

JANAYNA TERLERA PAULINO

**Estudo do efeito do curativo biológico (pele de rã)
comparado ao curativo convencional sobre úlcera
diabética em ratos com diabetes crônico**

São Paulo

2023

JANAYNA TERLERA PAULINO

**Estudo do efeito do curativo biológico (pele de rã)
comparado ao curativo convencional sobre úlcera
diabética em ratos com diabetes crônico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Inovação Tecnológica e de Processos
Assistenciais Perioperatórios

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pires Camargo

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paulino, Janayna Terlera

Estudo do efeito do curativo biológico (pele de rã) comparado ao curativo convencional sobre úlcera diabética em ratos com diabete crônico / Janayna Terlera Paulino. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado profissional)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Inovações Tecnológicas e Processos Assistenciais Perioperatórios.
Área de concentração: Inovação e Medicina Perioperatória – Mestrado Profissional.
Orientadora: Cristina Pires Camargo.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Diabetes mellitus experimental 3.Pé diabético
4.Xenoenxertos 5.*Rana catesbeiana* 6.Peptídeos antimicrobianos 7. Pele de rã

USP/FM/DBD-445/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Paulino JT. Estudo do efeito do curativo biológico (pele de rã) comparado ao curativo convencional sobre úlcera diabética em ratos com diabete crônico [mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe que me ensinou a importância do aprendizado e do comprometimento para que cada um tivesse sua melhor participação na sociedade,

Ao meu marido que é meu companheiro de batalhas e melhor amigo, sempre me apoiando nesta jornada tão importante da minha vida,

À minha filha que é o maior presente que tenho, que me inspira e me ensina todos os dias,

À minha orientadora que me guiou na realização deste sonho com muito carinho e sabedoria.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.

Carl Sagan, astrofísico (1934-1996)

RESUMO

Paulino JT. Estudo do efeito do curativo biológico (pele de rã) comparado ao curativo convencional sobre úlcera diabética em ratos com diabetes crônica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: Úlceras de pé diabéticos (UPD) são lesões crônicas, que podem evoluir com infecção, deiscência, amputação e necrose. Vários autores analisaram diferentes curativos para o tratamento da UPD, porém não há um tratamento padrão. Atualmente, preconiza-se a utilização do xenoinxerto como uma estratégia de tratamento. O objetivo desse estudo é analisar o efeito da pele de rã sobre UPD.

Métodos: Foram analisados 20 ratos Wistar machos, com peso variando de 200 a 300g. Todos os animais receberam Estreptozotocina (55 mg/kg) para a indução de diabetes. Ao longo de dois meses esses animais receberam subdoses de insulina de ação prolongada duas vezes por semana para mimetizar quadro de diabetes crônico moderado. Ao final desse período os animais foram submetidos a cirurgia para a criação de UPD no dorso das patas (1×1 cm). Esses animais foram divididos em dois grupos: grupo controle-curativo com gaze e soro fisiológico 0,9% (n=10), grupo pele de rã (n=10). Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos para análise da cicatrização ao sétimo (n=5) e ao 14º (n=5) dia pós-operatório. Foram analisados área de contração da UPD, análise histológica (densidade vascular, apêndices dérmicos), análise de expressão gênica (IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9). **Resultados:** Nos grupos tratados com pele de rã (14 dias) houve redução de 50% da área da de contração da UPD em relação ao grupo controle. A análise histológica demonstrou aumento de 30% de neoangiogênese, 50% menos inflamação do grupo pele de rã (14 dias) em relação ao grupo controle. Quanto a expressão gênica houve diminuição de 60% IL-10 e 20% de MMP-9 ao se comparar o grupo pele de rã 14 dias em relação ao grupo controle (7 dias) gênica de IL10. **Conclusão:** Este estudo sugere que a utilização de pele de rã diminui processo inflamatório as custas de IL-10 e diminuição a contração da área de contração UPD. Mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Palavras-chave: Diabetes experimental. Complicações de diabetes. *Rana catesbeiana*.

ABSTRACT

Paulino JT. Study of the effect of biological dressing (frog skin) compared to conventional dressing on diabetic ulcer in rats with chronic diabetes [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Introduction: Diabetic foot ulcers (DFU) are chronic ulcers with a high risk of infection, necrosis, and amputation. Several papers analyzed dressing to treat DFU. However, there is no standard treatment. Recently several authors analyzed the potential of xenograft as a biological treatment. This study aims to analyze the effect of frog skin as a temporary dressing in DFU. **Method:** We analyzed twenty male Wistar rats weighing between 200 and all animals received streptozotocin (55 mg/kg) for the induction of diabetes. In addition, these animals received long-acting insulin twice a week for two months to mimic a moderate grade of chronic diabetes condition. Then, the animals underwent surgery to create DFUs on their hind legs (1 × 1 cm). These animals were divided into two groups: control dressing in gauze and 0.9% saline (n=10) and frog skin (n = 10). Each group was subdivided into two subgroups for analysis of wound healing on the seventh (n = 5) and 14th (n = 5) postoperative days. We analyzed the DFU area, histology (dermic appendages, neoangiogenesis, inflammatory cells), and gene expression (IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9) were analyzed. **Results:** The skin (14 days) group showed a decrease of 50% UPD contraction area compared to the control group. Histological analysis showed a 30% increase in neoangiogenesis and 50% less inflammation in the frog skin groups (14 days) versus the control group. There was a 60% decrease in IL-10 and 20% in MMP-9 when comparing the 14-day frog skin group versus the control group (7 days) in the IL10 gene. **Conclusion:** This study suggests that using frog skin reduces the inflammatory process at the expense of IL-10 and decreases the contraction of the UPD contraction area. More studies are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Experimental diabetes. Diabetes complications. *Rana catesbeiana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto ilustrativa da UPD com sutura de pele de rã	25
Figura 2 - Diagrama dos animais alocados por grupo e subgrupo.....	26
Figura 3 - Análise histológica.....	34
Figura 4 - Gel de agarose 1% realizado com amostras de RNA total do Projeto de Pele de Rã (PR), mostrando boa integridade do rRNA	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Descrição dos ensaios TaqMan® (<i>Thermo Fisher Scientific</i>) utilizados para seis genes de interesse e dois endógenos.....	29
Quadro 2- Preparo do mix para realização da PCR em tempo real, utilizando ensaios <i>TaqMan</i> ®.....	30
Quadro 3- Ciclagem de corrida padronizada para a PCR em tempo real com ensaios <i>TaqMan</i> ®.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mensuração da área da lesão diabética de acordo com o grupo alocado e o tempo da coleta dos dados	33
Tabela 2 - Mensuração de apêndices dérmicos, angiogênese e células inflamatórias nos grupos controle e tratados com pele	34
Tabela 3 - Comparação da expressão dos genes de interesse entre os grupos	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Diagrama em caixa do nível de expressão gênica de IL-10, de acordo com o grupo alocado	37
Gráfico 2 - Diagrama em caixa do nível de expressão gênica de MMP-9, de acordo com o grupo alocado	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE	-	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
CD68	-	<i>Cluster of Differentiation</i> (Biomarcador de Macrófagos)
cDNA	-	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EGF	-	Fator de crescimento epidérmico
EUA	-	Estados Unidos da América
HE	-	Hematoxilina-Eosina
IL1	-	Interleucina 1
MEC	-	Matriz extracelular
MMP	-	Metaloproteinase de matriz
NIH	-	National Institute of Health
PAM	-	Peptídeos antimicrobianos
PBS	-	Solução tamponada por fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDGF	-	Fator de crescimento plaquetário
PNS	-	Programa Nacional de Saúde
PO	-	Pós-operatório
PR	-	Pele de rã
rRNA	-	Ácido ribonucleico ribossômico
SF	-	Soro fisiológico
STZ	-	Estreptozotocina (<i>Streptozin</i>)
TNF	-	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UPD	-	Úlcera de pé diabético
VEGF	-	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
β-ME	-	Beta mercaptoetanol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	EPIDEMIOLOGIA	12
1.2	FISIOPATOLOGIA.....	12
1.3	DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	14
1.4	TRATAMENTO.....	14
1.5	CICATRIZAÇÃO	16
1.6	FASE INFLAMATÓRIA.....	17
1.7	FASE PROLIFERATIVA	17
1.8	FASE DE REMODELAMENTO	19
1.9	O PAPEL DO CURATIVO BIOLÓGICO EM FERIDAS CRÔNICAS	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	22
2.2	OBJETIVO SECUNDÁRIO	22
3	MÉTODOS	23
3.1	INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DA DIABETE CRÔNICO MODERADO	24
3.2	PREPARAÇÃO DE PELE DE RÃ.....	25
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	25
3.4	ANÁLISE MACROSCÓPICA	27
3.5	ANÁLISES MICROSCÓPICA	27
3.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9	27
3.6.1	Extração de RNA total	27
3.6.2	Análise da expressão gênica por qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa)	29
3.7	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	31
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4	RESULTADOS	32
4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	33
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	33
4.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA - IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Diabete mellitus é definida como uma doença metabólica crônica caracterizada por aumento dos níveis de glicose no sangue, resultante de uma deficiência parcial ou absoluta da produção de insulina pelo pâncreas (Cole; Florez, 2020). Estima-se que o diabete afeta 422 milhões de pessoas no mundo, cerca de 8,5% da população adulta mundial (Monteiro-Soares et al., 2020).

