

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILA PEREIRA SABADINI

AÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA FUNÇÃO  
ENDOTELIAL SISTÊMICA: UM ESTUDO EM RATOS  
NORMOGLICÊMICOS E HIPERGLICÊMICOS

SÃO CARLOS

2024

CAMILA PEREIRA SABADINI

AÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA FUNÇÃO  
ENDOTELIAL SISTÊMICA: UM ESTUDO EM RATOS NORMOGLICÊMICOS E  
HIPERGLICÊMICOS

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/ UNESP, para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues.**

**Coorientador: Prof. Dr. Richard Eloin Liebano**

SÃO CARLOS

2024



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila Pereira Sabadini, realizada em 16/09/2024.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Danielle Cristina Garbuio (UNICEP)

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma (UNIARA)

Profa. Dra. Tereza Cristina Buzinari (FMRP-USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

## **AGRADECIMENTOS**

Esse agradecimento entra para essa tese não só como um elemento pré-textual, mas também como uma forma de humanizar e encerrar um ciclo de uma vida acadêmica que se inicia em 2012 e que se encerra em 2024. Foram doze anos que só foram possíveis de se concluir com ajuda de muitas mãos, suor, choros, risadas, conversas, entendimentos e companheirismo.

Sendo assim, primeiramente devo agradecer a acessibilidade de ingresso ao ensino superior e as medidas de assistência e permanência estudantil para ingresso em uma universidade pública, pois sem elas eu, estudante de escola pública com um ensino ineficiente, jamais teria tido a chance de ingressar e me manter em uma Universidade como a UFSCar. Durante os anos de mestrado e parte do doutorado, as bolsas foram minha única fonte de renda em uma área que conseguir se formar e trabalhar ao mesmo tempo era impensável.

Agradecimento ao apoio financeiro recebido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2022/01093-1) e a parcerias como com Profa. Evelin Capellari Carnio (USP – Ribeirão Preto) muito pouco de todo esse trabalho aqui escrito e toda minha experiência laboratorial teria sido possível. Foram essas oportunidades juntamente com auxílio das pessoas compreensivas que encontrei durante esse caminho que me possibilitaram alcançar diversos objetivos ao longo de meu desenvolvimento.

A primeira pessoa a quem devo meus agradecimentos por toda compreensão e ensinamentos de diversas fontes é meu Professor e Orientador Gerson Jhonatan Rodrigues, que me deu a liberdade de pensar como cientista, me proporcionou minhas

primeiras orientações e foi extremamente compreensível no momento em que fui pedir ajuda e ele soube me tranquilizar para que hoje este trabalho estivesse escrito e finalizado. Ao meu coorientador Doutor Richard Eloin Liebano e aos colegas que passaram ou ainda se encontram no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular: Patrícia, Vanessa, Camila, Rita, Jean, Thiago, Ariane, Jorge e Julio; A nossa técnica Grazielle e em especial aos amigos Barbara, Tereza e Cynthia que me acompanharam e me ensinaram muito ao longo de meu doutorado.

Aos amigos Luis Henrique e Nayara separo um momento especial para falar sobre eles, pois nesse trabalho eles foram pessoas essenciais para o desenvolvimento. Foram as mãos a mais que precisei para segurar cada ratinho, foram o apoio quando algo dava errado, foram a minha consciência quando eu pensava que nada mais daria certo, foram o alívio quando eu queria chorar, mas ao lado deles era a risada que tomava lugar. Eles fizeram esse trabalho comigo e se fosse possível que meu título de doutorado fosse estendido a outras pessoas, eles seriam mais do que merecedores disso. Durante anos fomos o melhor Team Diabetes que já existiu!

Durante o desenvolvimento desse projeto de doutorado várias outras pessoas trabalharam para que ele saísse, me mostrando que mais do que nunca, o apoio é uma das partes mais importantes no caminho para a conclusão de qualquer objetivo e isso ficou ainda mais claro ao enfrentar uma pandemia ao longo do período de trabalho experimental, coleta e análise de dados. Em isolamento social, as pessoas da família foram membros importantes no desenvolvimento do meu projeto. Minha Mãe Silvana, Meu Pai Ailton, Minha Avó Sebastiana, Meu Tio Júlio e Minha Tia Célia, Meu Irmão Caio e Minha Cunhada Virgínia, assim como a minha família de coração Bruna, Juliana, Marilene, Artur, Leandro, Fagner, Izabel, Seu Zé e Pâmela cada um

deles me ajudaram primeiramente mostrando como o amor e companheirismo é capaz de ser aconchego até nos momentos mais difíceis como em uma pandemia na qual tivemos diversas vidas ceifadas e uma delas foi meu próprio Avô Alécio (o resultado dessa tese é espelho do que perdê-lo me fez enxergar).

A vida é muito breve, e ao longo de minha história na academia pude perceber que a Camila que sempre existiu aqui se perdeu na brevidade do tempo de “sobra” que eu tinha não pensando em trabalho. A necessidade de ter uma carreira sólida, na profissão que amo, fazendo pesquisa na qual sempre fui encantada em pensar e resolver questões, se modificou aos poucos a hora que me despedi de meu Vô em uma cama de hospital após uma Salve Maria. E foi nessa situação que eu decidi que eu iria fazer valer a pena cada investimento em mim, cada investimento de tempo, cada vez que me dediquei e deixei de estar em meio a todos que sempre estiveram do meu lado.

Fui buscar naquilo que me manteve durante a graduação, a recreação, uma forma de me levantar e foi sendo a Tia Maçã que consegui reconstituir cada pedacinho da Camila que agora finaliza o ciclo na busca do título de Doutora. E nesse afastamento da academia por um tempo que pude encontrar o valor e dar sentido a tudo aquilo que ela me trouxe. Encontrei pessoas que tenho orgulho de citar o nome aqui como Talita (Tia Farofa), Leonidas (Tio Madruga), Alfonso (Tio Pikachu), Lucas (Dr. Pipoca), Fernando (Tio Minhoca), Yago (Tio Plutos), Ana Luiza (Tia Luppi), Racquel (Tia Kel), Carlos (Tio Kiwi), Gabriela (Tia Miojo), Felipe (Tio Pão) André (Capitão) e Mayara, que não têm vários artigos escritos, não têm livros publicados, mas me ensinam todos os dias um pouquinho mais sobre tudo o que faz sermos pessoas aptas para lidar com “o amor da vida de alguém” e no fim é sobre isso que se trata o conhecimento! E por fim, o meu muito obrigada ao meu companheiro de

vida, de trabalho e agora noivo, João Paulo, que carrega junto a mim e ao meu lado grande parte dessa responsabilidade e se hoje coloco o último ponto final nessa tese é porque ele fez parte de todo esse retorno a mim e esteve comigo em todo esse processo me fazendo acreditar em mim até quando eu não conseguia mais e me mostrando que não seria fácil, mas eu não estaria sozinha em momento algum e realmente não estive!

A cada pessoa que passou em minha vida e não cito aqui, a cada criança que pude brincar junto e descobrir o verdadeiro sentido do que é viver, o meu muito obrigada, pois vocês deixaram um pouco de si em mim e construíram mais um pedacinho do emaranhado que sou. E a Deus, só tenho a agradecer por esse ser meu ponto final nesse ciclo.

As mudanças mais bonitas  
Não vem com calma e sossego  
São uma ventania incontrolável  
Jogando tudo para cima  
Nada cai no mesmo lugar  
Nem as coisas  
Nem o coração  
Nem você  
- o tempo fechado nos abre  
(Ryane Leão)

## RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que se inicia imediatamente após a ruptura da integridade da pele. Este processo é dividido em quatro estágios: hemostase, fase inflamatória, fase proliferativa e remodelação. Em cada fase, há um processo crucial dos mediadores humorais, como fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS). Diversas condições patológicas, como inflamação e hiperglicemia, podem comprometer a cicatrização. Nessa condição, a função endotelial mediada por NO, EROS e citocinas torna-se um alvo terapêutico importante, logo, o objetivo deste estudo foi avaliar se o processo de cicatrização de feridas interfere na função endotelial em ratos normoglicêmicos (NG) e hiperglicêmicos (HG). Para isso, foi induzida uma lesão de 10 mm de diâmetro no dorso de 76 ratos Wistar, tratados (HG) ou não (NG) com 150 mg/kg de aloxano monohidratado, uma droga que induz hiperglicemia através do aumento de EROS. Foram analisadas as curvas de concentração-efeito induzida por acetilcolina para estudar a reatividade vascular, além dos níveis séricos de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e NO nos seguintes momentos: Dia -1 (antes da ferida), Dia 0 (dia da lesão – fase de hemostasia), Dia 4 (quatro dias após a ferida – fase inflamatória), Dia 8 (oito dias após a ferida – fase proliferativa) e Dia 14 (quatorze dias após a ferida – fase de remodelação). Os resultados indicaram que o processo de cicatrização pode causar disfunção endotelial (DE) em diferentes fases do processo para ratos NG e HG, ocorrendo nas fases de hemostase e inflamatória, respectivamente. Em relação ao perfil inflamatório, o TNF- $\alpha$  e a IL-6, principais mediadores do processo pró-inflamatório, parecem influenciar a função endotelial de maneira distinta entre ratos NG e HG, juntamente com as concentrações de EROS envolvidas. O NO sérico, por outro lado, não pareceu ter uma influência direta na função endotelial desses ratos durante o processo de cicatrização.

**Palavras-chave:** cicatrização de feridas; pele; disfunção endotelial; hiperglicemia; reatividade vascular.

## ABSTRACT

Wound healing is a dynamic and complex process that begins as soon as the discontinuation of intact skin occurs. It is divided in four stages, which are hemostasis, inflammatory phase, proliferation phase and remodeling. In the control of each phase are involved humoral mediators as grow factors, nitric oxide (NO), cytokines and reactive oxygen species (ROS). Several pathophysiologies such as inflammation and hyperglycemia can disturb the wound healing process. In this case, the endothelial function mediated by NO, ROS and cytokines seems to be an important therapeutic target. The aim of this study was to evaluate if the wound healing process is able to interfere in the endothelial function of normoglycemic (NG) and hyperglycemic (HG). To this a 10 mm diameter lesion was performed on the back of 79 Wistar rats treated (HG) or not (NG) with 150 mg/kg alloxan monohydrated, a drug that induces hyperglycemia through increase of ROS. The concentration-effect curves of acetylcholine was conducted to study vascular reactivity and the serical levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and NO of this animals were performed at Day -1 (animals without wound), Day 0 (day the injury was done – hemostasis phase), Day 4 (four days after the injury - inflammatory phase), Day 8 (eight days after surgery – proliferative phase) and Day 14 (fourteen days later surgery - remodeling phase). The results showed that the wound healing process can generate endothelial dysfunction (ED) in different phases to NG and HG rats, occurring in the hemostasis and inflammatory phases, respectively. Regarding the inflammatory profile, TNF- $\alpha$  and IL-6, the main mediators of the pro-inflammatory process in the wound healing, seem to be linked to the regulation of endothelial function in NG and HG rats in a different way. The concentration of ROS seems to be involved in this process, since serum NO concentrations did not directly influence the endothelial function of these rats during the wound healing process.

