft, F. N. Williams, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, M. B. Klein, B. D. Arnoldo, R. G. Tompkins & D. N. Herndon (2013) Mild obesity is protective after severe burn injury. *Ann Surg*, 258, 1119-29.
- Jeschke, M. G., G. G. Gauglitz, G. A. Kulp, C. C. Finnerty, F. N. Williams, R. Kraft, O. E. Suman, R. P. Mlcak & D. N. Herndon (2011) Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PLoS One*, 6, e21245.
- Jeschke, M. G., R. P. Mlcak, C. C. Finnerty, W. B. Norbury, G. G. Gauglitz, G. A. Kulp & D. N. Herndon (2007) Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Crit Care*, 11, R90.
- Khalil, M. H., J. F. Marcelletti, L. R. Katz, D. H. Katz & L. E. Pope (2000) Topical application of docosanol- or stearic acid-containing creams reduces severity of phenol burn wounds in mice. *Contact Dermatitis*, 43, 79-81.
- Kimura, H. (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules*, 19, 16146-57.
- Kingu HJ1, Longo-Mbenza B, Dhaffala A, Mazwai EL. Survival function and protein malnutrition in burns patients at a rural hospital in Africa. *World J Surg.* 2011 Jul;35(7):1546-52. doi: 10.1007/s00268-011-1122-7.
- Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011 Jul 11;13:e23.. Review.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods.* 2010 Jun;7(6):447-9. doi: 10.1038/nmeth.1455. Epub 2010 May 9. PMID: 20453868.
- Lane-Donovan, C. & J. Herz. 2016. High-Fat Diet Changes Hippocampal Apolipoprotein E (ApoE) in a Genotype- and Carbohydrate-Dependent Manner in Mice. In *PLoS One*.
- Li, Y., G. Z. C, X. H. Wang & D. H. Liu (2016) Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 3863-3867.
- Lopes, L. B. (2014) Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*, 6, 52-77.

- Madaghiele M, Demitri C, Sannino A, Ambrosio L. Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates. *Burns Trauma*. 2014 25;2(4):153-61.
- Margadant, C. & A. Sonnenberg (2010) Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*, 11, 97-105.
- McGlone F1, Reilly D. The cutaneous sensory system. *Immunity*. 2011 Dec 23;35(6):857-69. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.003. Review.
- Miller AL, Kitson GL, Skalkoyannis B, Flecknell PA, Leach MC. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl Anim Behav Sci*. 2016 Aug;181:160-165. doi: 10.1016/j.applanim.2016.05.020. PMID: 27499567; PMCID: PMC4962773.
- Miyamoto R1, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S. Contribution of cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase to hydrogen sulfide production in peripheral neurons. *J Neurochem*. 2014 Jul;130(1):29-40.
- Moritz, A. R. & F. C. Henriques (1947) Studies of Thermal Injury: II. The Relative Importance of Time and Surface Temperature in the Causation of Cutaneous Burns. *Am J Pathol*, 23, 695-720.
- Murray CJL, Lopez, AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020, World Health Organization, Switzerland 2006.
- Nauta A, Gurtner G, Longaker MT. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Dis*. 2011;17(6):541-9. Review.
- Pandey AP, Singh SS, Patil GB, Patil PO, Bhavsar CJ, Deshmukh PK. Sonication-assisted drug encapsulation in layer-by-layer self-assembled gelatin-poly (styrenesulfonate) polyelectrolyte nanocapsules: process optimization. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015;43(6):413-24
- Papapetropoulos A1, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabó C. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009
- Peck M, Pressman MA. The correlation between burn mortality rates from fire and flame and economic status of countries. *Burns* 2013; 39:1054.
- Peck, MD. Epidemiology of burn injuries globally. In I. Collins, KA (Ed.), UpToDate. Access: 08/02/2018. Disponível em <<https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-burn-injuries-globally>.