No Brasil, a prevalência de diabete é de 9,4% (DATASUS, 2022). Porém, segundo estimativas ajustadas pelo Programa Nacional de Saúde (PNS) essa prevalência pode chegar a 42,5% da população geral brasileira (Muzy et al., 2021). Pacientes portadores de diabete mal controlada podem evoluir com alterações de vascularização e neurológica. Em decorrência dessas alterações, 25% dos pacientes portadores de diabete podem evoluir com lesão em pés conhecida como úlcera de pé diabético (UPD) (Armstrong; Boulton; Bus, 2017, Saeedi et al., 2019; Chastain et al., 2019).

Os gastos anuais relacionados ao tratamento da diabetes podem chegar a 300 bilhões de dólares anuais, somente nos Estados Unidos da América (EUA), estes gastos incluem, além dos cuidados médicos, absenteísmo no trabalho, gerando impacto econômico direto e indireto. Segundo um censo de 2019, o National Institute of Health (NIH) Ministério da Saúde (EUA) estimou valor cerca sete bilhões de dólares por ano gasto para o tratamento de UPD, podendo alcançar o valor de 11,05 bilhões de dólares em 2027 (Burgess et al., 2021).

1.2 FISIOPATOLOGIA

O mecanismo fisiopatológico da microangiopatia diabética ainda não está totalmente elucidado. Dados da literatura demonstram algumas vias que poderiam causar alteração da microangiopatia. Uma das hipóteses, corresponde ao estado hiperglicêmico que aumenta o estresse oxidativo das células endoteliais bem como das células da musculatura lisa dos vasos causando a supressão dos receptores mediadores das células endoteliais (VEGF). Essas alterações bioquímicas fazem que haja acúmulo de (produtos de glicação avançada - *Advanced Glycation end product* [AGE]), aumento da produção de substâncias pró coagulação (fator de von Willebrand), aumento da apoptose, aumento da concentração intracelular de cálcio,

disfunção mitocondrial. Todos esses fatores causam alterações no equilíbrio e regulação do fluxo, sanguíneo, angiogênese (Keats e Khan, 2012).

Outra via a ser considerada é a alteração do microambiente vascular por hiperosmolaridade também causado pelo estado hiperglicêmico. A hiperosmolaridade causa alteração na regeneração e função das unidades vasculares (arteríola, vênulas e capilares). A falta de regulação da homeostase da microvasculatura causa apoptose de pericitos, endocitos, aumento da permeabilidade capilar e aumento de células inflamatórias. Essas alterações bioquímicas causam alteração da permeabilidade capilar, crescimento anormal de capilares e conseqüentemente diminuição da vascularização de tecidos e órgãos (Madonna et al., 2017).

Já a neuropatia também é conseqüência da alteração de hiperglicemia, hiperosmolaridade na vascularização de nervos (*vasa nervorum*) (Volmer-Thole & Lobmann, 2016).

A neuropatia é a alteração mais relevante ao aparecimento de UPD. A perda progressiva da sensibilidade dos pés pode causar perda da propriocepção e conseqüentemente alteração da marcha causando osteopatias, hiperqueratinização e ulceração de regiões de atrito dos pés (Lipsky et al., 2020).

Além das alterações supracitadas a perda de sensibilidade autonômica causa ressecamento da pele, acúmulo de linfa (edema) localo que contribui para o aumento do risco de fissuras e conseqüentemente perda da continuidade da pele, levando a microlesões que tornam a pele mais vulnerável a infecção a fungos e bactérias. (Lipsky et al., 2020).

A ocorrência de infecção bacteriana, imunossupressão causada pelo diabetes associada ao tratamento por antibióticos pode levar a o aumento do risco de resistência bacteriana podendo evoluir com infecção crônica, infecção sistêmica e osteomielite (Lipsky et al., 2020).

O paciente diabético sem controle adequado da glicemia e portador de UPD apresenta maior risco de infecção em tecidos, osteomielite e amputação de membros inferiores. Os agentes infecciosos mais frequentes são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bandyk, 2018; Lipsky et al. 2020; Murphy-Lavoie et al., 2022). Esses agentes devem ser monitorizados e tratados para diminuição do risco de resistência bacteriana com piora do prognóstico do paciente.

Devido ao aumento de glicemia, alteração da função de células de defesa (neutrófilos e macrófagos) a UPD é considerada ferida crônica (Oliver; Mutluoglu et al., 2022).

Após exame físico e laboratorial do paciente diabético portador de UPD o tratamento inicial é controle da glicemia e identificação de possível infecção local (Eneroth; Apelqvist; Stenström, 1997).

1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

O diagnóstico da UPD é clínico. De acordo com o exame e classificação da úlcera pode-se associar exames como hemograma, glicemia, PCR, cultura para estadiamento, exames de imagem (Raio-X, tomografia) e estadiamento. Dentre várias classificações disponíveis na literatura é interessante adotar duas classificações. A classificação proposta por Bravo-Molina et al. (2018) analisa o grau de profundidade da UPD e complicações locais. Sendo grau 1 (úlcera superficial), grau 2 (úlcera profunda envolvendo tendões, ossos e articulações), grau 3 (úlcera profunda associada a abscessos ou osteomielite), grau 4 (gangrena em parte do pé) e grau 5 (gangrena em todo o pé). Porém, não avalia fatores agravantes. Já a classificação da Universidade do Texas que analisa o grau de profundidade e associa a presença de isquemia, infecção local (Armstrong; Lavery; Harkless, 1998).

1.4 TRATAMENTO

Inicia-se o tratamento, que pode ser dividido em sistêmico e local. O tratamento sistêmico utiliza hipoglicemiantes para controle da glicemia e se necessário o uso de antibióticos guiados por cultura e antibiograma (Boulton et al., 2020).

Um dos fatores mais agravantes ao prognóstico da UPD é a associação ao estado de isquemia e infecção local. Diante desses fatos, o tratamento de UPD é complexo e envolve multidisciplinaridade (Lim; Ng; Thomas, 2017).

Concomitantemente ao tratamento sistêmico faz-se a programação do tratamento local da UPD. Nesta etapa a decisão de tratar paciente ao nível ambulatorial ou hospitalar influencia a decisão do tratamento local (Boulton et al., 2020; Lipsky et al., 2020).

Caso o paciente esteja sendo atendido em ambiente ambulatorial, opta-se por debridamento autolítico (curativos alterados úmidos e secos, com uso de hidrogéis, hidrocoloides. Ainda pode-se recorrer ao uso de substâncias químicas enzimáticas, como papaína (Lipsky; Senneville; Abbas et al., 2020).

Já a indicação de debridamento cirúrgico está mais indicada em ambiente hospitalar com uso associado de anestesia local e geral. Inicialmente, faz-se necessário ressecar tecidos desvitalizados, drenar coleções e abscessos através de técnica de debridamento (Boulton et al., 2020).

Conforme a profundidade e evolução da UPD são necessárias várias sessões de debridamento. Após debridamento, são realizados diversos curativos com o objetivo de melhorar o leito cirúrgico para o tratamento definitivo e consequentemente fechamento da UPD (Ahluwalia et al., 2021).

A indicação do uso de curativos apresenta grande variabilidade em parte pela heterogeneidade da UPD (seca, exsudativa, infecciosa) como também pela disponibilidade e preferência da equipe médica. De acordo com as características da UPD, pode-se utilizar curativos à base de alginato, indicados para UPD exsudativas. UPD com baixo fluxo de exsudação se beneficiam com uso de curativos hidrocolóides (Everett; Mathioudakis, 2018). Segundo revisão sistemática realizada pela Cochrane comparando dez tipos de curativos para o tratamento de UPD não há grau de evidência sobre a indicação do curativo mais indicado para esse uso (Wu et al., 2015). Ainda, de acordo com a presença de infecção local pode-se utilizar curativos associados a agentes antimicrobianos como sulfadiazina de prata (Everett; Mathioudakis, 2018). Na última década uma alternativa de tratamento de feridas é a utilização de substitutos epidérmicos ou dérmicos (naturais, sintéticos ou bio-sintéticos) (Everett; Mathioudakis, 2018; Holl et al., 2021). Dentro dessa categoria, o uso de aloenxertos ou xenoenxertos pode ser uma alternativa como cobertura temporária a feridas (Everett; Mathioudakis, 2018).

A pele de cadáver pode ser uma possibilidade, porém o seu uso é limitado pela dificuldade de doação de pele e disponibilidade de bancos de tecidos (Dai; Shih; Khachemoune, 2020). Na década 1960, a pele suína foi muito utilizada como substituto dérmico temporário, mas devido à alta imunogenicidade, a sua indicação foi minimizada (Elgharably et al., 2014).

Recentemente vários estudos analisaram o uso de pele de tilápia *Oreochromis niloticus* como curativo biológico temporário. A maioria dos estudos analisou o efeito da pele de tilápia em feridas causadas por queimadura, tem demonstrado bons resultados (Lima Júnior et al., 2020).

Outro tipo de curativo biológico temporário é a pele de rã. Semelhante à pele de peixe, a reação imunogénica e a citotoxicidade são baixas. Entretanto, vários

estudos demonstraram que a presença de peptídeos antimicrobianos (PAM) na pele de rã. Estes peptídeos apresentam ação antimicrobiana. Os peptídeos antimicrobianos da pele de rã apresentam cadeia curta de aminoácidos capazes de eliminar microrganismos (Boparai; Sharma,2020).