**Keywords:** wound healing; skin; endothelial dysfunction; hyperglycemia; vascular reactivity;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura anatômica da pele. ....	16
<b>Figura 2:</b> Passo a passo da cirurgia para elaboração de feridas.....	25
<b>Figura 3:</b> Passo a passo da curva de concentração efeito de acetilcolina. ....	27
<b>Figura 4:</b> Curva de concentração-efeito da acetilcolina em endotélio de ratos normoglicêmicos ao longo das fases da cicatrização de feridas.....	29
<b>Figura 5:</b> Curva de concentração-efeito da acetilcolina em endotélio de ratos hiperglicêmicos ao longo das fases da cicatrização de feridas.....	31
<b>Figura 6:</b> Comparação entre $pD_2$ e $E_{Max}$ de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. ....	32
<b>Figura 7:</b> Concentrações de óxido nítrico sérico de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. ....	33
<b>Figura 8:</b> Concentrações de citocinas séricas em ratos normoglicêmicos ao longo do processo de cicatrização de feridas.....	35
<b>Figura 9:</b> Concentrações de citocinas séricas em ratos hiperglicêmicos ao longo do processo de cicatrização de feridas.....	37
<b>Figura 10:</b> Comparação entre concentrações séricas de IL-6 de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. ....	38
<b>Figura 11:</b> Comparação entre concentrações séricas de TNF- $\alpha$ de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. ....	39
<b>Figura 12:</b> Comparação entre concentrações séricas de IL-10 em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**Ach** - Acetilcolina

**Ang II** - angiotensina II

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cálcio

**DM** – Diabetes Mellitus

**EDCF** - Fatores de contração do endotélio

**EDHF** - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EDRF** - Fatores de relaxamento derivado do endotélio

**eNOS** - NO sintase endotelial

**EROS** – Espécies reativas de oxigênio

**ET-1** - Endotelina-1

**FGF** - Fator de crescimento de fibroblasto

**GCs** - Guanilato ciclase solúvel (GCs)

**GHS** – Glutathiona reduzida

**HG** - Hiperglicêmico

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-10** – Interleucina 10

**iNOS** - NO sintase induzível

**KCl** - Cloreto de potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Fosfato monopotássico

**M1** - Macrófagos com fenótipo inflamatório

**M2** - Macrófagos com fenótipo antiinflamatório

**MgSO<sub>4</sub>** – Sulfato de magnésio

**mg/dL** - Miligrama por decilitro

**mg/kg** – Miligrama por quilograma

**mM** – Milimolar

**mm** - Milímetro

**mmHg** - Milímetro de mercúrio

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** - Trióxido de dinitrogênio

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato de sódio

**NG** – Normoglicêmico

**nNOS** - NO sintase neural

**NO** – Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – Nitrito

**NOS** - NO sintase

**ONOO<sup>-</sup>** - Peróxinitrito

**PGI<sub>2</sub>** – Prostaciclina

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**Pe** – Fenilefrina

**rpm** – Rotações por minuto

**SEM** - Erro padrão da média

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral alfa

**UV** – Ultra violeta

**VEGF** - Fator de crescimento endotelial

**°C** – Graus Celcius

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Radicail Superóxido

**μL** – Microlitro

**μmol/L** – Micromol por litro

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 A anatomia da pele e o processo de cicatrização de feridas.....	15
1.2 Função endotelial.....	18
1.3 A hiperglicemia e a disfunção endotelial.....	19
2. AÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO NA FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
<b>3.1 Animais e desenho experimental.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Indução da hiperglicemia.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Eutanásia e coleta de material biológico.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Reatividade vascular.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) sérico.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Análise de perfil inflamatório.....</b>	<b>27</b>
<b>3.8 Análise estatística.....</b>	<b>28</b>
4. RESULTADOS.....	28
<b>4.1 Efeito vasodilatador da acetilcolina nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Quantificação de NO sérico ao longo do processo de cicatrização.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Perfil inflamatório de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos ao longo do processo de cicatrização.....</b>	<b>33</b>
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## ***1. INTRODUÇÃO GERAL***

---

## 1.1 A anatomia da pele e o processo de cicatrização de feridas

A pele é considerada o maior órgão do corpo e apresenta função fisiológica complexa e de extrema importância para o organismo. Sua função primária consiste em proteção de órgãos internos e proteção contra luz ultra violeta (UV). Funciona também como uma barreira passiva contra microrganismos tendo papel fundamental na imunidade. Ademais, é o principal órgão envolvido na termorregulação do organismo devido a presença de glândulas anexas que à compõem (IRION, 2012).

Ela é formada por três camadas, sendo elas: a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

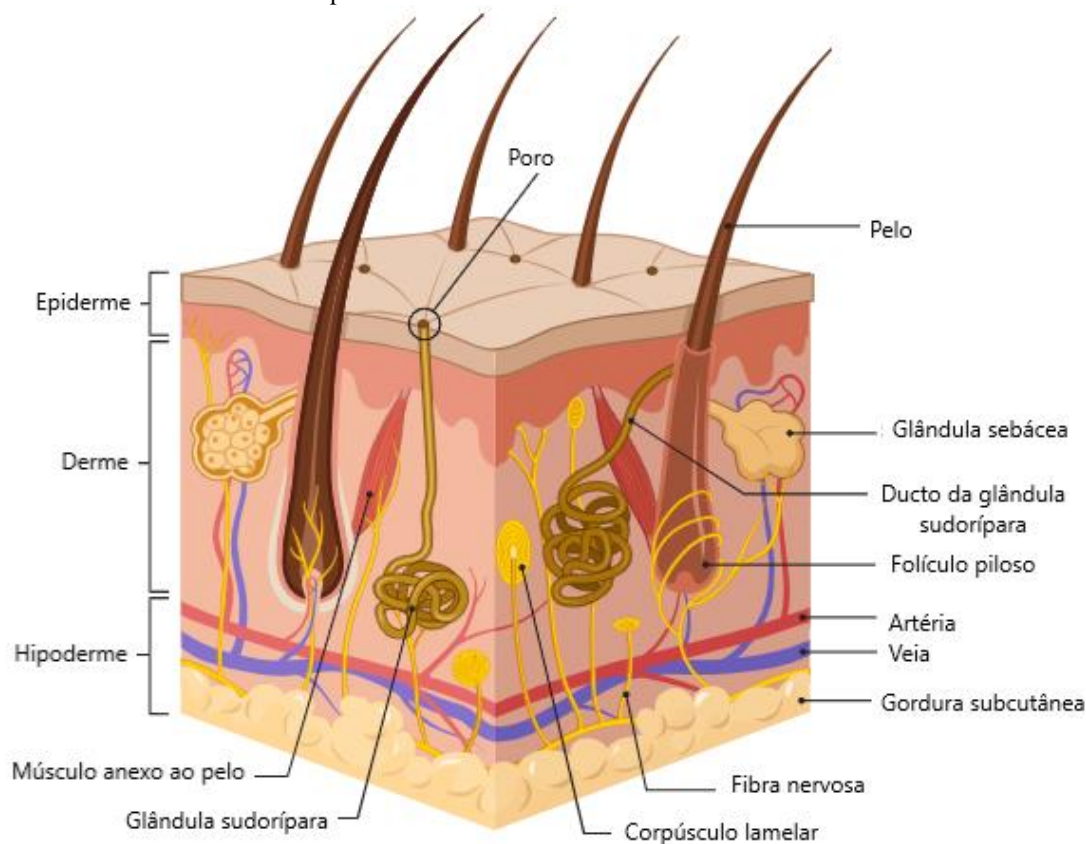
**Epiderme:** é a camada mais externa e é constituída por epitélio estratificado bem organizado composto por três tipos celulares (queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans), além de conter células receptoras de Merkel que estão ligadas diretamente ao sistema nervoso (IRION, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

**Derme:** dividida em duas camadas principais que apresentam diferenças funcionais importantes (camada papilar – presença de células e tecido conjuntivo frouxo, onde se encontram os vasos sanguíneos, glândulas anexas e pêlos e está localizada logo abaixo da epiderme; e, camada reticular – é mais espessa e acelular, apresenta fibras mais densas e organizadas que serão importantes para contração das feridas). As células presentes na derme consistem principalmente em fibroblastos, células endoteliais (compõem os vasos sanguíneos que estão presentes nessa região), fibras de colágeno e elásticas e substância fundamental que consiste em um gel de glicosaminoglinas e água (IRION, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

**Tecido adiposo subcutâneo (hipoderme):** camada de gordura localizada abaixo da derme. Sua função é promover o isolamento térmico e proteger de lesões por cisalhamento e compressão por estar presente entre a superfície de suporte (lâmina basal – junção da epiderme

e a derme) e as proeminências ósseas (IRION, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; ZIADLOU, *et al.*, 2024).

**Figura 1:** Estrutura anatômica da pele.



Fonte: Adaptado de Biorender.com

Quando ocorre uma perturbação da estrutura anatômica da pele gerando a descontinuidade desta, há também o rompimento de estruturas e a perda de função da pele, gerando o que é chamado de ferida (ISENBERG *et al.*, 2005; REINKE & SORG, 2012). O processo envolvido para que essas estruturas sejam reestabelecidas é chamado de processo de cicatrização de ferida ou regeneração de feridas e consiste em passos extremamente regulados que envolvem diversos tecidos, células e moléculas (REINKE & SORG, 2012; IRON, 2012).

A regeneração normal de feridas ocorre em quatro fases que se sobrepõem: A hemostase, inflamação, proliferação e remodelamento.

A hemostase consiste na reestabilização da homeostase da região da lesão após a ruptura de tecidos e vasos sanguíneos e o extravasamento de constituintes do sangue. Nessa fase ocorre

a ativação da agregação plaquetária por estímulo de fatores derivados do colágeno e de trombina formando o tampão de coagulação. Ao mesmo tempo os vasos que sofreram a injúria são estimulados a contrair para que impeça o extravasamento de sangue (REINKE & SORG, 2012). As plaquetas estimulam a produção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que por sua vez gera o estímulo para demais fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF).

Toda essa cascata de ativações promove o estímulo para a segunda fase denominada de fase inflamatória, na qual ocorre o recrutamento de células do sistema imune aumentando a permeabilidade dos vasos e a vasodilatação para que haja a remoção do material desvitalizado e retirada de fatores tóxicos às células. Nessa fase os mastócitos atuam liberando fatores que promovem a angiogênese para maior vascularização da região favorecendo o início da formação do tecido de granulação que é avermelhado, devido à presença de vasos sanguíneos, caracterizando a terceira fase denominada proliferativa (IRION, 2012).

Na fase proliferativa inicia-se a reepitelização por proliferação de fibroblastos, queratinócitos, angiogênese, deposição de tecido conjuntivo frouxo e a formação de uma matriz provisória de fibrina, fibronectina e colágeno tipo III.

Por fim, a última fase é denominada de remodelamento, na qual a matriz extracelular sofre modificações por deposição e degradação do colágeno conferindo maior força a região da lesão (IRION, 2012).

Quando a regeneração de feridas é anormal, como ocorre em um ambiente hiperglicêmico ou ainda disfuncional como é observado em diabéticos, hipertensos ou idosos, há o arraste do tempo de cicatrização, ou em pior dos casos, a não cicatrização da lesão, acarretando em diversos problemas para o portador da lesão. Para superar estas dificuldades na cicatrização, diversas áreas da saúde se unem em pesquisas para propor estratégias farmacológicas e não farmacológicas, a fim de acelerar o processo de regeneração tecidual.