- Pepe D, McCall M, Zheng H, Lopes LB. Protein transduction domain-containing microemulsions as cutaneous delivery systems for an anticancer agent. *J Pharm Sci.* 2013 May;102(5):1476-87.
- Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life.* 2014 ;66(9):616-23.
- Pola R1, Gaetani E, Flex A, Aprahamian T, Proia AS, Bosch-Marcé M, Smith RC, Pola P. Peripheral nerve ischemia: apolipoprotein E deficiency results in impaired functional recovery and reduction of associated intraneural angiogenic response. *Exp Neurol.* 2003;184(1):264-73.
- Qu, M. & M. Nourbakhsh (2017) Current experimental models of burns. *Discov Med,* 23, 95-103.
- Ray, J. J., S. S. Satahoo, J. P. Meizoso, C. J. Allen, L. F. Teisch, K. G. Proctor, L. R. Pizano, N. Namias & C. I. Schulman (2015) Does obesity affect outcomes of adult burn patients? *J Surg Res,* 198, 450-5.
- Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. *Wound Repair Regen,* 8, 162-8.
- Ribeiro, M. P., P. I. Morgado, S. P. Miguel, P. Coutinho & I. J. Correia (2013) Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,* 33, 2958-66.
- Rodrigues L, Ekundi-Valentim E, Florenzano J, Cerqueira AR, Soares AG, Schmidt TP, Santos KT, Teixeira SA, Ribela MT, Rodrigues SF, de Carvalho MH, De Nucci G, Wood M, Whiteman M, Muscará MN, Costa SK. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. *Pharmacol Res.* 2017 Jan;115:255-266.
- Rowan, M. P., L. C. Cancio, E. A. Elster, D. M. Burmeister, L. F. Rose, S. Natesan, R. K. Chan, R. J. Christy & K. K. Chung. 2015. Burn wound healing and treatment: review and advancements. In *Crit Care.*
- Santos JV, Oliveira A, Costa-Pereira A, et al. Burden of burns in Portugal, 2000-2013: A clinical and economic analysis of 26,447 hospitalisations. *Burns* 2016; 42:891.
- Seluanov A1, Vaidya A, Gorbunova V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *J Vis Exp.* 2010 Oct 5;(44). pii: 2033. doi: 10.3791/2033.
- Senarath-Yapa K, Enoch S. Management of burns in the community. *Wounds*

- Shehan Hettiaratchy, Peter Dziewulski. ABC of burns Pathophysiology and types of burns. *BMJ* v 328: 1427-1429.
- Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care Res.* 2010 Nov-Dec;31(6):849-73. doi: 10.1097/BCR.0b013e3181f93571. PMID: 21105319.
- Smolle C, Cambiaso-Daniel J, Forbes AA, et al. Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. *Burns* 2017; 43:249.
- Stein A1, Bailey SM. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Redox Biol.* 2013 Jan 1;1(1):32-39.
- Stewart BT, Lafta R, Esa Al Shatari SA, et al. Burns in Baghdad from 2003 to 2014: Results of a randomized household cluster survey. *Burns* 2016; 42:48.
- Szczesny, B., K. Módis, K. Yanagi, C. Coletta, S. Le Trionnaire, M. E. Wood, M. Whiteman & C. Szabo (2014) AP39 [10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide], a mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide*, 41, 120-30.
- Vega GL, Baxter CR. Induction of hypertriglyceridemia in rabbits by thermal injury: I. Time course of elevated plasma triglyceride levels. *J Burn Care Rehabil.* 1988 May-Jun;9(3):266-70.
- Veras K, Lucena CF, Goedcke J, Evangelista FS, Carpinelli A, Carvalho CRO. Moderate Exercise Training Combined With a High-Fat and Sucrose Diet Protects Pancreatic Islet Function in Male C57BL/6J Mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 May 20;13:881236. doi: 10.3389/fendo.2022.881236.
- Wang JF, Li Y, Song JN, Pang HG. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem Int.* 2014 Jan;64:37-47. doi: 10.1016/j.neuint.2013.11.002. Epub 2013 Nov 14. Review.
- Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, Lajevardi SS, Li Z, Maitz PKM. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Jan 1;123:3-17. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.018. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28941987.
- Wang, G., W. Li, Q. Chen, Y. Jiang, X. Lu & X. Zhao (2015) Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 5097-104.