A ação bactericida dos PAMs se dá ao fato de, em sua grande maioria, serem catiônicos (88% dos peptídeos já classificados). A carga positiva dos PAMs interage com a membrana plasmática bacteriana (aniônicas) que apresentam um fator aniônico, causando assim o poro toroidal, resultando no extravasamento do citosol do microrganismo (Wang; Mechesso, 2022). Alguns estudos afirmam também que os PAMs têm propriedades anti-inflamatórias e imunoregulatórias (Lesiuk; Padaszyńska; Greber et al., 2022).

Já foram catalogados cerca de 2,600 PAMs incluindo, alguns com capacidade imunorreguladora (Mookherjee et al., 2020).

A pele de rã apresenta grande potencial para indicação na prática clínica, principalmente pelo baixo custo de produção, manutenção e alta disponibilidade. (Boparai; Sharma,2020).

1.5 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização corresponde a um processo complexo multifatorial de elementos celulares, imunológicos e hormonais que visam a restituição de barreira para homeostase (Ellis; Lin. Tartar, 2018).

Qualquer alteração nesse processo pode causar um ciclo crônico de inflamação do processo de cicatrização conhecidas como feridas crônicas. Didaticamente a cicatrização pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelamento (maturação). Embora haja um período para cada fase, as fases se sobrepõem na regeneração de feridas (Ellis, 2018).

1.6 FASE INFLAMATÓRIA

A fase inflamatória ocorre imediatamente após a perda de continuidade da pele. Imediatamente após o trauma a exposição do sub endotélio, colágeno e tecidos desvitalizados estimulam a agregação de plaquetas ativando a granulação celular liberando substâncias quimiotáticas para células inflamatórias. Essa sinalização de células causa migração de células inflamatórias (polimorfonucleares, leucócitos e neutrófilos) pela ativação de receptores “Toll-Like”. (Schreml,2010).

As células inflamatórias migram para o local da lesão e liberam quimiocinas que amplificam o processo pró-inflamatório. Assim, neutrófilos recrutados liberam mais citocinas, que associadas as células-T regulatórias liberam interferon — gama que regula a inflamação local. Essas citocinas recrutam macrófagos pró-inflamatórios locais com atividade fagocitária. A partir deste momento há início da regeneração tecidual, principalmente pela mediação de fatores como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento plaquetário (PDGF), interleucina -1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) (Ozgok Kangal; Regan, 2022).

1.7 FASE PROLIFERATIVA

A fase proliferação corresponde a proliferação de vasos (neoangiogênese), produção da matriz extracelular (MEC) e epitelização da ferida. Essa fase tem início após 3 a 5 dias do trauma com duração aproximada de 10 a 15 dias. As células predominantes a fase de proliferação são: células endoteliais e fibroblastos. (Demidova-Rice et al., 2012).

A neoangiogênese é estimulada pela diminuição da pressão de oxigênio, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), PDGF, bFGF. Diante deste estímulo há dois mecanismos de formação de vasos: brotamento de vasos a partir de vaso já formado e diferenciação de células progenitoras endoteliais (células de origem da medula óssea recrutadas por quimiotaxia) (Ozgok Kangal; Regan,2022).

Ainda há ativação da via de sinalização da esfingosina-quinase (Sp1-K), essa substância (proteína ácida e rica em cisteína) controla a proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Ozgok Kangal; Regan,2022).

Concomitantemente a esse processo de formação de vasos há processo de epitelização para a ocluir a ferida com ou sem contração da mesma de acordo com a

ativação de subpopulação de fibroblastos conhecida como miofibroblastos (Wallace et al., 2023).

A epitelização é realizada por reserva de células epiteliais localizadas nas bordas da ferida (camada basal), bulbo do folículo piloso, base de glândulas écrinas e sebáceas (Wallace et al., 2023).

Essa proliferação geralmente se inicia pelas células da camada basal dos limites da lesão perdem a junção célula através de três processos: célula e iniciam a divisão celular com rolamento entre as células para avançar a epitelização sobre a ferida (processo de pontes), processo lamela podal e avanço aleatório das células da camada epidérmica (Wang et al., 2018)

A proliferação epitelial por pontes promove a multiplicação dessas células epiteliais até atingir duas unidades de anexo dérmico.

O processo lamela-podal se baseia na proliferação celular ao longo do citoesqueleto r nos limites da ferida. Esse processo faz parte da epitelização e contração da ferida, esse desprendimento também ativa os queratinócitos promovendo divisão celular e o avanço dessas células sobre o leito da ferida.

Já o processo de proliferação aleatória das células (Shuffling tem início da proliferação da parte externa para a parte interna das bordas da ferida. O contato para junção célula-célula se faz quando os queratinócitos voltam a ter a forma original de “paralelepípedos” (Velnar et al. 2009).

Caso esse processo não reconstitua a barreira ocorre tecido de granulação (MEC, vasos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, colágeno tipo I, fibronectina, glicoproteínas, ácido hialurônico) (Wilkinson e Hardman, 2020).

Porém, há traumas no qual não há anexos viáveis ou há uma polarização inflamatória de interleucinas que impedem a cicatrização da cicatrização causando feridas crônicas (Wilkinson e Hardman, 2020).

1.8 FASE DE REMODELAMENTO

Essa fase é caracterizada pela formação de cicatriz e pode estender-se por anos. Dependendo da espécie essa fase se caracteriza pela ação de dois tipos celulares fibroblastos e miofibroblastos. Os fibroblastos são ativados a partir do terceiro dia após a lesão de pele. Após essa lesão, os fibroblastos localizados nas margens da ferida são ativados por citocinas como EGF, PDGF e pela tensão exercida na lesão. Assim esses fibroblastos se transformam em protomiofibroblastos como forma de resposta ao estresse da lesão para o fechamento da lesão. Após 4 dias, por estímulo de aumento da tensão das bordas da lesão associado a liberação de TGF — beta e da fibronectina, há o aparecimento da expressão de fibras contrateis nessas células — “alfa smooth muscle” com expressão de actina no miofibroblastos (Velnar et al. 2009).

Os miofibroblastos irão fazer a contração da ferida sobre a MEC neoformada.

Vale a pena distinguir nesse ponto a diferença de contração e contratura da ferida:

- Contração corresponde parte da cicatrização normal para o fechamento da ferida.
- Contratura — refere-se à retração da ferida podendo levar a disfunção de articulação, face, etc.

Os tipos de colágeno predominante na pele é tipo I e III. No início há a formação de protocógeno e depois com a maturação há formação de fibras colágenos com ligações cruzadas (Hinz,2016).

Em 6 semanas a força tênsil da cicatriz chega a 80% em relação à pele sem lesão. Porém o colágeno demora mais de seis meses para maturar.

1.9 O PAPEL DO CURATIVO BIOLÓGICO EM FERIDAS CRÔNICAS

Ferida crônica é definida como uma ferida que não se cicatriza após quatro semanas. Outros autores definem ferida crônica como ferida que apesar de tratada não regenera em um período de três meses (Järbrink et al., 2016).

Pacientes não diabéticos apresentam macrófagos do fenótipo M1 (fenótipo inflamatório) nos três primeiros dias após o surgimento da ferida e macrófagos do tipo M2 (fenótipo anti-inflamatório) do quarto dia em diante. Essa transição de fenotipagem é fundamental para a cicatrização de qualquer ferida. Em contrapartida, pacientes com hiperglicemia apresentam mais macrófagos do tipo M1 independentemente do tempo de surgimento da lesão, causando angiogênese desregulada, diminuição do colágeno e contribuindo para a evolução crônica de feridas (Louiselle et al., 2021).

Além disso, pacientes diabéticos apresentam aumento do estresse oxidativo, excesso de produção de metaloproteinase (MMPs) na matriz extracelular e apoptose anormal que também interfere negativamente na evolução da cicatrização (Aitcheson et al., 2021).

O controle glicêmico sistêmico contribui sobremaneira na evolução da UPD em pacientes diabéticos (Liu et al., 2021)

Porém, o tratamento tópico da UPD deve ser analisado. Pacientes com grau 1 e 2 (Classificação da Universidade do Texas) apresentam úlceras rasas sem acometimento de tecidos profundos. Nestes casos a reparação pode ser realizada por enxerto autólogo de pele. Neste sentido a hipótese deste estudo seria analisar o potencial de xenoenxerto por sete dias para mitigar contração secundária da UPD, diminuir inflamação local promovendo a proliferação de tecido de granulação adequado para a reparação definitiva (enxerto autólogo de pele).

Assim, este estudo já analisou o papel do xenoenxerto (pele de rã) em ratos induzidos a diabetes tipo 2 com UPD como uma estratégia simples de baixo custo para preparação do leito da ferida para receber enxerto de pele (Boulton e Whitehouse, 2000).

2 OBJETIVOS

Comparar a cicatrização da úlcera de pé diabético em ratos portadores de diabetes moderado com a utilização curativo convencional e o uso de pele de rã em curativo biológico.

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Analisar da área de contratura da úlcera de pé diabético em ratos tratados com a utilização curativo convencional e o uso do enxerto temporário de pele de rã 14º dia pós-operatório:

Ho- não há diferença entre os curativos.