## 1.2 Função endotelial

O endotélio vascular compreende uma monocamada de células poligonais achatadas (células endoteliais) que se organizam formando túbulos que são a interfase entre o sangue e o músculo liso. Estende-se continuamente formando a árvore vascular, cuja função primária é o transporte do sangue por todo o organismo (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; AIRES, 2012). O endotélio libera substâncias que coletivamente são denominadas de fatores de relaxamento derivado do endotélio (EDRF's), nas quais estão inclusos óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).

Além disto, as células endoteliais também são responsáveis por produzir e liberar os fatores de contração do endotélio (EDCF's) como a endotelina-1 (ET-1), prostaglandinas, angiotensina II (Ang II) e espécies reativas de oxigênio (EROS) (VANHOUTTE *et al.*, 2009; BERNATOVA, 2014). Quando há um desequilíbrio entre os fatores de relaxamento (EDRF's) e contração (EDCF's), ocorre a disfunção endotelial, que pode ser desencadeada por diversas patologias. Essa condição é caracterizada pelo excesso da liberação de fatores vasoconstritores pelas células endoteliais e/ou pela redução da capacidade dessas células em liberar fatores vasodilatadores (VANHOUTTE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2001; IGNARRO *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1997;).

Durante a cicatrização de feridas, o endotélio desempenha um papel fundamental ao regular os estímulos que promovem, de maneira específica, a homeostase. Isso inclui a contração dos vasos, o recrutamento de plaquetas e a formação do tampão de coagulação. O endotélio também é crucial na fase inflamatória, uma vez que essa resposta depende do estímulo gerado pelo tampão de coagulação. Além disso, na fase proliferativa, o endotélio facilita a angiogênese e o recrutamento de fibroblastos e queratinócitos para a área da lesão. (AITCHESON *et al.*, 2021; REINKE & SORG, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019).

### **1.3 A hiperglicemia e a disfunção endotelial**

Entre as patologias que promovem a disfunção endotelial está o diabetes mellitus (DM), sendo descrita como uma desordem metabólica de múltiplas causas, caracterizada pela hiperglicemia crônica juntamente com distúrbios do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas geradas pela falha na secreção e/ou na ação da insulina, o que caracteriza os diferentes tipos de DM, sendo elas diabetes do tipo 1 e tipo 2, respectivamente (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

O mecanismo no qual a hiperglicemia leva a disfunção endotelial consiste na promoção do aumento do estresse oxidativo, ativando a NO sintase induzível (iNOS) que está ligada a resposta imune. Apesar de as concentrações de NO estarem aumentadas, o NO ao se ligar com ânion superóxido ( $O_2^-$ ), promove a sua conversão em peróxido nitrito ( $ONOO^-$ ) gerando o bloqueio da NO sintase endotelial (eNOS) por desacoplamento, o que culminará em menores concentrações de NO e aumento da concentração de EROS (BECKMAN; CREAGER; LIBBY, 2002; KULLURU *et al.*, 2012; MITTAL *et al.*, 2014).

A disfunção endotelial na DM pode levar ao desenvolvimento de diversos distúrbios e entre eles se encontra a doença arterial periférica que juntamente com a neuropatia é uma das causas do aparecimento de feridas nos membros inferiores, os chamados pés diabéticos, que muitas vezes levam a amputações dos membros desses pacientes por dificuldades na cicatrização das lesões (ALBERTI; ZIMMET, 1998; BECKMAN; CREAGER; LIBBY, 2002; IRION, 2012).

## ***2. AÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO NA FUNÇÃO ENDOTELIAL***

---

## 1. INTRODUÇÃO

A formação de uma ferida consiste em um processo de perda de função e anatomia da pele devido a descontinuação desta. Assim que se dá a formação de uma ferida, o processo de cicatrização se inicia. Sendo, extremamente regulado e dinâmico, ele envolve vários tipos celulares, mediadores humorais e interações célula-célula e célula-matriz (ISENBERG *et al.*, 2005; REINKE; SORG, 2012). Esse processo é dividido em quatro fases que se sobrepõem. A primeira fase é denominada como hemostase e se inicia logo que a injúria ocorre. Diversos mediadores geram a ativação de plaquetas que formam o tampão de coagulação composto principalmente por fibrina. Este interrompe o extravasamento de sangue através da lesão, porém promove o aumento do fluxo sanguíneo para a região da ferida, sendo o estímulo para a segunda fase, denominada fase inflamatória (AITCHESON *et al.*, 2021; REINKE; SORG, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019). Nesta fase, neutrófilos e monócitos são recrutados pelo tampão de coagulação e o sistema imune adaptativo promove a ativação de fatores de crescimento que são sinalizadores para o aumento de citocinas e EROS que influenciarão a produção de NO no local da injúria e no plasma sanguíneo (BUI; WIESOLEK; SUMAGIN, 2020; CLARK, 2003; WITTE *et al.*, 2002). A terceira fase, fase proliferativa, é marcada pelo processo de angiogênese, deposição de colágeno, migração, proliferação e diferenciação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Por fim, a quarta e última fase é denominada de remodelamento e a secreção de colágeno tipo III e degradação de colágeno tipo I, são os principais eventos dessa fase, o que culminará na força de contração da ferida e mobilidade desta, com a formação da cicatriz (REINKE; SORG, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019).

O endotélio tem um papel extremamente importante no processo de cicatrização de feridas, sendo um dos principais moduladores deste ao produzir EROS, NO e diversos fatores de crescimento e citocinas que irão recrutar células para a região da lesão iniciando o processo de cicatrização e modulando este (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Muitas condições fisiopatológicas podem influenciar o processo de cicatrização normal de feridas como a hiperglicemia, hipertensão e a inflamação. Em todos esses casos, há uma disfunção endotelial na qual a produção de NO e EROS está desbalanceada e o correto desenvolvimento do processo de cicatrização é afetado gerando feridas que não cicatrizam por longos períodos de tempo (LAING *et al.*, 2007; STALLMEYER *et al.*, 2002; WITTE *et al.*, 2002).

Esse trabalho faz parte de um estudo translacional no qual o objetivo foi avaliar os efeitos sistêmicos de uma ferida de segunda intenção e o processo de cicatrização em uma condição de cicatrização normal de feridas (ratos em condições saudáveis quanto ao índice glicêmico) e cicatrização anormal de feridas (ratos em condições de hiperglicemia induzida por Aloxano) (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2018; LENZEN, 2008; TAKASU *et al.*, 1991). Nesta tese é apresentada uma parte dos resultados do que diz respeito a função endotelial sistêmica dos ratos analisados, porém foram realizadas também análises macroscópicas e microscópicas por histologia do tempo e qualidade de cicatrização das feridas, além de testar possibilidades de tratamento com base nos resultados aqui encontrados (dados ainda não publicados).

## **2. OBJETIVOS**

- I. Avaliar se uma ferida de segunda intenção promove efeitos na função endotelial sistêmica de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos;
- II. Identificar e diferenciar as fases do processo de cicatrização de feridas na função endotelial sistêmica em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e desenho experimental

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) na Universidade Federal de São Carlos pelo número de registro: 4183101219. Setenta e seis ratos Wistar com 250 g a 300 g foram divididos em grupos (Tabela 1) de acordo com as seguintes denominações:

a. Níveis séricos de glicose – antes da indução da hiperglicemia (Dia -4), ratos normoglicêmicos (NG), ratos hiperglicêmicos (HG);

b. Estágios da cicatrização de feridas – sem ferida (Dia -1), ferida na fase de hemostase (Dia 0), ferida na fase inflamatória (Dia 4), ferida na fase proliferativa (Dia 8), e ferida na fase de remodelamento (Dia 14);

**Tabela 1: Divisão de grupos experimentais.** N amostral de ratos utilizados para cada grupo experimental utilizado no presente trabalho.

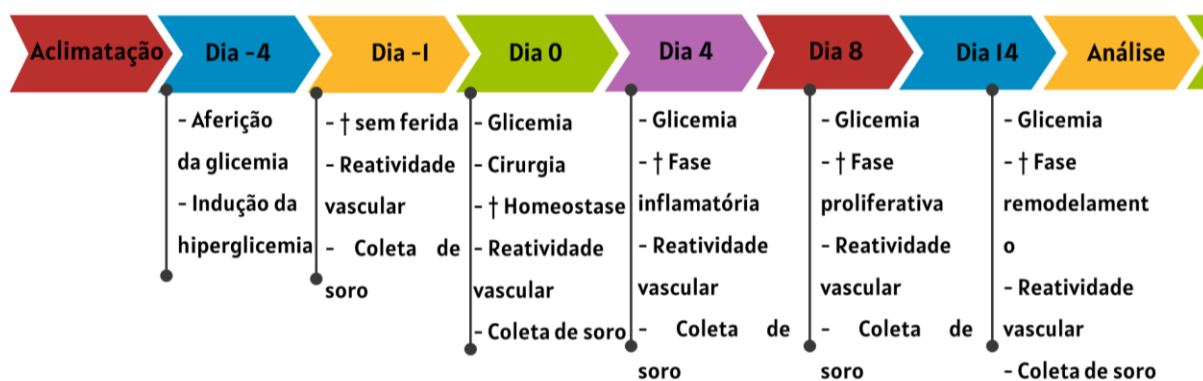
	Normoglicêmicos (NG)	Hiperglicêmicos (HG)
Dia -4	74	2*
Dia -1	7	11
Dia 0	5	9
Dia 4	7	6
Dia 8	8	6
Dia 14	7	6

\*analisados apenas na dosagem de citocinas.

Fonte: Elaboração própria

Todos os procedimentos descritos nesse trabalho foram conduzidos após pelo menos uma semana de aclimação. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciência Fisiológicas (DCF - UFSCar) (Responsável: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck) com temperatura e luminosidade controladas, ciclo claro-escuro de 10h/14h e água e comida *ad libitum* até o dia do experimento.

As fases do desenho experimental são apresentadas no fluxograma abaixo:



Fonte: Elaboração própria

### 3.2 Indução da hiperglicemia

Foi utilizado o fármaco diabetogênico Aloxano monoidratado (Sigma-Aldrich A7413-10G) para induzir a hiperglicemia nos ratos Wistar utilizados nesse estudo (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2018; LENZEN, 2008). O mecanismo de ação do Aloxano consiste na necrose das células beta pancreáticas resultando num estado inicialmente transiente de hipoglicemia minutos após a indução, seguido por uma fase hiperglicêmica que dura 2-4 h e uma terceira fase hipoglicêmica que ocorre comumente 4-8 h após a injeção que pode gerar convulsões levando esses animais a morte (LENZEN, 2008).

A indução foi feita por via intraperitoneal com uma dose de 150 mg/kg de Aloxano monohidratado 98% em solução salina 0,9%. Para evitar a morte desses animais, após seis horas da indução foi oferecido por 24 h água com 5 % de glicose *ad libitum* (ASIF *et al.*, 2019).

Os níveis de glicose séricos foram mensurados utilizando o glicosímetro Accu-Check® Active (Roche) para todos os animais antes da indução da hiperglicemia (Dia -4) e, após isso, a mensuração foi feita seguindo as fases do processo de cicatrização de feridas: Dia 0, Dia 4, Dia 8 e Dia 14. Os animais foram considerados hiperglicêmicos quando os níveis séricos de glicose eram  $\geq 250$  mg/dL.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados e anestesiados com Cetamina (75 mg/kg – Cetamin® Syntec) e Xilazina (5 mg/kg – Xilazin® Syntec) e colocados em decúbito dorsal para tricotomia digital da região dorsal. Após isso, foi feita uma ferida retirando as três camadas cutâneas utilizando um *punch* de 10 mm de diâmetro e bisturi. Após a cirurgia (Dia 0), os ratos foram mantidos em caixas individuais (Figura 2).

