

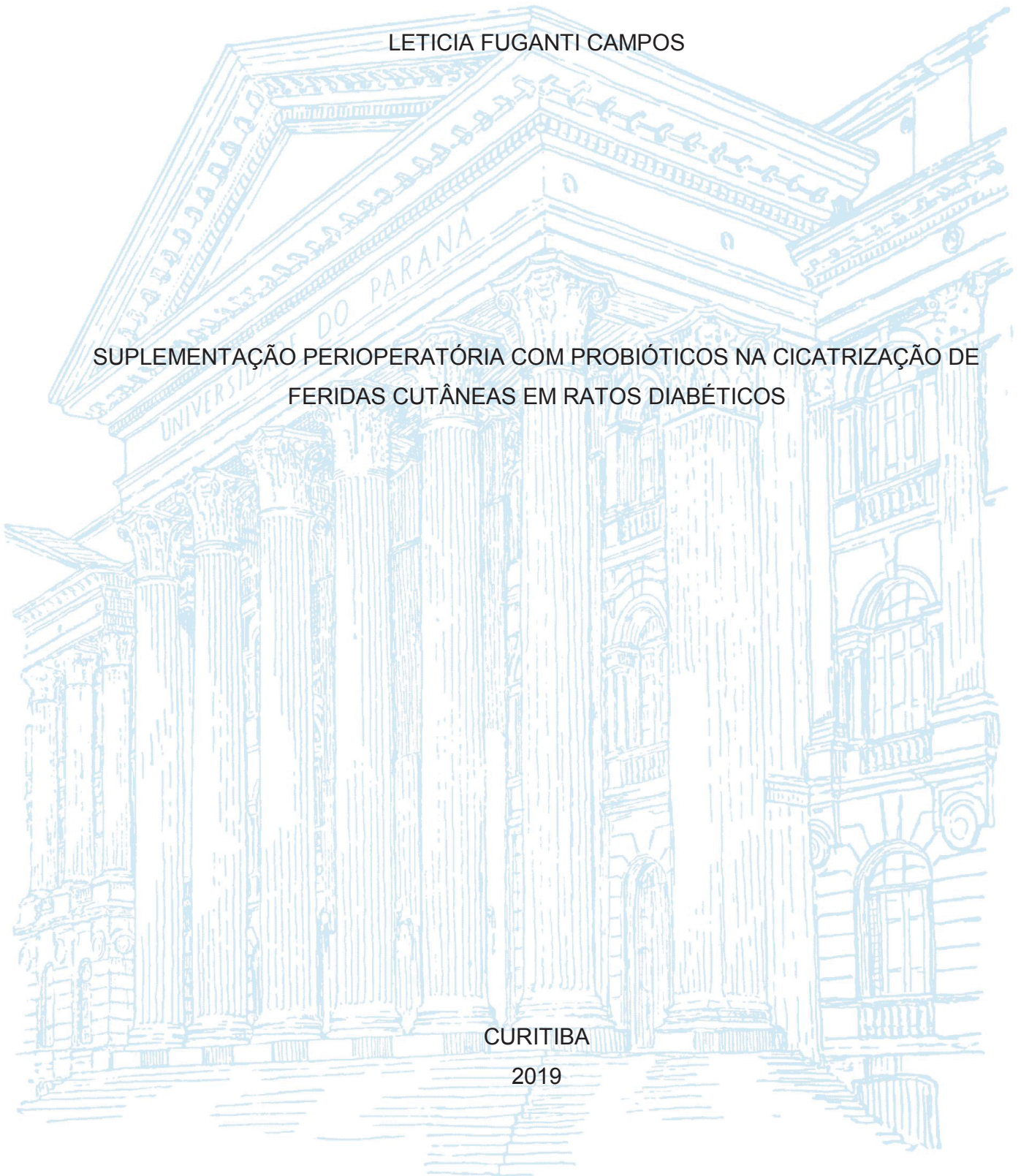
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA FUGANTI CAMPOS

SUPLEMENTAÇÃO PERIOPERATÓRIA COM PROBIÓTICOS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS

CURITIBA

2019



LETICIA FUGANTI CAMPOS

SUPLEMENTAÇÃO PERIOPERATÓRIA COM PROBIÓTICOS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial
para obtenção do Grau de Doutor em Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

Co-orientador: Prof^a. Dra. Thaís Andrade Costa
Casagrande

CURITIBA

2019

C198 Campos, Leticia Fuganti
Suplementação perioperatória com probióticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos [recurso eletrônico] / Leticia Fuganti Campos. - Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias
Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Andrade Costa Casagrande