H1- o uso de pele de rã diminui a área de contratura da ferida.

2.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

- a) Analisar da área de cicatrização da ferida de úlcera diabética em ratos tratados com a utilização curativo convencional e o uso do enxerto temporário de pele de rã no 7º e 14º dia pós-operatório;
- b) Analisar histologia (apêndices dérmicos, densidade vascular, células inflamatórias) no 7º e 14º dia pós-operatório;
- c) Analisar expressão gênica dos seguintes biomarcadores IL1-IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9 no 7º e 14º dia pós-operatório.

3 MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos de 250 g a - 300 g, com idade de oito semanas. Este projeto seguiu normas de boas condutas de uso animal e as diretrizes do uso de animal em experimentação (Conselho Nacional da Experimentação Animal [CONCEA]) e diretriz *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE)* —.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o registro com o nº 1061/2018. Todos os animais foram mantidos em biotério com ciclo dia/noite, água e alimentos *ad libidum*.

3.1 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DA DIABETE CRÔNICO MODERADO

Sob anestesia inalatória isoflurano de 100 mL/min a 150 mL/min (isoforane, Cristália, Brasil, foi realizada a indução da diabete em ratos, injetando por via intravenosa, veia peniana, estreptozocina (STZ) a 1% (*Streptozotocin mixed anomers* 031M1287V. *Sigma Chemical, St. Louis, MO*), na dose de 55 mg/kg, diluída em solução tamponada por fosfato (PBS), pH 4,5.

Antes da injeção de STZ e após 24h dessa indução, foi realizado punção da veia caudal, para medição de glicemia através do equipamento próprio para essa aferição (*One touch Johnson & Johnson*®, EUA). Os animais que apresentaram glicemia maior do que 200 mg/dL, foram considerados diabéticos.

Após a comprovação do estado diabético, todos os animais receberam de 1 UI a 2 UI de insulina Glargina, insulina humana análoga de longa duração (*Lantus*® *Sanofi- Aventis, Brasil*), por via subcutânea (dorso do animal), às 16 horas duas vezes por semana, com intervalo de 3 dias, entre as doses, durante 2 meses. A glicemia dos animais foi mensurada semanalmente com utilização de aparelho glicemia (*One Touch*® *Johnson & Johnson, EUA*), por meio de punção da cauda do animal. Foram considerados animais diabéticos crônicos moderados ao se obter glicemia entre de 300 mg/dL a 350 mg/dL (Camargo et al., 2020).

* Disponível em: <https://arriveguidelines.org/>.

3.2 PREPARAÇÃO DE PELE DE RÃ

As peles de rã foram doadas porem criadouro. Essas peles foram limpas com soro fisiológico (SF) a 0,9% e posteriormente mantidas em glicerol a 99% (Glicerina, Linfar, Brasil) por três dias. Após esse período as peles foram novamente lavadas com SF 0,9% e mantidas em glicerol a 50% por cinco dias e logo após, foram lavadas com SF0,9% e finalmente mantidas em glicerol 99% até a data da aplicação. No dia do uso dessas peles as mesmas foram lavadas e colocadas em imersão com SF 0,9% 30 minuto antes da aplicação na ferida.

Foram realizadas curetagem e análise de GRAM para detecção de bactérias.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais diabéticos foram anestesiados através da aplicação intraperitoneal da associação de cloridrato de quetamina,100 mg/kg (*Ketamin*[®], União Química, Brasil) e cloridrato de xylazina,5 mg/kg (*Rompum*[®], Bayer, Brasil).

Os mesmos foram posicionados em decúbito dorsal e a patas foram tricotomizadas com equipamento próprio para esse uso (*PRO6, Propetz*, Brasil). Foi aplicada solução tópica de clorhexidine 0,2% (*Riohex*[®], Rioquimica, Brasil) e a seguir realizada uma lesão nas duas patas traseiras (1 cm x 1 cm) de cada animal (Figura 1).

Figura 1 - Foto ilustrativa da UPD com sutura de pele de rã



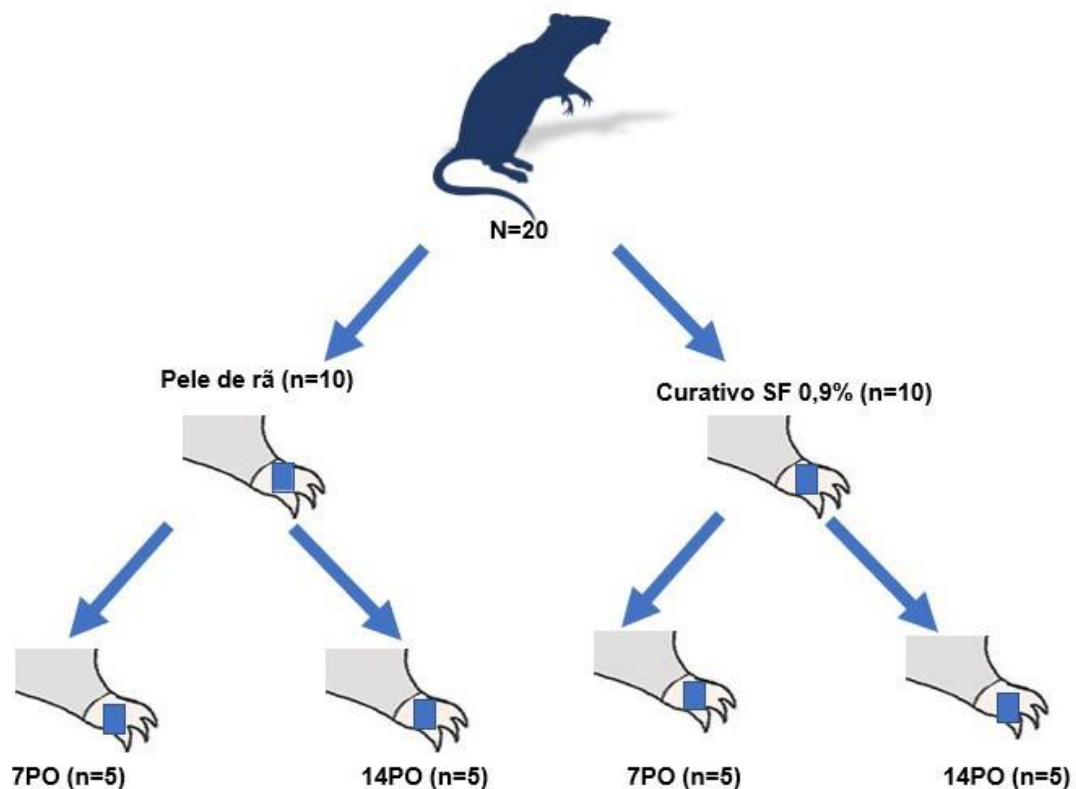
Após esse procedimento os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo controle (n=10) Foi aplicado com gaze, soro fisiológico 0,9% e curativo oclusivo plástico transparente (*Tegaderm*[®], 3M, USA).
- Grupo intervenção (n=10), foi aplicado enxerto de pele de rã, fixadas através de poliamida 4-0 (*Mononylon* [®], *Ethicon*, USA) sutura contínua. A seguir esse enxerto foi ocluído com curativo plástico transparente (*Tegaderm*[®], 3M, USA) (Figura 2).

Esses grupos foram subdivididos em dois subgrupos para avaliação dos desfechos: no sétimo e décimo quarto dia após o procedimento (Figura 2).

Os curativos foram observados diariamente e trocados quando necessário. Além disso, o estado geral do animal (dor, ingestão de alimentos, água) foi observado ao longo dos períodos de estudo.

Figura 2 - Diagrama dos animais alocados por grupo e subgrupo



3.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA

No sétimo e no décimo quarto dia de pós-operatório (PO), foi posicionada uma régua calibrada em centímetros ao lado de cada UPD. A seguir foi realizada fotografia com uso de câmera de celular (*iPhone 12, Apple, EUA*) das UPD's. Essas imagens foram transferidas para o programa *IMAGEJ*[®] (*NIH, EUA*) no qual foi mensurada a área da UPD em mm².

3.5 ANÁLISES MICROSCÓPICA

Foi coletada parte da lesão, a qual foi fixada em formalina 4% por 24 horas. A seguir essa amostra foi emblocada em parafina para coloração de hematoxilina-eosina (HE).

Sob microscopia óptica (*Nikon eclipse E600, Japão*) magnitude de aumento de 20x, 40x foi quantificada a contagem de apêndices dérmicos, densidade vascular, quantificação da fibrose (0= sem fibrose; 1= fibrose em grau leve; 2 = fibrose em grau moderado; 3= fibrose em grau elevado) em 10 campo aleatórios por amostra.