**Figura 2: Passo a passo da cirurgia para elaboração de feridas.** Os ratos foram inicialmente anestesiados com Xilazina e Cetamina e tão logo não apresentassem resposta a estímulos de dor foi realizada a tricotomia digital dos pelos localizados no dorso do animal (2A). Logo após, com auxílio de um *punch* e um bisturi (2B) foi elaborada a lesão e apresentando cerca de 1 cm de diâmetro (2C).



Fonte: Elaboração própria

### 3.4 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados por decapitação nos dias escolhidos que representavam as fases do processo de cicatrização de feridas: Dia -1, Dia 0, Dia 4, Dia 8 e Dia 14. O anel aórtico torácico foi removido, isolado e cortado em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento e mantidos em solução de Krebs para o experimento de reatividade vascular. O sangue foi coletado em tubos de ensaio de 50 mL e centrifugados em 10 000 rpm por dez minutos para isolar o soro. Este foi estocado em freezer -80 °C até que o experimento de citocinas fosse conduzido.

### 3.5 Reatividade vascular

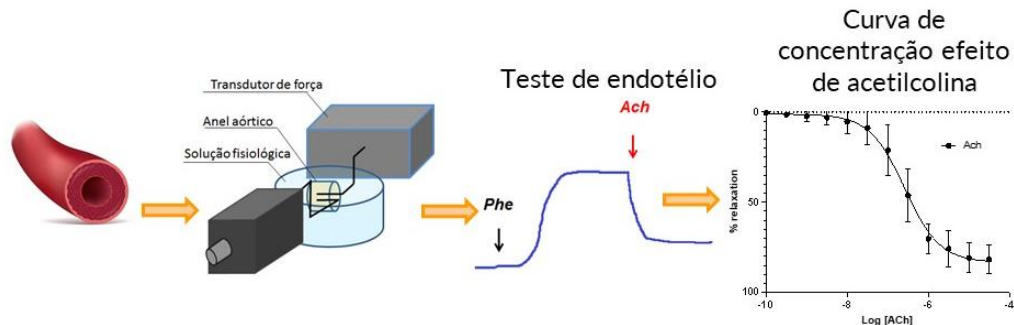
Os anéis aórticos dissecados após a eutanásia foram colocados em um banho de órgãos contendo 5 mL de solução de Krebs (mM: NaCl 130, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,2,

NaHCO<sub>3</sub> 14,9, Glicose 5,5 e CaCl<sub>2</sub> 1,6) a 37 °C, pH 7,4, constantemente borbulhado com 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> em miógrafo isométrico (Mulvany-Halpern-model 610 DMT-USA, Marietta, GA) e os dados foram registrados pelo programa PowerLab8/SP (ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, CO).

Primeiramente, os anéis aórticos foram estabilizados por trinta minutos ao serem submetidos a uma tensão de 1,5 g em banho de órgãos. Logo após, a integridade do vaso foi testada promovendo uma contração inicial utilizando a EC<sub>50</sub> da fenilefrina (Phe) (0,1 µmol/L), seguido do relaxamento induzido por 1 µmol/L de acetilcolina (Ach). Os anéis aórticos dos ratos normoglicêmicos foram descartados quando o relaxamento foi menor do que 80% e para anéis aórticos de ratos hiperglicêmicos o critério de corte assumido foi de 60% de relaxamento, utilizando como base o padronizado para ratos com disfunção endotelial ocasionada por hipertensão (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os anéis aórticos intactos foram então submetidos a uma segunda contração com 0,1 µmol/L de Phe e após atingir a estabilização do vaso em contração, foi conduzida uma curva de concentração-efeito de Ach utilizando as concentrações de 0,1 nmol/L até 0,1 mmol/L (Figura 3). A potência (pD<sub>2</sub>) e o efeito de relaxamento máximo (E<sub>Max</sub>) foram calculados.

**Figura 3: Passo a passo da curva de concentração efeito de acetilcolina.** Primeiramente a aorta torácica foi dissecada e cortada em anéis aórticos com cerca de 5 mm cada. Esses anéis então foram dispostos em dois ganchos no qual um deles estava associado a um transdutor de sinais e disposto em banho de órgão contendo solução de Krebs a 37°C e borbulhado com uma composição de oxigênio e gás carbônico. Após um período de estabilização foi realizado o teste de endotélio e os vasos viáveis foram submetidos a curva de concentração efeito para acetilcolina (Ach).



Fonte: Elaboração própria

### 3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) sérico

A dosagem de NO sérico foi conduzida a partir do sangue coletado imediatamente após a eutanásia dos ratos. Foram coletados cerca de 5 mL de sangue com o auxílio de tubo Falcon de 50 mL. Este foi protegido da luz e alocado em gelo até ser levado para centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. Deste montante foram extraídos cerca de 1 mL de soro que foi armazenado em tubos âmbar de 1,5 mL em freezer -80°C. Para a análise, as amostras foram descongeladas e um volume de 50 µL de soro de cada amostra foi disposto em microtubos âmbar de 0,5 mL e desproteinizados com o mesmo volume de etanol a 95% (4 °C) durante 30 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para medir indiretamente os níveis séricos de NO, pela concentração sérica de nitrato. A técnica de quimioluminescência NO/ozônio foi realizada conforme descrito anteriormente por Archer e colaboradores (1993), utilizando o analisador de óxido nítrico Sievers 280i (Sievers NOA 280i; Sievers, Boulder, CO).

### 3.7 Análise de perfil inflamatório

Foi realizada a análise da concentração de citocinas séricas visando avaliar o perfil inflamatório dos ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos nas diversas fases do processo de cicatrização de feridas. As concentrações das citocinas Interleucina-6 (IL-6), Fator de necrose

tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina-10 (IL-10) foram avaliadas através do método ELISA seguindo as especificações da BD Biosciences Pharmingen® (San Diego, CA, United States) kits (IL-6: Cat. No. 550319; TNF-  $\alpha$ : Cat. No. 558535; IL-10: Cat. No. 555134). As concentrações das amostras foram calculadas com base na curva padrão de concentração de cada citocina e expressa em pg/mL.

### **3.8 Análise estatística**

As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.1). Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os testes de normalidade foram conduzidos em sua maioria utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre grupos foi utilizado teste-t para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Análises de comparação entre grupos com dados paramétricos foram conduzidas utilizando ANOVA One-way com pós-teste de Tukey's e para dados não-paramétricos foi realizado o teste Kruskal-Wallis pós-teste de Dunn's. O nível de significância estatística adotado foi de 5 %.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Efeito vasodilatador da acetilcolina nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas**

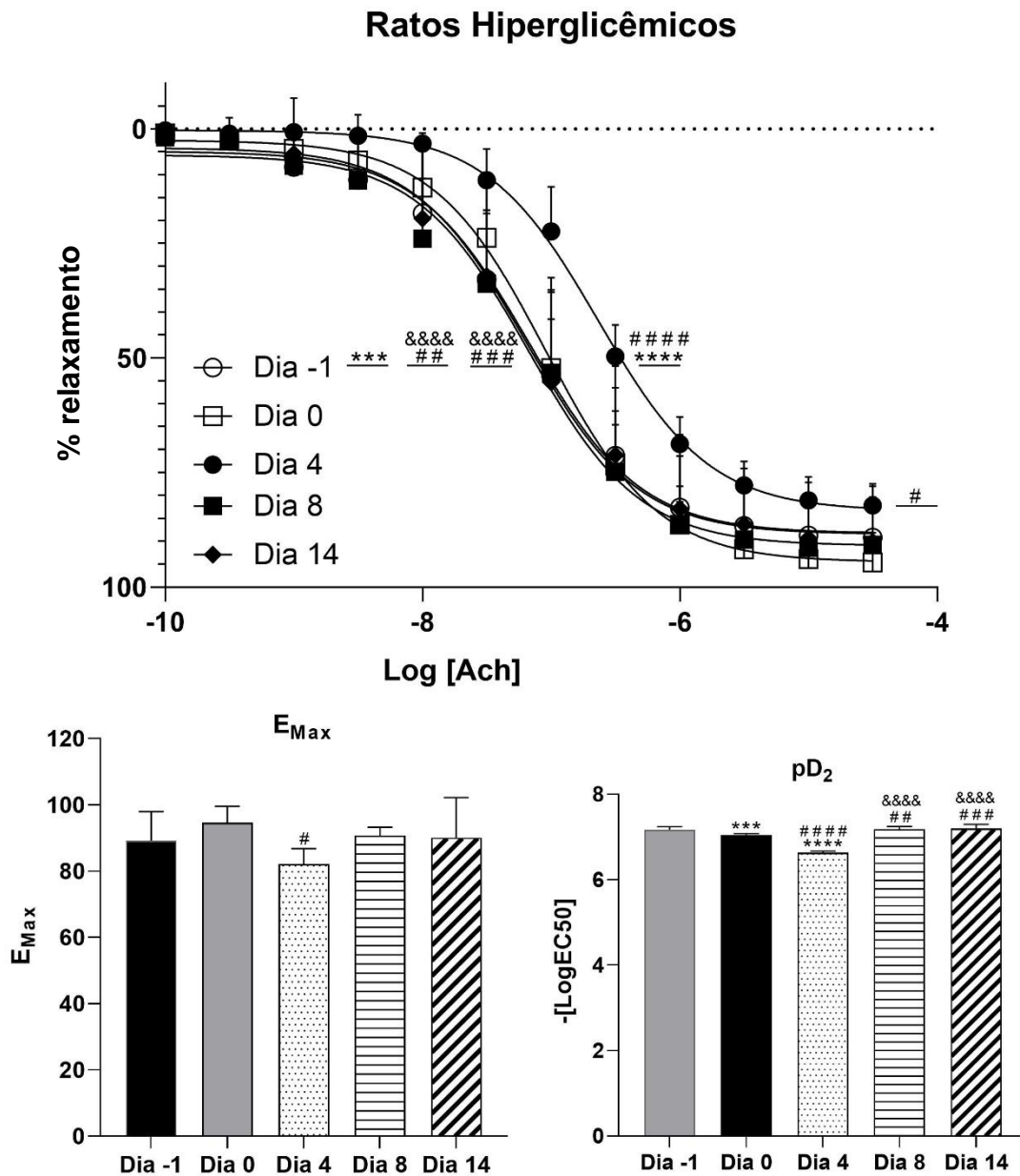
Ao avaliar a curva de concentração-efeito para acetilcolina ao longo do processo de cicatrização de ratos normoglicêmicos, foi identificado um deslocamento da curva para a direita, indicando uma piora da resposta ao estímulo de relaxamento por acetilcolina nos vasos na fase de hemostase (Dia 0) (Figura 4A). Após essa fase, a capacidade de relaxamento dos anéis aórticos foi reestabelecida ao ponto observado nos animais sem ferida (Dia -1) ( $pD_2$  Dia -1:  $6,96 \pm 0,03$ ,  $n = 7$ ,  $p < 0,0001$ ; Dia 0:  $6,58 \pm 0,07$ ,  $n = 5$ ; Dia 4:  $6,93 \pm 0,07$ ,  $n = 7$ ,  $p <$



7; Dia 0:  $81,68 \pm 8,00\%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ; Dia 4:  $83,23 \pm 9,98\%$ ,  $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ; Dia 8:  $91,29 \pm 3,62\%$ ,  $n = 8$ ; Dia 14:  $94,97 \pm 2,30\%$ ,  $n = 7$ ).