- World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update 2018. World Health Organization, Geneva 2008. (Accessed on April 02, 2010).www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf
- Yarrow J, Moiemmen N, Gulhane S. Early management of burns in children. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 2009;19(11):509–16.
- Yadav A, Verma S, Keshri GK, Gupta A. Role of 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation on nitroxidative stress and redox homeostasis in burn wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2020 May;36(3):208-218. doi: 10.1111/phpp.12538. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32027411.
- Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Mar;15(3):185-203. doi: 10.1038/nrd.2015.1. Epub 2015 Dec 18. PMID: 26678620; PMCID: PMC5319818.
- Zhao FL, Fang F, Qiao PF, Yan N, Gao D, Yan Y. AP39, a Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Supports Cellular Bioenergetics and Protects against Alzheimer's Disease by Preserving Mitochondrial Function in APP/PS1 Mice and Neurons. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8360738. doi: 10.1155/2016/8360738. Epub 2016 Jan 31. PMID: 27057285; PMCID: PMC4753001.
- Zhang D, Wang X, Chen S, Chen S, Yu W, Liu X, Yang G, Tao Y, Tang X, Bu D, Zhang H, Kong W, Tang C, Huang Y, Du J, Jin H. Endogenous hydrogen sulfide sulfhydrates IKK β at cysteine 179 to control pulmonary artery endothelial cell inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Oct 30;133(20):2045-2059. doi: 10.1042/CS20190514. PMID: 31654061.
- Zhang, J., S. W. Sio, S. Moochhala & M. Bhatia (2010) Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med*, 16, 417-24.
- Zhu H, Blake S, Chan KT, Pearson RB, Kang J. Cystathionine β -Synthase in Physiology and Cancer. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 28;2018:3205125. doi: 10.1155/2018/3205125. PMID: 30050925; PMCID: PMC6046153.
- Lohakul J, Jeayeng S, Chaiprasongsuk A, Torregrossa R, Wood ME, Saelim M, Thangboonjit W, Whiteman M, Panich U. Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Delivery Molecules Protect Against UVA-Induced Photoaging in Human Dermal Fibroblasts, and in Mouse Skin In Vivo. *Antioxid Redox Signal*. 2022 Jun;36(16-18):1268-1288. doi: 10.1089/ars.2020.8255. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34235951.

- Yu Y, Ye SM, Liu DY, Yang LQ. AP39 ameliorates high fat diet-induced liver injury in young rats via alleviation of oxidative stress and mitochondrial impairment. *Exp Anim*. 2021 Nov 10;70(4):553-562. doi: 10.1538/expanim.21-0056. Epub 2021 Jul 20. PMID: 34305077; PMCID: PMC8614011.
- Pantaleno R, Scuffi D, Costa A, Welchen E, Torregrossa R, Whiteman M, García-Mata C. Mitochondrial H₂S donor AP39 induces stomatal closure by modulating guard cell mitochondrial activity. *Plant Physiol*. 2022 Dec 23:kiac591. doi: 10.1093/plphys/kiac591. Epub ahead of print. PMID: 36560868.
- Yu T, Gao M, Yang P, Liu D, Wang D, Song F, Zhang X, Liu Y. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR- γ signaling during diabetic wound healing. *J Cell Physiol*. 2019 Apr;234(4):4217-4231. doi: 10.1002/jcp.27185. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30132863.
- Winnik S, Stein S, Matter CM. SIRT1 - an anti-inflammatory pathway at the crossroads between metabolic disease and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Nov;10(6):693-6. doi: 10.2174/157016112803520756. PMID: 23259556.
- Stuard WL, Titone R, Robertson DM. The IGF/Insulin-IGFBP Axis in Corneal Development, Wound Healing, and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Mar 3;11:24. doi: 10.3389/fendo.2020.00024. PMID: 32194500; PMCID: PMC7062709.
- Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*. 2001 Jul;50(7):1627-35. doi: 10.2337/diabetes.50.7.1627. PMID: 11423485.
- Ikeda K, Morizane S, Akagi T, Hiramatsu-Asano S, Tachibana K, Yahagi A, Iseki M, Kaneto H, Wada J, Ishihara K, Morita Y, Mukai T. Obesity and Dyslipidemia Synergistically Exacerbate Psoriatic Skin Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 13;23(8):4312. doi: 10.3390/ijms23084312. PMID: 35457132; PMCID: PMC9032572.