3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9

3.6.1 Extração de RNA total

A obtenção de RNA total foi feita por meio de cortes de 6 µm dos tecidos que receberam pele de rã (PR) em criostato eletrônico multiuso, marca *Carl Zeiss*, modelo *Hyrax C25*. Para realizar os criocortes, inicialmente os tecidos foram congelados em água Milli-Q ultrapura, livre de *DNAse/RNAse*, utilizando nitrogênio líquido. As superfícies internas e externas do criostato foram higienizadas com etanol 70% e em seguida com *RNAse away*, além dos 15 minutos de luz ultravioleta. Os crio cortes de tecidos foram feitos com o criostato a -34°C e, em seguida, foram colocados em tubos de 1,5mL previamente pesados e numerados, para obtenção de aproximadamente 30 mg de tecido para os tecidos que receberam as UPDs de cada grupo. Para a extração RNA total. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso. Para extração de RNA total das amostras foi utilizado o kit *RNeasy*[®] Mini Kit (*QIAGEN, Alemanha*), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os tubos contendo amostras de tecidos foram retirados do *freezer* -80 °C, colocados em isopor com gelo seco para evitar qualquer descongelamento. Ainda com o tubo dentro do gelo seco, foi adicionado 600µL de tampão RLT (previamente preparado com β-mercaptoetanol [β-ME]), no qual se adiciona 10 µL de β-ME por 1 mL de Tampão RLT) e, em seguida, os tubos foram retirados do gelo e as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 60s para que toda a solução de lise penetrasse no tecido.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos em velocidade máxima. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para um novo tubo, onde foi adicionado aproximadamente um volume de etanol 70% (previamente preparado) a temperatura ambiente. A solução foi aplicada em uma coluna e submetida à centrifugação a 8.000 × g por 15 segundos.

O filtrado foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda solução fosse passada pela coluna (utilizando o mesmo tubo coletor para as etapas de lavagem). A coluna foi lavada uma vez com a solução de lavagem RW1 e duas vezes com a solução de lavagem RPEt, seguidas de centrifugação a 15 segundos a 8.000 × g, exceto pela última centrifugação. Nesta, a centrifugação foi por 2 minutos a 8.000 × g, sendo trocado o tubo coletor nesta etapa. Após o descarte do filtrado, a amostra foi centrifugada por mais um minuto, a velocidade máxima para remoção de qualquer fluido residual na coluna. As colunas foram então transferidas para um novo tubo, no qual foi adicionado 35µL de água livre de *RNase* no centro da coluna para eluição do RNA total. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados por um minuto à velocidade máxima para recuperar o RNA.

As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento de utilização. A concentração e pureza do RNA total foram analisadas usando o *NanoPhotometer® P- Class Spectrophotometer (Implen, Alemanha)* e a integridade do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram consideradas amostras com qualidade suficiente para prosseguir para as próximas etapas: concentração de RNA total ≥ 100 ng/µL e grau de pureza (avaliadas através das razões 260/280 e 260/230). A análise da integridade do RNA considerou a integridade das bandas 28s e 18 segundos do RNA ribossômico (rRNA).

3.6.2 Análise da expressão gênica por qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa)

Para a etapa de avaliação de expressão gênica foi inicialmente sintetizado cDNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando um input inicial de 1000 ng de RNA total para as amostras do grupo controle e entre 1250 ng e 1500 ng para as amostras do grupo pele de rã, por transcrição reversa utilizando *High-Capacity*

RNA-to-cDNA™ Kit (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as orientações do kit e utilizando o equipamento *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*). O produto amplificado foi armazenado a -20°C até o uso.

Somente foi diluído o DNA no dia da reação de PCR em tempo real para análise de expressão gênica, com água livre de RNase, para a concentração padrão de 12,5 ng/μL. A expressão dos genes de interesse foi investigada por meio de PCR em tempo real, utilizando a metodologia *TaqMan*. O Quadro 1 descreve os ensaios *TaqMan* (*Thermo Fisher Scientific*) utilizados para os seis genes de interesse do estudo, além de dois genes endógenos, específicos para amostras de rato.

Quadro 1- Descrição dos ensaios TaqMan® (*Thermo Fisher Scientific*) utilizados para seis genes de interesse e dois endógenos

Descrição	Gene	Nomenclatura	Ensaio TaqMan
Genes Alvos	<i>Il1rap</i>	<i>Interleukin-1 receptor accessory protein</i>	Rn01404183_m1
	<i>Il10</i>	<i>Interleukin 10</i>	Rn01483988_g1
	<i>Tnf</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	Rn01525859_g1
	<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	Rn00579162_m1
	<i>Cd68</i>	<i>Cluster of Differentiation 68</i>	Rn01495634_g1
	<i>Mmp3</i>	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>	Rn01495634_g1
Genes endógenos	<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase</i>	Rn01775763_g1
	<i>Actb</i>	<i>Actin Beta</i>	Rn00667869_m1

Para o preparo dos mixes foram utilizados os respectivos ensaios *TaqMan*, água ultrapura livre de *RNAse* e *TaqMan Universal Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*), conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2- Preparo do mix para realização da PCR em tempo real, utilizando ensaios *TaqMan*[®]

Reagentes	X1 (µµL)
TaqMan master mix 2x	6,250
TaqMan assay 20x	0,625
H ₂ O	4,65
Volume final	11,5

Ao volume de 11,5 µL adicionou-se 1 µL de amostra de cDNA, totalizando 12,5 µL de volume final de reação. A amplificação foi realizada no equipamento *ABI StepOne Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com recomendações do fabricante, seguindo a ciclagem descrita no Quadro 3.

Quadro 3- Ciclagem de corrida padronizada para a PCR em tempo real com ensaios *TaqMan*[®]

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Incubação	50 °C	2 minutos	1x
Ativação da enzima/Desnaturação	95 °C	10 minutos	
Desnaturação	95 °C	15 segundos	40x
Anelamento/extensão	60 °C	1 minuto	

As amostras foram corridas em duplicatas e a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foi realizada por meio do método de Ct comparativo (Livak, Schmittgen, 2001). Foram utilizados os genes *Gapdh* e *Actb* para este estudo. E após isso foi calculado delta-delta CT de cada gene de interesse.

3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

De acordo com o subgrupo alocado, os animais foram submetidos a eutanásia por injeção intraperitoneal da associação de cloridrato de quetamina, 300 mg/kg (*Ketamin*[®], União Química, Brasil) e cloridrato de xilazina 30 mg/kg (*Rompum*[®], Bayer, Brasil). Após a eutanásia, os animais receberam as medidas necessárias para seu descarte conforme a Cartilha de Orientação de Descarte de Resíduo no Sistema FMUSP-HC, que segue a Resolução nº 306, de 7 de dezembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), nº 358, de 29 de abril de 2005.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por estatística descritiva e calculados mediana e intervalo interquartil. Para a análise inferencial as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de *Kruskal-Wallis* e *Teste de Dunn* como *análise pos hoc*. Foi considerado p de alfa igual 5% e poder do estudo de 80%. Foi utilizado o programa STATA v.17 (*StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 17. College Station, TX: StataCor*).

4 RESULTADOS

Não houve perda de nenhum animal ao longo do estudo. Os animais não apresentaram sinais de dor ou alteração da ingesta de ração e água. Não se observou sinais de infecção nas patas com UPDs.

4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Este estudo demonstrou que a área da contração da UPD nos animais do grupo controle diminuiu mais de 70% no sétimo ($p=0,009$) ao se comparar com o grupo tratado com pele de rã.

Alem disso ao se analisar o 14^o dia (de pós-operatório houve contração da UPD de mais de 80% ($p=0,008$) no grupo controle ap se comparar com o grupo tratado com pele de rã.

Esses dados demonstraram fator benéfico do tratamento das UPD tratadas com pele de rã pela diminuiu a contração da ferida, o que possivelmente foi causado pela diminuição da formação de fibrose.

Tabela 1 - Mensuração da área da lesão diabética de acordo com o grupo alocado e o tempo da coleta dos dados

Grupo	Controle-7D mediana (IIQ)	PR-7D mediana (IIQ)	Controle 14D mediana (IIQ)	PR-14D mediana (IIQ)
Área (mm ²)	32,8 (26,5 - 44,18)	55,6 (41,9 - 65,7)	7,49 (4,15 - 8,23)	43,3 (40 - 50,3)

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

No período de sete dias não houve diferença entre o grupo tratado com pele de rã *versus* grupo controle. No período de 14 dias, houve aumento de apêndices dérmicos no grupo tratado com pele de rã *versus* grupo controle ($p=0,03$) (Tabela 2 e Figura 3).

Em relação à mensuração de densidade vascular (neoangiogênese), houve aumento de 30% da neoangiogênese no grupo tratado com pele de rã ao se comparar o grupo tratado com curativo conservador no sétimo ($p=0,003$) e no 14^o dia ($p=0,002$) de pós-operatório (Tabela 2).