Em ratos hiperglicêmicos, a dinâmica de resposta vascular ao relaxamento por acetilcolina foi diferente da resposta observada por ratos hiperglicêmicos. A curva de relaxamento dos vasos na fase inflamatória (Dia 4) mostrou um deslocamento para a direita, indicando piora da resposta ao relaxamento por acetilcolina, voltando aos valores observados em ratos sem ferida na fase proliferativa (Dia 8) ( $pD_2$  Dia -1:  $7,17 \pm 0,06$ ,  $n = 11$ ; Dia 0:  $7,03 \pm 0,04$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ; Dia 4:  $6,63 \pm 0,03$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0,0001$ ; Dia 8:  $7,17 \pm 0,06$ ,  $n = 6$ ; Dia 14:  $7,19 \pm 0,09$ ,  $n = 6$ ) (Figura 5A e 5C). Por outro lado, em  $E_{Max}$ , nenhuma diferença foi observada entre as fases do processo de cicatrização para anéis aórticos de ratos hiperglicêmicos. Embora, uma tendência de piora na fase inflamatória (Dia 4) e na fase de remodelamento (Dia 14) possa ser identificada (Figura 5B) ( $E_{Max}$  Dia -1:  $89,17 \pm 8,78\%$ ,  $n = 11$ ; Dia 0:  $94,60 \pm 4,95\%$ ,  $n = 9$ ; Dia 4:  $82,13 \pm 4,64$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ; Dia 8:  $90,73 \pm 2,53\%$ ,  $n = 6$ ; Dia 14:  $90,09 \pm 12,06$ ,  $n = 6$ ).

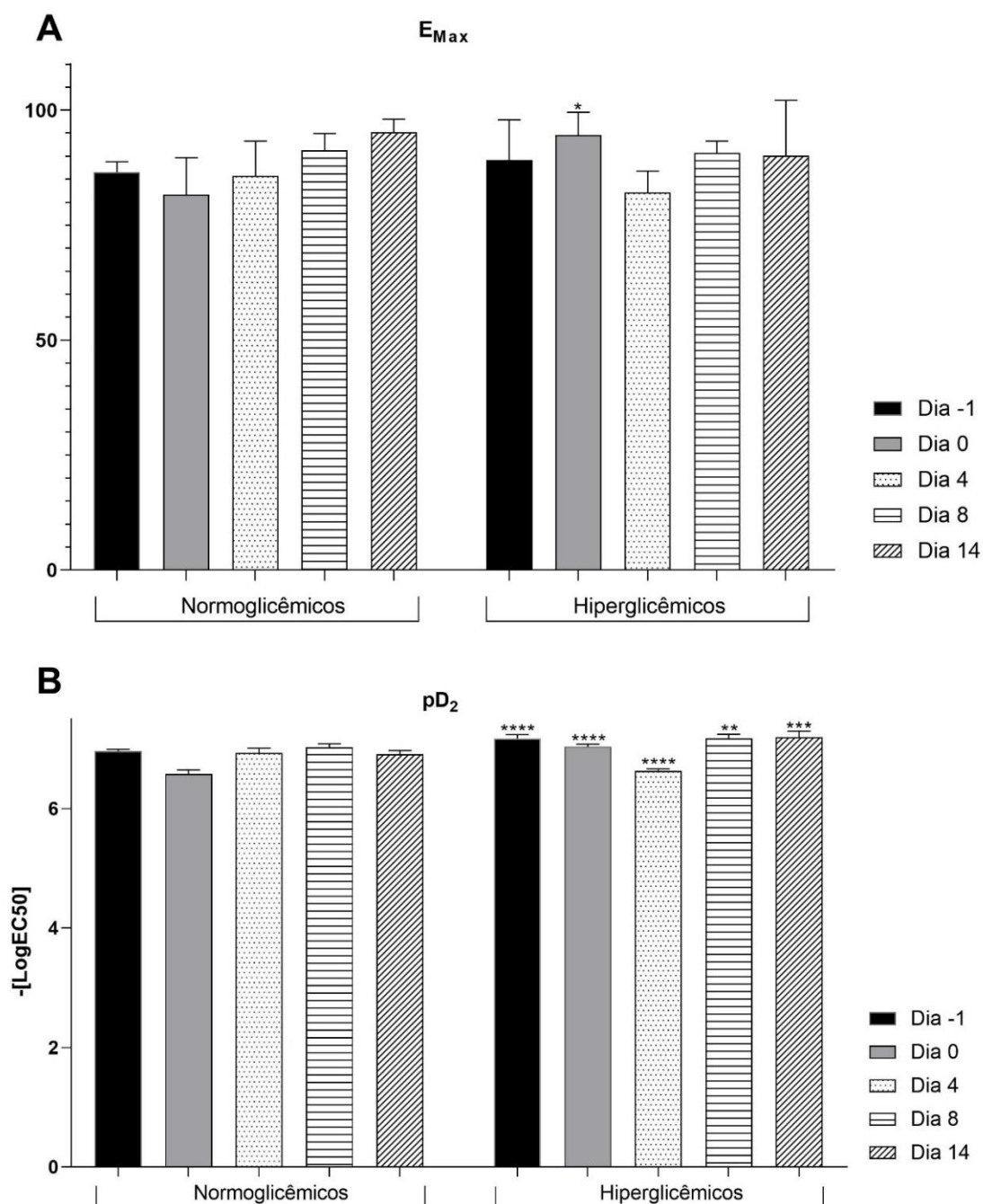
**Figura 5: Curva de concentração-efeito da acetilcolina em endotélio de ratos hiperglicêmicos ao longo das fases da cicatrização de feridas.** Dia -1 indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento. Os valores indicam a média  $\pm$  SEM e os experimentos foram executados com a preparação de diferentes animais. **A.** Curvas de concentração-efeito realizadas após contração máxima com  $EC_{50}$  da Fenilefrina. **B.** Valores máximos de efeito de relaxamento ( $E_{Max}$ ). **C.** Valores de concentração máxima para gerar 50% de efeito máximo ( $pD_2$ ). \* indica diferença em relação ao Dia -1; # indica diferença em relação ao Dia 0; & indica diferença em relação ao Dia 4.



Ao comparar a resposta ao relaxamento induzido por acetilcolina em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos ao longo do processo de cicatrização, é possível observar diferença no  $pD_2$  na fase de hemostase (Dia 0) e na fase inflamatória (Dia 4) ( $pD_2$  de ratos normoglicêmicos Dia -1:  $6,96 \pm 0,03$ ,  $n = 7$ ; Dia 0:  $6,58 \pm 0,07$ ,  $n = 5$ ; Dia 4:  $6,93 \pm 0,07$ ,  $n =$

7; Dia 8:  $7,03 \pm 0,06$ ,  $n = 8$ ; Dia 14:  $6,91 \pm 0,065$ ,  $n = 7$ ;  $pD_2$  de ratos hiperglicêmicos Dia -1:  $7,17 \pm 0,06$ ,  $n = 11$ ; Dia 0:  $7,03 \pm 0,04$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0,0001$ ; Dia 4:  $6,63 \pm 0,03$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,0001$ ; Dia 8:  $7,17 \pm 0,06$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,0001$ ; Dia 14:  $7,19 \pm 0,09$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 6B).

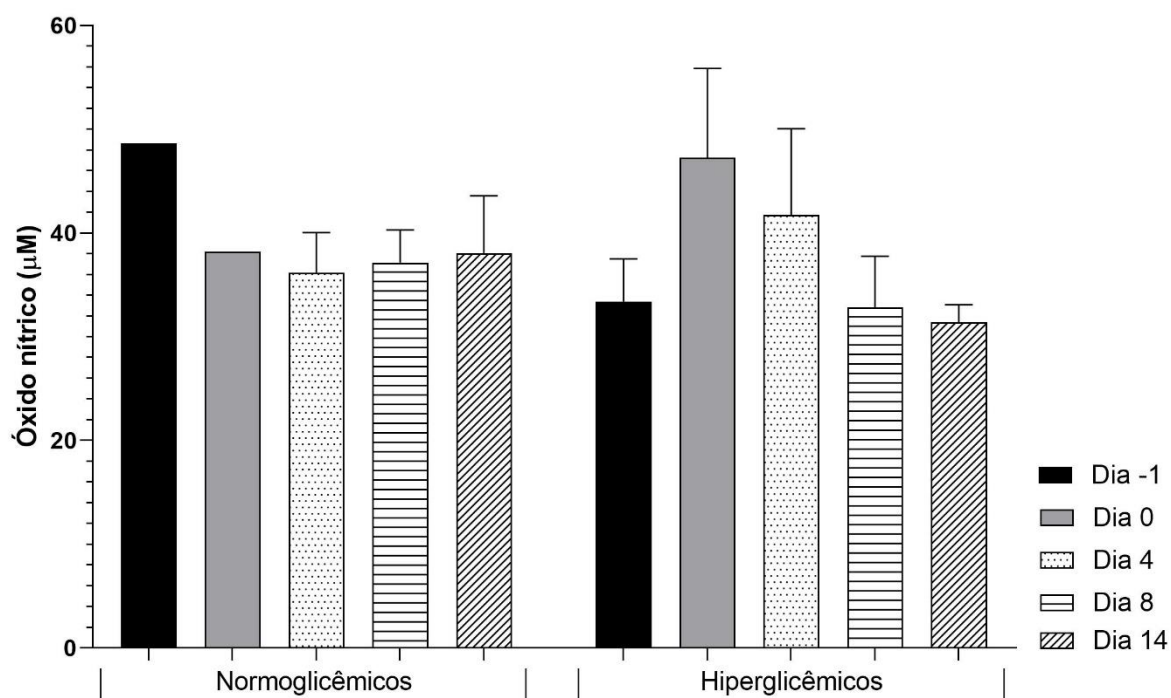
**Figura 6: Comparação entre  $pD_2$  e  $E_{Max}$  de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.** Dia -1 indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento. Os valores indicam a média  $\pm$  SEM e os experimentos foram executados com a preparação de diferentes animais. **A.** Valores de efeito máximo de relaxamento ( $E_{Max}$ ) obtidos; **B.** Valores de concentração máxima necessária para gerar 50% do efeito máximo; \* indica a diferença entre ratos normoglicêmicos.



## 4.2 Quantificação de NO sérico ao longo do processo de cicatrização

Ao longo do processo de cicatrização, não foi possível observar diferenças entre as concentrações de metabólitos de NO para ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos isoladamente. Porém ao comparar os níveis séricos de metabólitos de NO de ratos normoglicêmicos com ratos hiperglicêmicos, é possível identificar que o NO se comporta diferente em cada uma das condições. No entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 7).

**Figura 7: Concentrações de óxido nítrico sérico de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.** Valores das concentrações séricas de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) obtidos pelo método indireto de detecção sérica nitrito através da técnica de quimioluminescência NO/ozônio. As análises foram realizadas para os animais em diferentes fases do processo de cicatrização de feridas, sendo eles Dia -1 que indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento. Os valores indicam a média  $\pm$  SEM.