1. Probióticos. 2. Cicatrização. 3. Diabetes Mellitus. 4. Aloxano. I. Matias, Jorge Eduardo Fouto. II. Casagrande, Thaís Andrade Costa. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

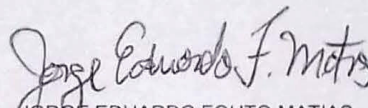
NLMC: QU 145.5

TERMO DE APROVAÇÃO

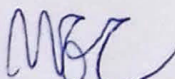
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LETICIA FUGANTI CAMPOS** intitulada: **SUPLEMENTAÇÃO PERIOPERATÓRIA COM PROBIÓTICOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS**, sob orientação do Prof. Dr. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

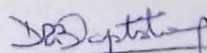
CURITIBA, 10 de Dezembro de 2019.



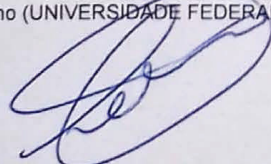
JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS
Presidente da Banca Examinadora



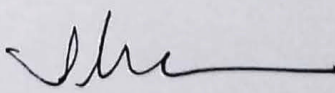
NICOLAU GREGORI CZECZKO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



DEISE REGINA BAPTISTA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



JULIO CEZAR UILI COELHO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



THAIS ANDRADE COSTA CASAGRANDE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias, por aceitar me orientar e por todo apoio e colaboração durante a execução deste estudo;

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Thaís Andrade Costa Casagrande, pela grande colaboração em toda a fase experimental deste estudo, com seu vasto conhecimento teórico e prático como médica-veterinária, e por permitir a realização da fase experimental deste estudo no Biotério da Universidade Positivo (UP);

Ao meu pai, Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, pelo fundamental incentivo em toda a minha vida acadêmica, pelo grande exemplo como profissional, e pelo inestimável auxílio e apoio durante todo desenvolvimento deste trabalho;

À minha mãe, Jussara, pelo fundamental incentivo e apoio e pela incansável ajuda com a minha filha Alice para que eu pudesse desenvolver este trabalho;

Ao meu marido, Juan Pablo, pelo apoio, carinho, compreensão nos momentos em que eu me ausentei para a realização deste estudo e pela ajuda com a nossa filha durante inúmeros momentos;

À minha filha Alice, minha maior inspiração, pelo carinho e por permitir e me acompanhar, ainda no ventre, na rotina da fase experimental deste trabalho;

À toda a minha família, em especial minha irmã Heloisa, doutoranda neste mesmo período. Obrigada por me motivar, me aconselhar e dividir comigo as emoções desta etapa;

À minha amiga, colega e doutoranda Eliane Tagliari, pela imensa colaboração durante toda esta pesquisa, em especial pela ajuda, apoio e companhia durante a fase experimental deste trabalho;

À patologista Prof. Dra Lucia de Noronha, por aceitar colaborar com este estudo, por permitir as análises patológicas no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e por toda contribuição científica para análise patológica deste trabalho;

À Universidade Positivo (UP) e toda a equipe do Biotério e do Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo, em especial à médica-veterinária Taíse Fuchs, pela fundamental colaboração na fase experimental

deste estudo, e à Sirlei, instrumentadora cirúrgica em todos os procedimentos experimentais;

À PUC-PR e toda a equipe do Laboratório de Patologia da PUC-PR, em especial o Seigo, Marina e Ana, sempre incansáveis e solícitos em ajudar em toda a análise patológica deste trabalho;

Ao Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) da Faculdade Evangélica do Paraná, por disponibilizar disciplinas de grande importância para a minha formação;

À FQM-FARMA, por fornecer os probióticos e pelo apoio financeiro parcial para a execução desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por possibilitar a realização desta minha importante etapa acadêmica;

A muitos outros que não foram citados nesta lista: amigos, colegas de trabalho e pacientes, pela compreensão nos momentos em que me ausentei e pelo apoio e motivação sempre que precisei.