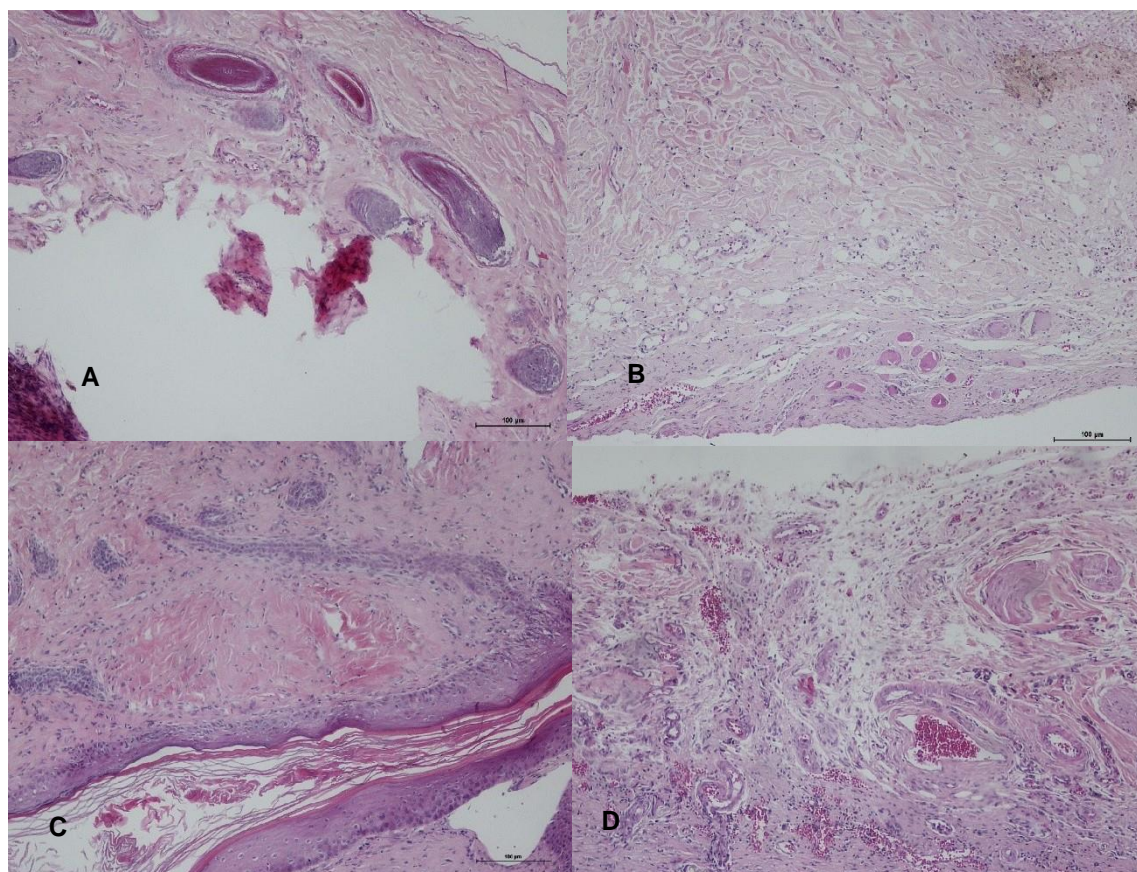
As células inflamatórias demonstraram diferença ($p=0,003$). OS achados demonstraram diminuição de 10% ao se comparar o grupo pele de rã 7 dias com o grupo controle 7dias ($p=0,07$).

Ao se comparar o grupo controle 7 dias com grupo de pele de rã 14d houve diminuição de 40% de células inflamatórias ($p=0,006$). E ao se comparar o grupo controle 14 dias com grupo de pele de rã 14 dias demonstrou-se redução de quase 50% ($p=0,0002$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Mensuração de apêndices dérmicos, angiogênese e células inflamatórias nos grupos controle e tratados com pele

Grupo	Controle-7D mediana(IIQ)	PR-7D mediana (IIQ)	Controle 14D mediana (IIQ)	PR-14D mediana (IIQ)
Apêndices dérmicos	12 (8 - 14)	21 (15 - 22)	28 (25 - 44)	44 (33 - 47)
Angiogênese	10 (9 - 12)	17 (11 - 18)	10 (8 - 12)	18 (15 - 21)
Células inflamatórias	108 (103 - 129)	94 (83 - 101)	141 (122 - 154)	68 (66 - 74)

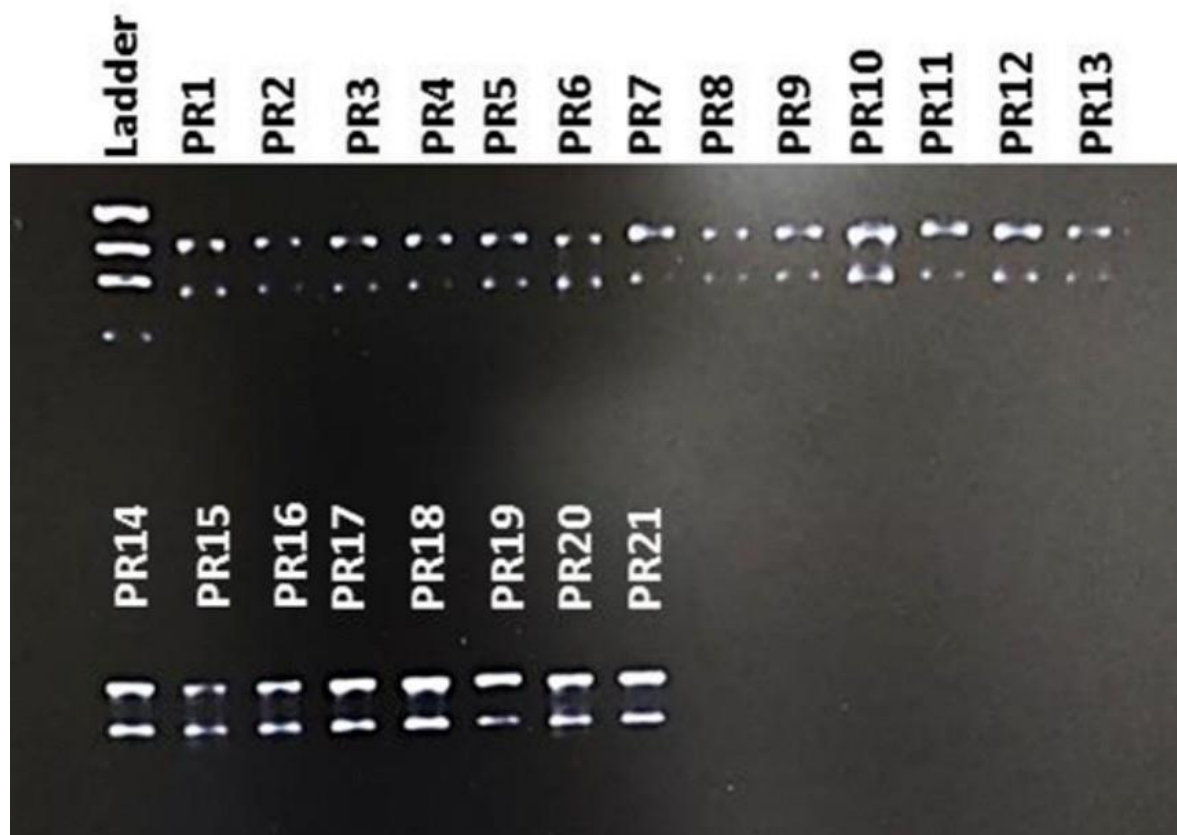
Figura 3 - Análise histológica: A) pele de rã 7 dias PO; B) pele de rã 14 dias PO; C) curativo convencional 7 dias PO; D) curativo convencional 14 dias PO



4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA - IL-10, TNF, CD68, MMP3, MMP9

Todas as amostras apresentaram um “range” de 1,95-2,09 para a razão 260/280 e 1,07-2,19 para a razão de 260/230, indicando um de extração de RNA total. A eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para todas as amostras, utilizando um input de 200 ng de RNA, e permitiu avaliar a integridade do RNA através da análise das bandas 18S e 28S do rRNA. As amostras do projeto apresentaram de forma clara a presença das duas bandas de rRNA, confirmando a boa qualidade das amostras, conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 - Gel de agarose 1% realizado com amostras de RNA total do Projeto de Pele de Rã (PR), mostrando boa integridade do rRNA



A banda superior representa a banda 28S e a banda inferior representa 18S (rRNA).

Em relação ao resultado da análise da expressão gênica das amostras de interesse (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da expressão dos genes de interesse entre os grupos

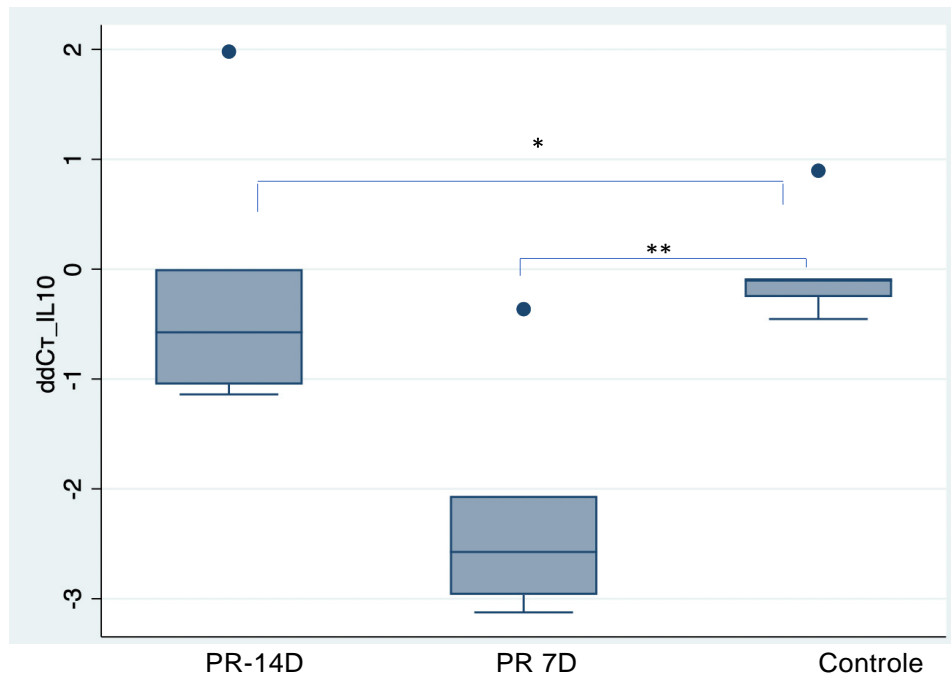
Variável (ddCT)/Grupo	Controle-7D mediana (IIQ)	PR-7D mediana (IIQ)	Controle 14D mediana (IIQ)	PR14D mediana (IIQ)
TNF	-0,04 (-0,13 - 0,4)	-0,53 (-1,48 -0,4)	-0,15 (-0,34 - 0,3)	-0,45 (-0,59 - 0,33)
IL-10	-1,04(-0,25 - 0,84)	-2,57 (-2,9 - 2,06)	-0,65 (-1,01 - 1,02)	-0,65(-1,05 - 1,015)
CD 68	-0,78 (-0,42 - 0,82)	0,23 (0,06 - 0,78)	-0,97 (-0,38 - 0,38)	0,56 (-0,55 - 1,05)
MMP3	0,176 (-0,3 -1,25)	0,72 (-3,2 - 1,66)	-0,78 (-1,85 - 1,85)	-2,11 (-2,9 - 0,96)
MMP9	-0,24 (-0,52 - 0,24)	-1,34 (0,14 - 2,63)	0,06 (-1,25 - 1,25)	-1,59 (-2,24 - 0,58)