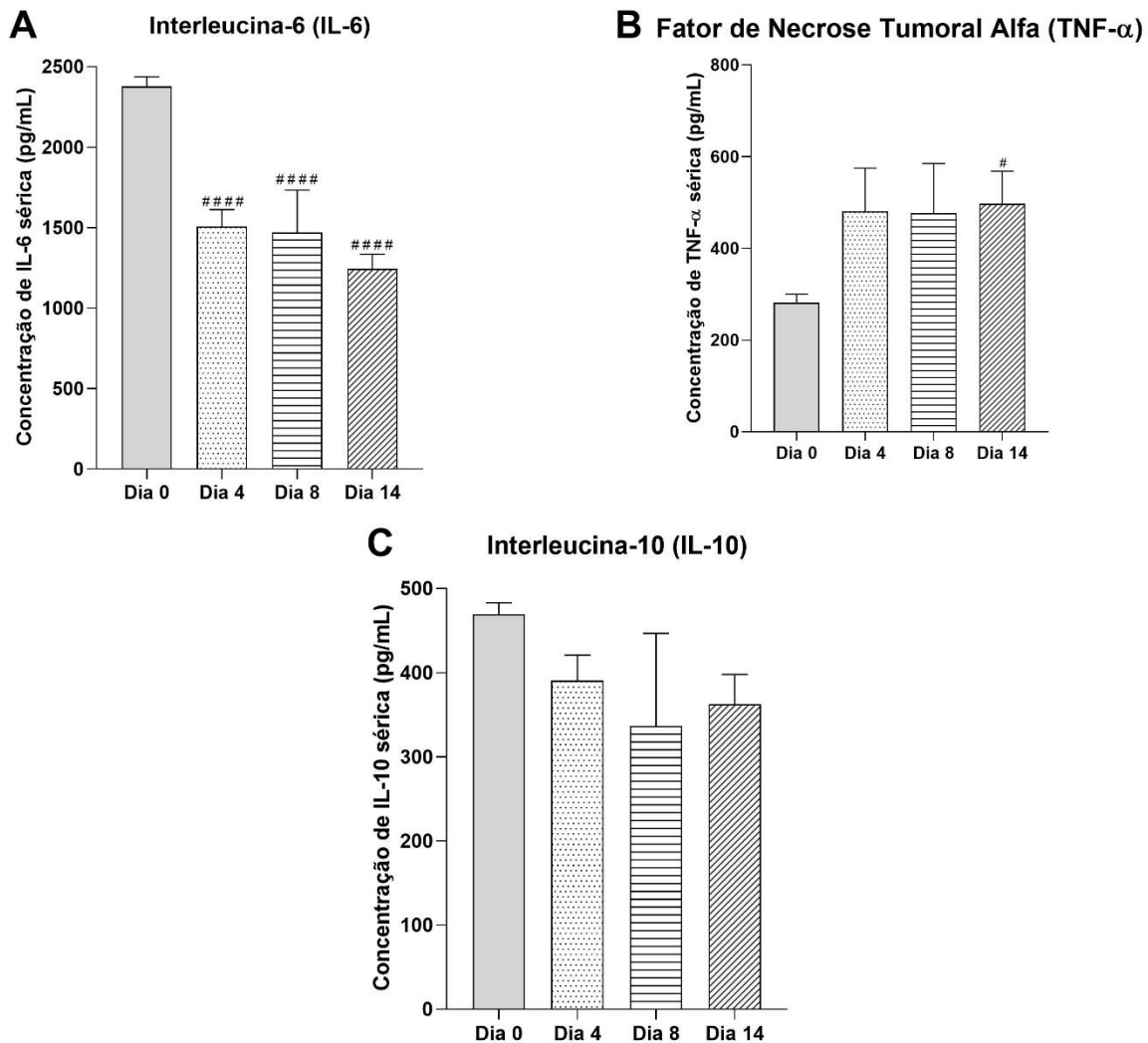


## 4.3 Perfil inflamatório de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos ao longo do processo de cicatrização

Ao analisarmos as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  foi possível observar diferenças em relação aos ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Em ratos

normoglicêmicos, a IL-6 estava aumentada na fase de hemostase do processo de cicatrização (Dia 0). Na fase que se prossegue, fase inflamatória (Dia 4), ocorre um declínio nas concentrações de IL-6 sérica, o que permanece até a última fase do processo de cicatrização, fase de remodelamento (Dia 14) (Figura 8A) (IL-6 sérica Dia 0:  $2377,28 \pm 59,86$  pg/mL, n = 2; Dia 4:  $1507,76 \pm 104,42$  pg/mL, n = 6, p < 0,0001; Dia 8:  $1469,59 \pm 264,07$ , n = 6, p < 0,0001; Dia 14:  $1243,56 \pm 91,99$ , n = 6, p < 0,0001). Já para a citocina TNF- $\alpha$  de ratos normoglicêmicos, apenas os ratos que se encontravam na fase de remodelamento (Dia 14) apresentaram aumento significativo da concentração sérica de TNF- $\alpha$  em relação aos ratos no dia da elaboração da lesão (Dia 0) (TNF- $\alpha$  sérica Dia 0:  $281,61 \pm 18,44$  pg/mL, n = 2; Dia 14:  $496,88 \pm 71,75$  pg/mL, n = 6, p < 0,05) (Figura 8B). Em relação a citocina IL-10, não foi observada diferença significativa na concentração sérica desta em relação as fases do processo de cicatrização de ratos normoglicêmicos (Figura 8C).

**Figura 8: Concentrações de citocinas séricas em ratos normoglicêmicos ao longo do processo de cicatrização de feridas.** Valores da média  $\pm$  SEM da concentração das citocinas séricas de preparações de diferentes animais ao longo do processo de cicatrização de feridas. Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento. **A.** Valores de concentração sérica da citocina pró-inflamatória Interleucina-6 (IL-6); **B.** Valores de concentração sérica da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ); **C.** Valores de concentração sérica da citocina imunomodulatória Interleucina-10 (IL-10); # indica diferença estatística em relação ao Dia 0.

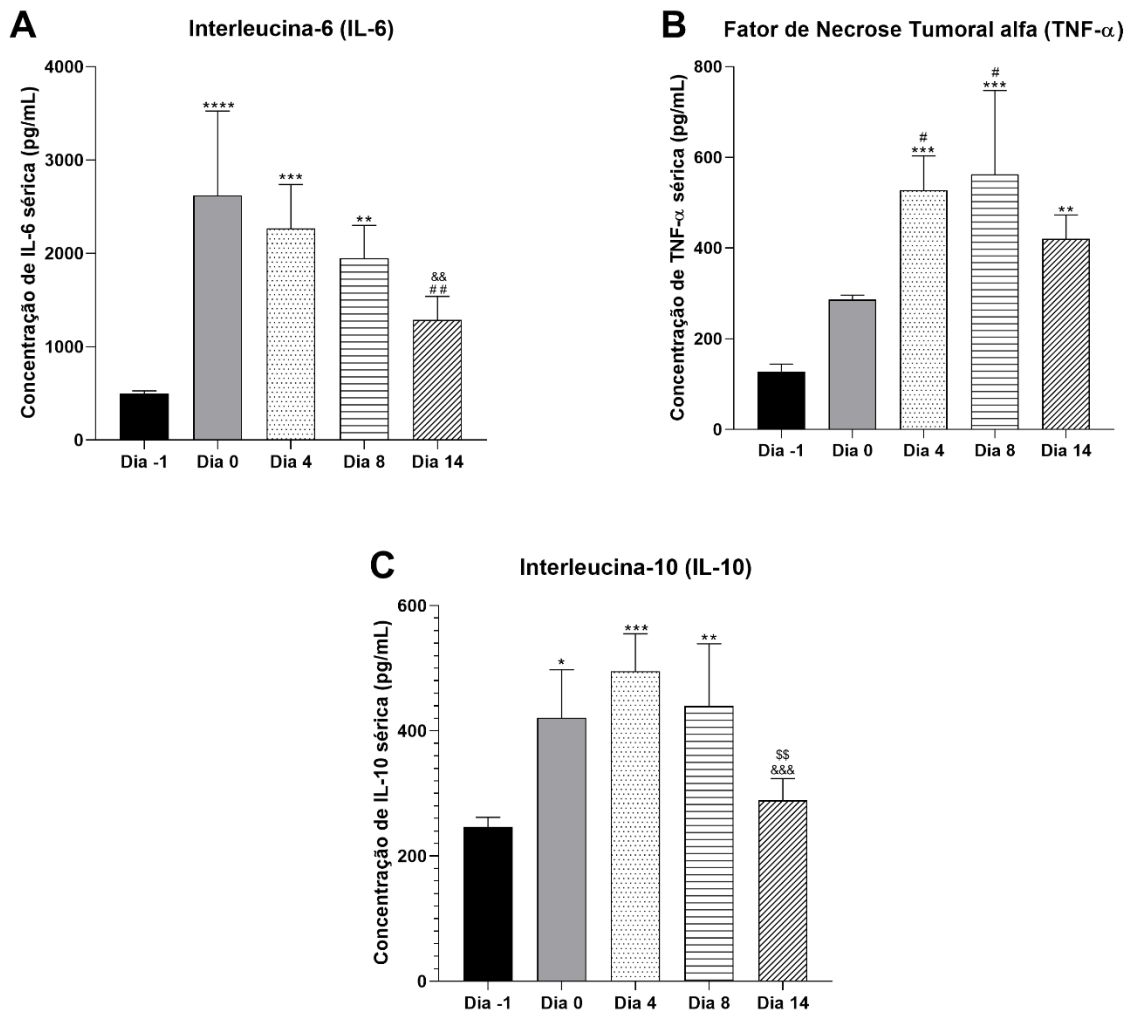


Em ratos hiperglicêmicos, os níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  se comportaram diferentes dos níveis observados para ratos normoglicêmicos ao longo do processo de cicatrização (Figuras 8A, 8B, 9A e 9B). A concentração de IL-6 sérica também apresentou-se alta na fase de hemostase (Dia 0) em ratos hiperglicêmicos, mas tão logo o processo de cicatrização progredia, a concentração gradualmente diminuía chegando a retomar os padrões para ratos

hiperglicêmicos sem feridas (Dia -1) (IL-6 sérica Dia -1:  $495,21 \pm 33,56$  pg/mL, n=3; Dia 0:  $2623,03 \pm 902,65$  pg/mL, n = 3,  $p < 0,0001$ ; Dia 4:  $2269,66 \pm 468,54$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,001$ ; Dia 8:  $1948,19 \pm 351,89$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,01$ ; Dia 14:  $1289,21 \pm 250,22$  pg/mL, n = 6) (Figura 9A). Em relação ao TNF- $\alpha$ , a concentração sérica de ratos no dia da elaboração da lesão (Dia 0) foi estatisticamente igual a de ratos hiperglicêmicos sem ferida (Dia -1), aumentando a partir da fase inflamatória (Dia 4). Após isso, os níveis TNF- $\alpha$  foram gradualmente decaindo, porém não chegou a reestabelecer os padrões observados para ratos hiperglicêmicos sem ferida (Dia -1) (Figura 9B) (TNF- $\alpha$  sérico Dia -1:  $127,69 \pm 16,42$  pg/mL, n = 3; Dia 0:  $285,78 \pm 10,06$  pg /mL, n = 3; Dia 4:  $527,45 \pm 75,89$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,001$ ; Dia 8:  $562,33 \pm 184,94$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,001$ ; Dia 14:  $420,59 \pm 52,25$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,01$ ).