RESUMO

Feridas crônicas em pacientes com Diabetes Mellitus (DM) muitas vezes se tornam incuráveis devido à produção prolongada e excessiva de citocinas inflamatórias. O eixo cérebro-intestino-pele propõe que a modulação da microbiota intestinal poderia melhorar a resposta imune sistêmica e influenciar respostas teciduais periféricas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação perioperatória com probióticos no processo de cicatrização cutânea em ratos diabéticos. 46 ratos foram divididos em 4 grupos (C3, P3, C10, P10) conforme tratamento recebido (P: Probiótico - Probiatop[®], 250mg/dia, via oral) ou controle (C: maltodextrina, 250mg/dia, via oral) e dia de eutanásia: 3^o ou 10^o pós operatório (PO). Todos os ratos foram induzidos ao DM 72 horas antes de iniciar o experimento com Aloxana (40mg/kg, via veia caudal). A suplementação foi iniciada 5 dias antes da cirurgia e mantida até a eutanásia. Foi realizada incisão com bisturi guiada por molde quadrado de 2x2cm e as feridas foram deixadas para cicatrizar por segunda intenção. As feridas foram medidas digitalmente para cálculo da área da ferida. A densitometria de colágeno foi feita com coloração *Picrosirius Red* e analisada com software Image-Pro-Plus 4.5. A histologia foi feita por coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) quantificando edema, congestão, polimorfonucleares, fibroblastos, neovasos e monócitos. O estudo imunoistoquímico foi por meio de blocos de *Tissue Microarray* para análise dos marcadores IL-6, IL-17 e TNF- α e TGF- β . A contração da ferida foi maior no grupo P10 quando comparado com o grupo C10, o que resultou em menor área cruenta (832 ± 187 vs $1092\pm 250\text{m}\mu^2$, $p=0,011$). Houve aumento do colágeno tipo I do 3^o para o 10^o dia de PO no grupo que recebeu probióticos ($p=0,016$), o que não ocorreu no grupo controle ($p=0,487$). A análise do escore histológico final por HE mostrou melhor grau de cicatrização no grupo P10 quando comparado com C10 (P10=3 vs. C10=0, $p=0,005$), com menos polimorfonucleares ($p<0,001$) e mais neovasos ($p=0,001$). A IL-17 foi mais baixa no P3 quando comparado ao C3 ($83,1\pm 75$ vs. $226,2\pm 162,9\text{m}\mu^2$, $p=0,020$). O TGF beta foi inferior no P3 quando comparado com o C3 (1448 ± 492 vs. $2178\pm 670\text{m}\mu^2$, $p=0,005$), e este valor se manteve entre o 3^o e o 10^o dia de PO ($p=0,143$), enquanto no grupo controle houve redução ($p=0,006$). Não houve diferença significativa para os demais parâmetros avaliados. A suplementação perioperatória de probióticos promove aceleração da cicatrização cutânea em ratos diabéticos, possivelmente por se associar a redução da IL-17 e polimorfonucleares e aumentar a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I.

Palavras-chave: Probióticos. Cicatrização. Diabetes mellitus. Aloxana.

ABSTRACT

Chronic wounds in patients with Diabetes Mellitus (DM) often become incurable due to prolonged and excessive production of inflammatory cytokines. The brain-gut-skin axis proposes that modulation of the intestinal microbiota might improve the systemic immune response and affect peripheral tissue responses. The aim of this study was to evaluate the influence of perioperative supplementation with probiotics in the cutaneous healing process in diabetic rats. 46 rats were divided into 4 groups (C3, P3, C10, P10) according to the treatment received (P: Probiotic - Probiatop®, 250mg/day, orally administered) or control (C: maltodextrin, 250mg/day, orally administered) and day of euthanasia: 3rd or 10th postoperative (PO). All rats were induced to DM 72 hours before starting the experiment with Alloxan (40mg per kg of body weight, through the caudal vein). Supplementation was initiated 5 days before the incision and maintained until the day of euthanasia. Scalpel incision was guided by a 2x2cm squared mold and the wounds were left to heal per second-intention. The wounds were digitally measured to calculate the wound area of the wound. Collagen densitometry was done with *Picrosirius Red* staining and analyzed with Image-Pro-Plus software 4.5. Histological parameters were analyzed by staining by Hematoxylin-Eosin (HE) and quantifying edema, congestion, polymorphonuclear, fibroblasts, neovascularization and monocytes. For the immunohistochemical study, *Tissue Microarray* blocks were made to analyze the markers IL-6, IL-17, TNF- α and TGF- β . The contraction of the wound was greater in the P10 group when compared to the C10 group, which resulted in a smaller scar area (832 ± 187 vs $1092\pm 250\mu\text{m}^2$, $p=0.011$). There was an increase in type I collagen deposition from the 3rd to the 10th PO day in the group receiving probiotics ($p=0.016$), which did not occur in the control group ($p=0.487$). The analysis of the final histological score by HE showed a better degree of healing in the P10 group when compared to C10 (P10=3 v. C10=0, $p=0.005$), with fewer polymorphonuclear ($p < 0.001$) and more neovascularization ($p=0.001$). IL-17 was lower in P3 when compared to C3 (83.1 ± 75 vs $226.2\pm 162.9\mu\text{m}^2$, $p=0.020$). TGF beta was lower in P3 when compared to C3 (1448 ± 492 vs $2178\pm 670\mu\text{m}^2$, $p=0.005$), and this value remained similar between the 3rd and 10th POs ($p=0.143$), whereas in the control group it decreased ($p=0.006$). There was no significant difference for the other parameters evaluated. Perioperative probiotic supplementation promotes acceleration of cutaneous wound healing in diabetic rats, possibly because it is associated with the reduction of IL-17 and polymorphonuclear cells and to increased neovascularization and deposition of type I collagen.