ddCT-delta-delta CT; IIQ intervalo interquartil

Ao assumir o grupo controle como parâmetro de controle, este estudo demonstrou diferença que a expressão gênica de IL-10 ($p=0,01$). Sendo que houve aumento de duas vezes o nível a expressão gênica de IL-10 do grupo Controle em relação ao grupo tratado com pele de rã no sétimo dia (-1,04 vs. -2,65, respectivamente).

Já ao se comparar o grupo Pele de rã 14 dias com o grupo controle demonstrou-se diminuição de 60% do nível a expressão gênica de IL-10 do grupo Pele de rã 14 dias ao se comparar com o grupo controle (-0,65 vs -1,04, respectivamente) (Gráfico 1).

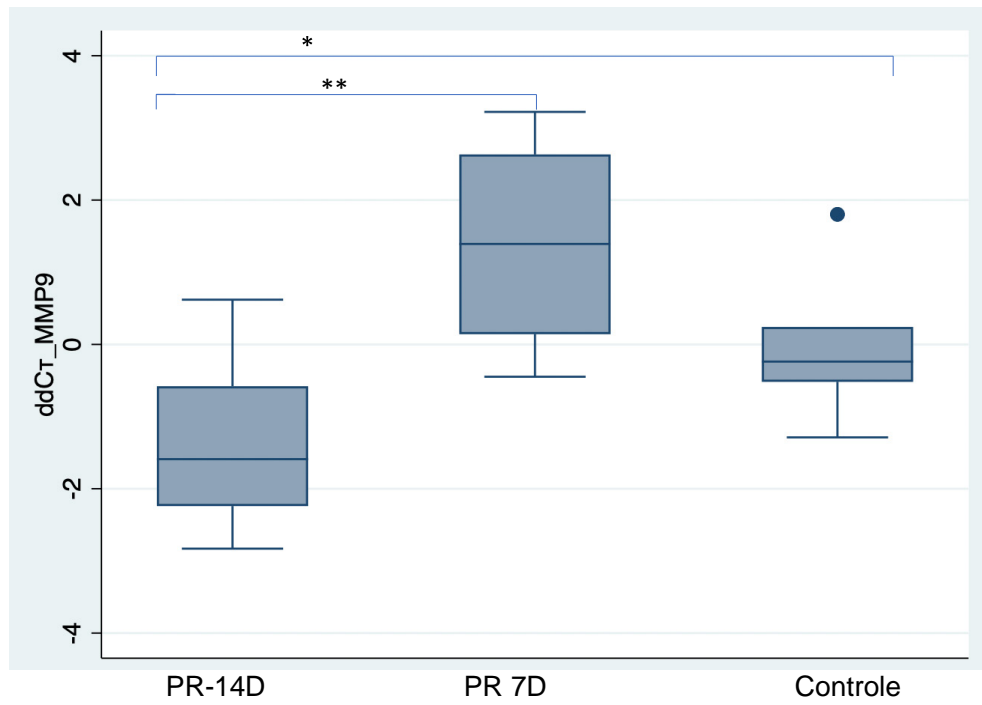
Gráfico 1 - Diagrama em caixa do nível de expressão gênica de IL-10, de acordo com o grupo alocado



* p=0,01; ** p=0,003

Em relação à expressão gênica de MMP-9 também houve diferença ($p = 0,015$). Este estudo demonstrou diminuição de seis vezes o nível a expressão gênica de MMP-9 do grupo Pele de rã 14 dias em relação ao grupo Controle (-1,59 vs. -0,24, respectivamente). Ainda se demonstrou 20% de aumento da expressão gênica de MMP-9 grupo Pele de rã 14 dias ao se comparar com grupo Pele de rã -7 dias (-1,59 vs 1,34, respectivamente) (Figura 6).

Gráfico 2 - Diagrama em caixa do nível de expressão gênica de MMP-9, de acordo com o grupo alocado



* $p=0,06$; ** $p=0,002$

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o uso de pele de rã (14 dias) reduziu 50% a área da contração da UPD em relação ao grupo controle. A diminuição da contração secundária diminuiu a deposição de colágeno e ação de miofibroblastos. Esse processo clinicamente diminuiu a fibrose cicatricial diminuindo a área de contração da ferida.

A importância de alternativas para diminuir a contração cicatricial tem despertado interesse. Vários autores analisaram o mecanismo de ação da contração secundária e regeneração tecidual (Sooller et al., 2012; Yannas et al., 2017; Koga et al., 2020). Assim, em feridas de pele a tensão linear plana promove a ativação de miofibroblastos que por sua vez aumentam a produção de fibrose e aumentam a contração de feridas (Sooller et al., 2012; Yannas et al., 2017).

Assim uma das alternativas para se evitar o acúmulo de fibrose seria a redução da tensão linear sobre as feridas. Neste sentido, Yannas et al. (2017) realizaram uma revisão da literatura sobre uso de substitutos dérmicos com objetivo de diminuir a contração cicatricial.

Esta análise demonstrou que o uso de um arcabouços nas feridas podem diminuir a força tênsil linear no local da ferida evitando o super estímulo de miofibroblastos. Baseado nesses achados, nosso estudo demonstrou que o uso de xenoenxerto (pele de rã) como arcabouço biológico mitigou a contração tissular.

Nossa hipótese se baseia que o uso da pele de rã teria como função ser um tipo de espaçador na ferida que consequentemente diminuiria a força tensil linear da ferida. Esse arcabouço estabilizaria a tensão da ferida e diminuiria o processo inflamatório. Por esse motivo, analisamos o efeito do uso da PR em um modelo inflamatório, animais diabéticos.

Macroscopicamente o enxerto de PR se mostrou efetivo na prevenção da contração da ferida (úlceras de pé diabético). Corroborando com esses dados, os achados histológicos demonstraram aumento de 30% de neoangiogênese, 50% menos inflamação do grupo pele de rã no 14º dia pós-operatório *versus* que o grupo controle (14 dias). A diminuição do ambiente inflamatório também foi demonstrada com a análise da expressão gênica. Essa análise demonstrou diminuição de 60% IL-10 e 20% da expressão de MMP-9 ao se comparar o grupo pele de rã 14 dias *versus* grupo controle (7 dias).

O uso de substitutos epidérmicos ou dérmicos (naturais, sintéticos ou biosintéticos) tem sido uma estratégia de tratamento de feridas (Everett;

Mathioudakis, 2018; Holl et al., 2021). Os substitutos sintéticos apresentam vantagens como produto final disponível, porém o custo, meia vida curta dos componentes deste substituto dérmico (fatores de crescimento, biorreatores) (Halim; Khoo; Mohd Yussof, 2010).

Como alternativa de substituto dérmico temporário, o uso de substitutos biológicos como a pele suína foi muito utilizada no passado mas devido à alta imunogenicidade hospedeiro- enxerto, a sua indicação foi abandonada. (Elgharably et al., 2014).

Recentemente, vários estudos analisaram o uso de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como substituto biológico temporário. A maioria dos estudos analisaram o efeito da pele de tilápia em feridas causadas por queimadura demonstrando bons resultados. Porém, não há dados sobre o mecanismo de ação dessa alternativa. Além disso, não há estudos sobre o uso de pele de tilápia em feridas infectadas e potencialmente infectadas (Lima-Junior et al., 2019).

Neste sentido, a literatura científica recentemente analisou o uso da pele de rã como outro tipo de substituto biológico temporário. Esta alternativa teria uma vantagem adicional sobre o uso de pele de tilápia pelo fato de apresentar na sua composição PAM.

Este peptídeo apresenta ação antimicrobiana tornando a indicação de pele de rã como curativo mais adequado as feridas crônicas infectadas.