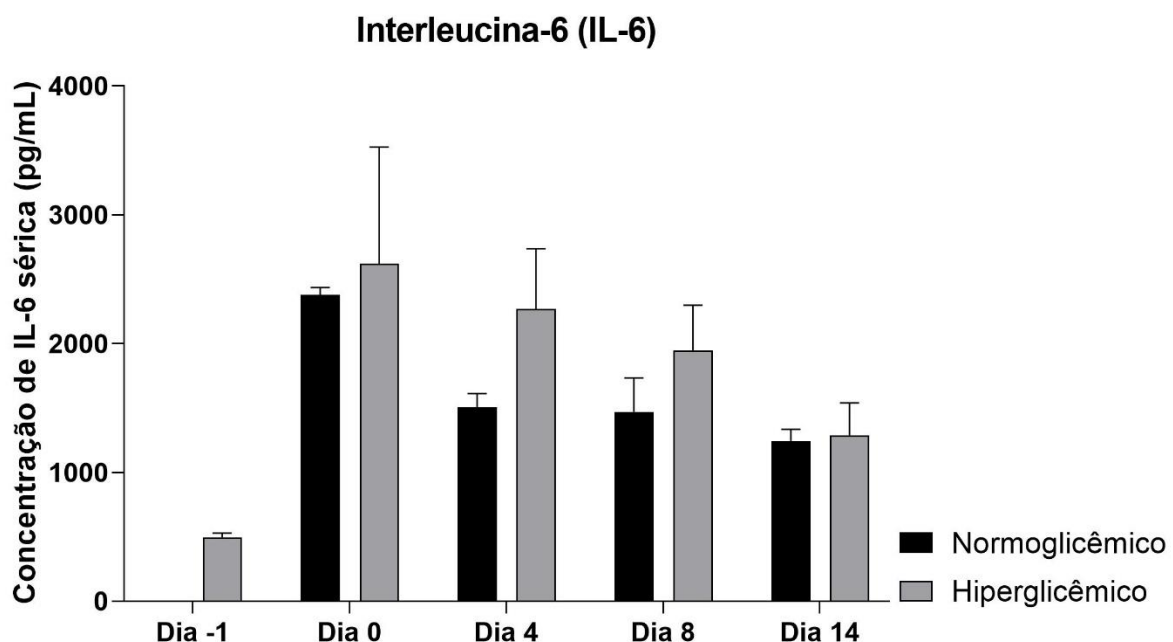
Em relação a citocina IL-10 o padrão observado para ratos hiperglicêmicos foi semelhante ao observado para a TNF-  $\alpha$ , tendo um aumento na concentração na fase de hemostase (Dia 0), um pico na fase inflamatória (Dia 4) e decaindo ao longo do processo de cicatrização, porém reestabelecendo os padrões de ratos hiperglicêmicos sem feridas (Dia -1) (Figura 9C) (IL-10 sérico Dia -1:  $246,920 \pm 14,966$ pg/mL, n = 3; Dia 0:  $420,98 \pm 76,63$  pg /mL, n = 3,  $p < 0,05$ ; Dia 4:  $495,05 \pm 59,81$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,001$ ; Dia 8:  $439,36 \pm 99,64$  pg/mL, n = 6,  $p < 0,01$ ; Dia 14:  $289,00 \pm 34,81$  pg/mL, n = 6).

**Figura 9: Concentrações de citocinas séricas em ratos hiperglicêmicos ao longo do processo de cicatrização de feridas.** Valores da média  $\pm$  SEM da concentração das citocinas séricas de preparações de diferentes animais ao longo do processo de cicatrização de feridas. Dia -1 que indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento. **A.** Valores de concentração sérica da citocina pró-inflamatória Interleucina-6 (IL-6); **B.** Valores de concentração sérica da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ); **C.** Valores de concentração sérica da citocina imunomodulatória Interleucina-10 (IL-10); \* indica diferença estatística em relação ao Dia -1; # indica diferença significativa em relação ao Dia 0; & indica diferença significativa em relação ao Dia 4; \$ indica diferença significativa em relação ao Dia 8.

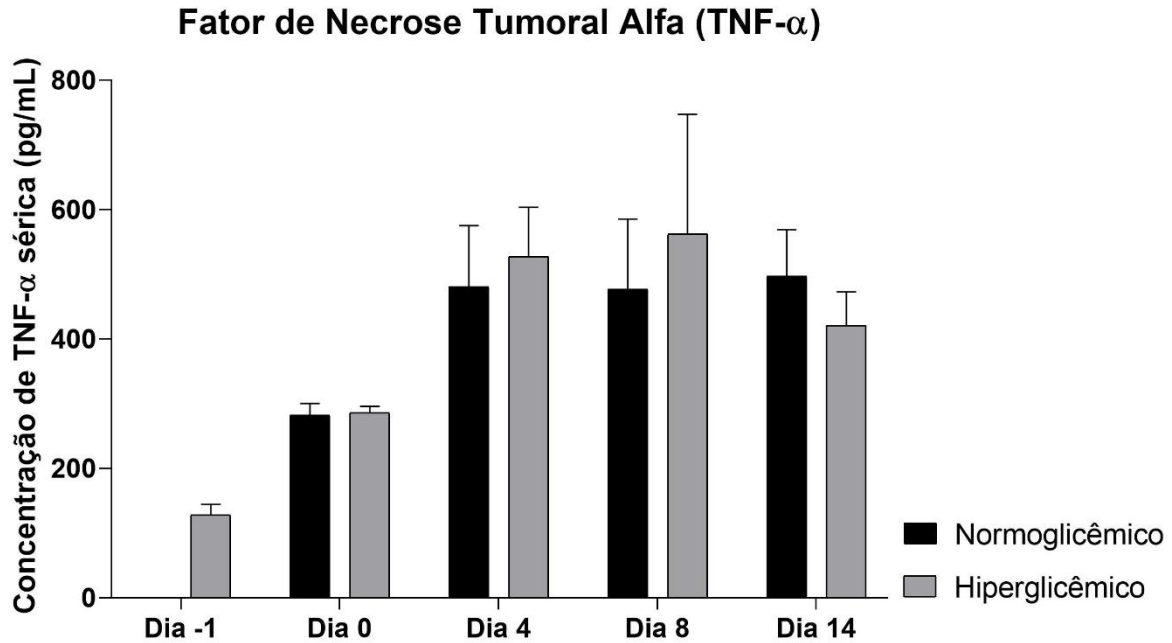


Quando comparamos a citocina IL-6 de ratos normoglicêmicos (NG) e hiperglicêmicos (HG), não é possível observar diferença estatística, porém há uma tendência aos ratos hiperglicêmicos apresentarem níveis maiores de IL-6 (IL-6 sérica HG Dia -1:  $495,218 \pm 33,569$  pg/mL, n=3; Dia 0:  $2623,03 \pm 902,65$  pg/mL, n = 3; Dia 4:  $2269,66 \pm 468,54$  pg/mL, n = 6; Dia 8:  $1948,19 \pm 351,89$  pg/mL, n = 6; Dia 14:  $1289,21 \pm 250,22$  pg/mL, n = 6) do que ratos normoglicêmicos (IL-6 sérica NG Dia 0:  $2377,28 \pm 59,86$  pg/mL, n = 2; Dia 4:  $1507,76 \pm 104,42$  pg/mL, n = 6; Dia 8:  $1469,59 \pm 264,07$ , n = 6; Dia 14:  $1243,56 \pm 91,99$ , n = 6). (Figura 10). Assim como a citocina TNF- $\alpha$  que também foi similar para ambos os grupos (normoglicêmicos e hiperglicêmicos), em todas as fases do processo de cicatrização de feridas (Figura 11).

**Figura 10: Comparação entre concentrações séricas de IL-6 de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.** Valores da média  $\pm$  SEM da concentração sérica da citocina pró-inflamatória Interleucina-6 (IL-6) de preparações de diferentes animais ao longo do processo de cicatrização de feridas. Dia -1 que indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento.



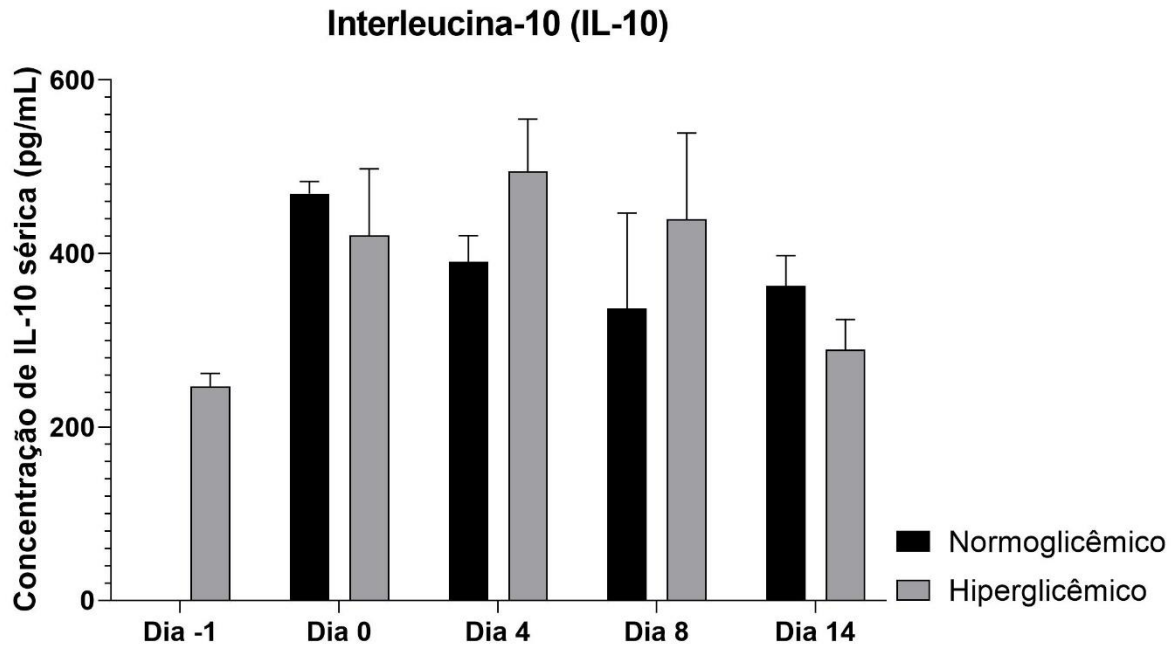
**Figura 11: Comparação entre concentrações séricas de TNF- $\alpha$  de ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.** Valores da média  $\pm$  SEM da concentração sérica da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) de preparações de diferentes animais ao longo do processo de cicatrização de feridas. Dia -1 que indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento.



Em relação à citocina imunomodulatória IL-10, as curvas mostraram uma tendência de se comportar de maneira oposta em relação a fase de cicatrização em que ocorreu o aumento e diminuição dos níveis de IL-10, porém esses valores não foram diferentes estatisticamente.

Em ratos hiperglicêmicos foi observado baixos níveis de IL-10 em ratos sem feridas (Dia -1), aumento das concentrações durante o processo de cicatrização (Dias 4 e 8) e diminuição dos níveis de IL-10 durante a fase de remodelamento. Já em ratos normoglicêmicos a IL-10 encontra-se aumentada no início do processo de cicatrização (Dia 0) e passa por uma diminuição no meio do processo de cicatrização (Dias 4 e 8), seguido de aumento dos níveis no fim do processo (Dia 14) (Figura 12).