Os peptídeos antimicrobianos apresentam cadeia curta de aminoácidos capazes de eliminar microrganismos. Já foram catalogados cerca de 2,600 PAMs incluindo, alguns com capacidade imunorregulatória (Mookherjee et al., 2020). A ação bactericida dos PAMs se dá ao fato de, em sua grande maioria, serem catiônicos (88% dos peptídeos já classificados). A carga positiva dos PAMs interage com a membrana plasmática bacteriana (aniônicas) que apresentam um fator aniônico, causando assim o poro toroidal causando o extravasamento do citosol do microrganismo (Wang; Mechesso, 2022). Assim a ação antimicrobiana se faz por rotura da parede celular do microrganismo e potencialmente não causaria resistência bacteriana.

Com esses dados iniciamos uma linha de pesquisa na qual analisaremos o uso da pele de rã como substituto da pele.

O presente estudo é uma análise preliminar do uso de pele de rã como potencial substituto dérmico. Como primeiro estudo avaliamos o efeito da pele de rã

sobre a contração de um tipo de ferida crônica. De acordo com os dados coletados e análise dos benefícios quanto a diminuição da contração da ferida, com estabilização do macro ambiente e conseqüentemente diminuição da tensão que causaria aumento da inflamação local.

Os próximos passos desta linha de pesquisa será analisar o potencial antimicrobiano da pele de rã em uma ferida contaminada.

Este estudo apresenta algumas limitações como o uso de modelo murino que apresenta estrutura anatômico e histológica diferente da pele humana, bem como o pequeno tamanho amostral devido à natureza experimental desta análise.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo sugere que a utilização de pele de rã diminui processo inflamatório às custas de IL-10 e diminuição a contração da área de contração UPD. Mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

REFERÊNCIAS[†]

[†] De acordo com Estilo Vancouver.

- Ahluwalia R, Maffulli N, Lázaro-Martínez JL, Kirketerp-Møller K, Reichert I. Diabetic foot off loading and ulcer remission: Exploring surgical off-loading. *Surgeon*. 2021 Dec;19(6):e526-e535
- Aitcheson SM, Frentiu FD, Hurn SE, Edwards K, Murray RZ. Skin Wound Healing: Normal Macrophage Function and Macrophage Dysfunction in Diabetic Wounds. *Molecules*. 2021 Aug 13;26(16):4917.
- Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med*. 2017 Jun 15;376(24):2367-75.
- Armstrong DG, Lavery LA, Harkless LB. Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care*. 1998 May;21(5):855-9.
- Armstrong DG, Swerdlow MA, Armstrong AA, Conte MS, Padula WV, Bus SA. Five year mortality and direct costs of care for people with diabetic foot complications are comparable to cancer. *J Foot Ankle Res*. 2020 Mar 24;13(1):16.
- Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett*. 2020;27(1):4-16.
- Boulton AJM, Armstrong DG, Hardman MJ, Malone M, Embil JM, Attinger CE, Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Li HK, Schultz G, Kirsner RS. *Diagnosis and Management of Diabetic Foot Infections*. Arlington (VA): American Diabetes Association; 2020 Jan.
- Boulton AJM, Whitehouse RW. The Diabetic Foot. 2023 Jul 28. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. PMID: 28121117.
- Bravo-Molina A, Linares-Palomino JP, Vera-Arroyo B, Salmerón-Febres LM, Ros-Díe E. Inter-observer agreement of the Wagner, University of Texas and PEDIS classification systems for the diabetic foot syndrome. *Foot Ankle Surg*. 2018;24(1):60-4
- Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct 8;57(10):1072.
- Camargo CP, Weschenfelder RHN, Fonseca GMD, Sousa AADC, Gemperli R. A non-inferiority study to compare daily fast-acting insulin versus twice a week slow-acting insulin-moderate diabetes mode. *Acta Cir Bras*. 2020;35(7):e202000704.
- Chastain CA, Klopfenstein N, Serezani CH, Aronoff DM. A Clinical Review of Diabetic Foot Infections. *Clin Podiatr Med Surg*. 2019 Jul;36(3):381-95.
- Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Jul;16(7):377-90.

Dai C, Shih S, Khachemoune A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *J Dermatolog Treat*. 2020 Sep;31(6):639-48.

DATASUS. *Tabnet* [internet]. 2023 [citado em 26 out 2023]. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>

Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012 Jul;25(7):304-14.

Elgharably H, Ganesh K, Dickerson J, Khanna S, Abas M, Ghatak PD, Dixit S, Bergdall V, Roy S, Sen CK. A modified collagen gel dressing promotes angiogenesis in a preclinical swine model of chronic ischemic wounds. *Wound Repair Regen*. 2014 Nov-Dec;22(6):720-9.

Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep*. 2018;7(4):350-358.

Eneroth M, Apelqvist J, Stenström A. Clinical characteristics and outcome in 223 diabetic patients with deep foot infections. *Foot Ankle Int*. 1997 Nov;18(11):716-22.

Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Jan;1411(1):153-65.

Halim AS, Khoo TL, Mohd Yussof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian J Plast Surg*. 2010;43(Suppl):S23-8.

Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med*. 2016 Oct-Dec;64(4):171-177.

Holl J, Kowalewski C, Zimek Z, Fiedor P, Kaminski A, Oldak T, Moniuszko M, Eljaszewicz A. Chronic Diabetic Wounds and Their Treatment with Skin Substitutes. *Cells*. 2021 Mar 15;10(3):655.

Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, Car J. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*. 2016 Sep 8;5(1):152.

Keats EC, Khan ZA. Vascular stem cells in diabetic complications: evidence for a role in the pathogenesis and the therapeutic promise. *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Apr 23;11:37.

Koga AY, Felix JC, Silvestre RGM, Lipinski LC, Carletto B, Kawahara FA, Pereira AV. Evaluation of wound healing effect of alginate film containing Aloe vera gel and cross-linked with zinc chloride. *Acta Cir Bras*. 2020 Jul 3;35(5):e202000507.

Lesiuk M, Padaszyńska M, Greber KE. Synthetic Antimicrobial Immunomodulatory Peptides: Ongoing Studies and Clinical Trials. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Aug 5;11(8):1062.

- Lim JZ, Ng NS, Thomas C. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *J R Soc Med*. 2017 Mar;110(3):104-109.
- Lima Júnior EM, De Moraes Filho MO, Costa BA, Rohleder AVP, Sales Rocha MB, Fechine FV, Forte AJ, Alves APNN, Silva Júnior FR, Martins CB, Mathor MB, Moraes MEA. Innovative Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft: A Phase II Randomized Controlled Trial. *J Burn Care Res*. 2020 May 2;41(3):585-92.
- Lima-Junior EM, de Moraes Filho MO, Costa BA, Fechine FV, de Moraes MEA, Silva-Junior FR, Soares MFADN, Rocha MBS, Leontsinis CMP. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *J Surg Case Rep*. 2019 Jun 14;2019(6):rjz181.
- Lipsky BA, Senneville É, Abbas ZG, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil JM, Kono S, Lavery LA, Malone M, van Asten SA, Urbančič-Rovan V, Peters EJG; International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). Guidelines on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update). *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 Mar;36 Suppl 1:e3280.
- Liu Y, Liu Y, Deng J, Li W, Nie X. Fibroblast Growth Factor in Diabetic Foot Ulcer: Progress and Therapeutic Prospects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Oct 14;12:744868.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Louiselle AE, Niemiec SM, Zgheib C, Liechty KW. Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Transl Res*. 2021 Oct;236:109-116.
- Madonna R, Balistreri CR, Geng YJ, De Caterina R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascul Pharmacol*. 2017 Mar;90:1-7.
- Monteiro-Soares M, Russell D, Boyko EJ, Jeffcoate W, Mills JL, Morbach S, Game F; International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). Guidelines on the classification of diabetic foot ulcers (IWGDF 2019). *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 Mar;36 Suppl 1:e3273.
- Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 May;19(5):311-332.
- Murphy-Lavoie HM, Ramsey A, Nguyen M, Singh S. Diabetic Foot Infections. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 4, 2022.
- Muzy J, Campos MR, Emmerick I, Silva RSD, Schramm JMA. Prevalence of diabetes mellitus and its complications and characterization of healthcare gaps based on triangulation of studies. *Cad Saude Publica*. 2021 May 28;37(5):e00076120.
- Oliver TI, Mutluoglu M. Diabetic Foot Ulcer. 2023 Aug 8. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.

- Ozgek Kangal MK, Regan JP. Wound Healing. 2023 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Nov;157:107843.
- Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol*. 2010 Nov;63(5):866-81.
- Soller EC, Tzeranis DS, Miu K, So PT, Yannas IV. Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. *Biomaterials*. 2012;33(19):4783-91.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42.
- Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 10;17(6):917.
- Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Wound Healing Phases. [Updated 2023 Jun 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.
- Wang G, Mechesso AF. Realistic and critical review of the state of systemic antimicrobial peptides. *ADMET DMPK*. 2022 Jan 20;10(2):91-105.
- Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018 Feb;81(2):94-101.
- Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. 2020 Sep;10(9):200223.
- Wu L, Norman G, Dumville JC, O'Meara S, Bell-Syer SE. Dressings for treating foot ulcers in people with diabetes: an overview of systematic reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jul 14;2015(7):CD010471.
- Yannas IV, Tzeranis DS, So PTC. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound Repair Regen*. 2017; 25(2):177-91.