**Figura 12: Comparação entre concentrações séricas de IL-10 em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos.** Valores da média  $\pm$  SEM da concentração sérica da citocina imunomodulatória Interleucina-10 (IL-10) de preparações de diferentes animais ao longo do processo de cicatrização de feridas. Dia -1 que indica ratos sem feridas; Dia 0 indica a análise feita em ratos logo após a elaboração da ferida, ou seja, fase de hemostase; Dia 4 quatro dias após a elaboração da ferida, indicando a fase inflamatória; Dia 8 oito dias após a elaboração da lesão e fase proliferativa; Dia 14 quatorze dias após a lesão e fase de remodelamento.



## 5. DISCUSSÃO

A primeira questão a ser respondida acerca das implicações do processo de cicatrização de feridas é se ratos com uma ferida de segunda intenção apresentam alterações na função endotelial sistêmica ao longo do processo de cicatrização de feridas. E, um segundo questionamento é se a condição glicêmica destes altera a resposta da função endotelial sistêmica.

Os resultados mostraram que ao longo do processo de cicatrização a função endotelial sistêmica sofre alterações e a resposta ao relaxamento com acetilcolina é diferente para ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos, em especial, nas primeiras fases do processo de cicatrização de feridas (fase de hemostase – Dia 0, e, fase inflamatória – Dia 4) que mostrou uma piora na função endotelial comparado as demais fases da cicatrização (Figuras 4 e 5).

Apesar de haver uma diferença na resposta ao relaxamento induzido por acetilcolina, os dados mostraram que aparentemente o NO sistêmico não é a molécula central que regula a dinâmica da resposta endotelial durante o processo de cicatrização em ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos (Figura 7). Algo similar foi identificado por Capellini e colaboradores (2010) ao estudar o modelo de disfunção vascular promovido por Aloxano. Este apresentou diferenças em relação ao aumento do estresse oxidativo, porém não apresentou mudanças nas concentrações de NO (CAPELLINI *et al.*, 2010).

No entanto, os ratos normoglicêmicos analisados apresentaram uma piora na capacidade de responder ao relaxamento por acetilcolina, evidenciado por menores valores de pD<sub>2</sub> comparado com ratos hiperglicêmicos no Dia 0 (Figuras 4 e 5). Ao analisar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) ao longo do processo de cicatrização, elas parecem desempenhar um papel relevante na regulação da resposta ao relaxamento por acetilcolina.

A fase de hemostase (Dia 0) de ratos normoglicêmicos também foi marcada pela maior expressão de IL-6 comparada com outras fases da cicatrização (Figura 8A). Altas secreções de IL-6 tem grande influência em processos que aumentam estresse oxidativo e regulação da eNOS culminando em um endotélio disfuncional (CELIA *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2017), algo similar pode estar ocorrendo com ratos normoglicêmicos na primeira fase da cicatrização de feridas, na qual a IL-6 estimula a expressão de fator tecidual, ou TF (do inglês, *tissue factor*) e a agregação de plaquetas, promovendo um ambiente vaso constritivo e protrombótico para a formação do tampão de coagulação, impedindo o extravasamento de sangue (AJJAN; GRANT, 2006). Ademais, nas primeiras horas após a formação da ferida, a iNOS está super estimulada produzindo mais peróxido nítrico e levando ao desacoplamento da eNOS, o que corrobora com o aumento do estresse oxidativo (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2016; KOLLURU; BIR;

KEVIL, 2012), o que poderia explicar a disfunção endotelial observada na fase de hemostase (Dia 0) em ratos normoglicêmicos.

Por outro lado, ratos hiperglicêmicos na fase de hemostase apresentaram altos valores de  $pD_2$  quando comparados à outras fases da cicatrização (Figuras 5C). Diferentemente do que é observado para ratos normoglicêmicos, ratos hiperglicêmicos normalmente já apresentam maior estresse oxidativo, inflamação de baixo grau constante (INCALZA *et al.*, 2018) e diminuição da Glutathiona Reduzida (GHS), o que é ainda mais evidente em ratos com hiperglicemia induzida por aloxano (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2018). Quando a iNOS é ativada a biodisponibilidade de NO aumenta, porém promove ao mesmo tempo um aumento da frequência de desacoplamento da sua versão endotelial (eNOS), gerando ainda mais estresse oxidativo e um processo denominado de hipercoagulação (ALZHRANI; AJJAN, 2010; VAIDYULA *et al.*, 2006), marcado por aumento da atividade e agregação plaquetária e aumento do número de macrófagos no fenótipo M1, o que é responsável por aumentar as concentrações de IL-6 observadas nos resultados da fase inflamatória de ratos hiperglicêmicos (Figura 9A) (AITCHESON *et al.*, 2021; STOJADINOVIC *et al.*, 2013; TELLECHEA *et al.*, 2013). Sendo assim, a resposta inflamatória de ratos hiperglicêmicos também é exacerbada, gerando a maior produção de EROS e conseqüentemente uma piora à resposta ao relaxamento por acetilcolina evidenciado por números menores de  $pD_2$  no Dia 4 (Figura 5C).

Como o tampão de coagulação formado na fase de hemostase é considerado como o reservatório de fatores de crescimento e uma matriz para a proliferação e migração celular sendo o estímulo para a próxima fase da cicatrização, fase inflamatória (BUI; WIESOLEK; SUMAGIN, 2020; CLARK, 2003), quanto maior for o estímulo para a formação do tampão de coagulação na fase de hemostase, maior será a resposta na fase inflamatória. No entanto, isso

poderia explicar a diminuição nas concentrações de IL-6 em ratos normoglicêmicos e a melhora da resposta ao relaxamento por acetilcolina na fase inflamatória por esses ratos.

No Dia 4 também foi observado o aumento da concentração de IL-10 em ratos hiperglicêmicos em comparação com ratos normoglicêmicos (Figura 12). O maior número de macrófagos em ratos hiperglicêmicos em comparação ao que é observado em ratos normoglicêmicos, promove também uma maior troca do fenótipo inflamatório M1 para o fenótipo antiinflamatório M2, também responsável pela secreção de IL-10 (AITCHESON *et al.*, 2021), sendo algo sugestivo para o aumento da concentração de IL-10 na fase inflamatória em ratos normoglicêmicos.

Com a transição para a fase proliferativa (Dia 8), os valores de pD<sub>2</sub> aumentam e não se diferenciam mais entre os ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos (Figuras 4C e 5C), o que pode acontecer devido a reestabelecimento da Matriz extracelular e diminuição do estresse oxidativo gerado pela lesão.

## **6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em conclusão, nossos resultados mostram que o processo de cicatrização de feridas pode induzir disfunção endotelial sistêmica em ratos Wistar normoglicêmicos na primeira fase de cicatrização (hemostase). Em ratos hiperglicêmicos, a disfunção endotelial é retardada e ocorre na fase inflamatória.

Todos esses achados apresentam-se como uma inovação do estudo do processo de cicatrização de feridas e como a função endotelial se comporta em um ambiente sistêmico. Até o atual trabalho, o que há na literatura foca em fases pontuais da cicatrização de feridas ou ainda tenta replicar vasos de maneira *in vitro*. Nosso trabalho inova ao identificar que em um organismo complexo como o de ratos Wistar, em diferentes condições glicêmicas

(normoglicêmico e hiperglicêmico) há uma influência diferencial na função endotelial avaliada ao passo que o processo de cicatrização de feridas avança.

O presente estudo também possibilita uma visão translacional entre a prática clínica e a pesquisa básica podendo ser uma ferramenta para entender como o processo de cicatrização de feridas influencia o organismo como um todo, sendo uma importante estratégia para determinação de alvos terapêuticos e tomada de decisão.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHESON, S. M. *et al.* Skin wound healing: Normal macrophage function and macrophage dysfunction in diabetic wounds. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2 ago. 2021.
- AJJAN, R.; GRANT, P. J. **Coagulation and atherothrombotic disease. Atherosclerosis**, jun. 2006.
- ALZHRANI, S. H.; AJJAN, R. A. **Coagulation and fibrinolysis in diabetes. Diabetes and Vascular Disease Research**, out. 2010.
- ASIF, M. *et al.* Antidiabetic activity of aqueous extract of *Sigesbeckia orientalis* (St. paul's wort) in alloxan-induced diabetes model. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. e18408, p. 1–10, 2019.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D. **Resveratrol and cardiovascular diseases. Nutrients**MDPI AG, , 1 maio 2016.
- BUI, T. M.; WIESOLEK, H. L.; SUMAGIN, R. **ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. Journal of Leukocyte Biology** John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2020.
- CAPELLINI, V. K. *et al.* Oxidative stress is not associated with vascular dysfunction in a model of alloxan-induced diabetic rats Estresse oxidativo não está associado à disfunção vascular em um modelo de diabetes induzida por aloxana em ratos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 6, p. 530–539, 2010.
- CELIA, A. I. *et al.* The role of IL-6 in endothelial dysfunction rheumatoid arthritis and COVID-19, two pathogenic models in comparison. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 81, p. 460–461, jun. 2022.
- CLARK, R. A. F. Fibrin Is a Many Splendored Thing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 5, 2003.
- IGHODARO, O. M.; ADEOSUN, A. M.; AKINLOYE, A. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds

- and plants extracts in experimental studies. **Medicina (Kaunas)**, v. 53, n. 6, p. 365–374, 2018.
- INCALZA, M. A. *et al.* **Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases.** **Vascular Pharmacology** Elsevier Inc., , 30 abr. 2018.
- ISENBERG, J. S. S. *et al.* Nitric oxide in wound-healing. **Microsurgery**, v. 25, n. 5, p. 442–451, 2005.
- KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, C. G. **Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing.** **International Journal of Vascular Medicine**, 2012.
- LAINING, T. *et al.* The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of impaired diabetic wound healing: A novel therapeutic target? **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 5, p. 1029–1031, 2007.
- LEE, J. *et al.* Interaction of IL-6 and TNF- $\alpha$  contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2017.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, fev. 2008.
- REINKE, J. M.; SORG, H. **Wound repair and regeneration.** **European Surgical Research**, ago. 2012.
- RODRIGUES, G. J. *et al.* Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1–3, p. 251–257, 2010.
- RODRIGUES, M. *et al.* Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**, v. 99, p. 665–706, 2019.
- STALLMEYER, B. *et al.* Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: Implications for tissue regeneration. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 168–177, 2002.
- STOJADINOVIC, O. *et al.* Increased number of Langerhans cells in the epidermis of diabetic foot ulcers correlates with healing outcome. **Immunologic Research**, v. 57, n. 1–3, p. 222–228, dez. 2013.
- TAKASU, N. *et al.* Streptozocin- and Alloxan-Induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA Fragmentation in Pancreas Islets - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as Mediator for DNA Fragmentation. **Diabetes**, v. 40, p. 1141–1145, 1991.
- TELLECHEA, A. *et al.* Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 12, n. 1, p. 4–11, mar. 2013.
- VAIDYULA, V. R. *et al.* **Effects of Hyperglycemia and Hyperinsulinemia on Circulating Tissue Factor Procoagulant Activity and Platelet CD40 Ligand.** [s.l: s.n.].

Disponível em: <<http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/55/1/202/381289/zdb00106000202.pdf>>.

- WITTE, M. B. *et al.* L-arginine supplementation enhances diabetic wound healing: Involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 10, p. 1269–1273, 1 out. 2002.
- ZIADLOU R. *et al.* Subcutaneous adipose tissue: Implications in dermatological diseases and beyond. **Allergy**, p. 1-16, 2024. doi:10.1111/all.16295