Key words: Probiotics. Healing. Diabetes mellitus. Alloxan.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C - Grupo Controle

C3 - Grupo Controle com eutanásia no 3º dia de pós operatório

C10 - Grupo Controle com eutanásia no 10º dia de pós operatório

CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DP - Desvio Padrão

DM - Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus Tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

GLP-1 - *Glucagon-like Peptide 1*

GLUT-4 - Transportador de Glicose 4

HE - Hematoxilina-Eosina

IL-17 - Interleucina 17

IL – 6 – Interleucina 6 (IL-6)

LPS - Lipopolisacarídeos

P - Grupo Probiótico

P3 - Grupo Probiótico com eutanásia no 3º dia de pós operatório

P10 - Grupo Probiótico com eutanásia no 10º dia de pós operatório

PO – Pós-Operatório

SCFAs ou AGCC - Short-chain fatty acids Ácidos - Graxos de Cadeia Curta

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.2	JUSTIFICATIVA.....	13
1.3	OBJETIVOS.....	14
1.3.1	Objetivo Geral.....	14
1.3.2	Objetivos Específicos.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	CICATRIZAÇÃO.....	15
2.1.1	Fase Inflamatória.....	15
2.1.2	Fase Proliferativa.....	16
2.1.3	Fase de Maturação ou Remodelamento.....	17
2.2	DIABETES MELLITUS.....	18
2.2.1	Diabetes Mellitus: Prevalência e Complicações.....	18
2.2.2	Diabetes Mellitus e Cicatrização.....	21
2.3	PROBIÓTICOS.....	22
2.3.1	Probióticos: Definições e Benefícios para o Hospedeiro.....	22
2.3.2	Probióticos e Cicatrização.....	23
2.3.3	Probióticos e Diabetes Mellitus.....	24
2.4	PROBIÓTICOS, CICATRIZAÇÃO E DIABETES MELLITUS.....	26
3	MATERIAL E MÉTODO	27
3.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	27
3.2	INDUÇÃO AO DIABETES MELLITUS.....	28
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	29
3.4	AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO DA FERIDA.....	30
3.5	EUTANÁSIA.....	30
3.6	DENSITOMETRIA DO COLÁGENO.....	31
3.7	ESTUDO HISTOLÓGICO POR COLORAÇÃO COM HE.....	31
3.8	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	35

4.1	ARTIGO 1	35
4.2	ARTIGO 2	54
5	CONCLUSÕES.....	66
5.1	CONCLUSÃO GERAL	66
5.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	66
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	77

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 425 milhões de adultos são portadores de Diabetes Mellitus (DM) no mundo, doença responsável por 4 milhões de mortes em 2017 e um gasto de mais de 727 bilhões de dólares para o sistema de saúde nos Estados Unidos (12% do gasto total com adultos) ("<https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>"). No Brasil, dados recentes avaliando diabéticos do tipo 2 mostram gasto de U\$ 197 dólares por paciente por ano (HENRIQUES et al., 2018). Com o aumento da prevalência de DM, a prevalência de feridas crônicas não cicatrizantes também apresentou aumento global nos últimos anos (SINGH, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011).

Pacientes diabéticos apresentam prejuízo na cicatrização pelo desequilíbrio da resposta inflamatória, com acúmulo prolongado de células inflamatórias e produção excessiva de citocinas inflamatórias, alteração na síntese de colágeno e redução da força tênsil (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; EL-BAHY; ABOULMAGD; ZAKI, 2018;). Estes fatores associados resultam em redução da resistência da ferida e deiscência que, associados ao aumento do risco de infecções neste grupo, resultam em aumento do tempo hospitalização e da taxa de mortalidade (SINGH, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; EL-BAHY; ABOULMAGD; ZAKI, 2018;).

A combinação do prejuízo no processo cicatricial com a doença vascular periférica e a dificuldade de percepção de lesões nas extremidades pela neuropatia são fatores de risco para o desenvolvimento da doença do pé diabético (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; CARRO et al., 2018). A úlcera em pé diabético é uma complicação grave e extremamente prevalente em pacientes diabéticos (FALANGA, 2005; SINGH, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011), sendo considerada a principal causa de hospitalização de pacientes com DM em países desenvolvidos e entre as principais causas de morbi mortalidade (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; CARRO et al., 2018). O atraso na cicatrização está entre as principais dificuldades no tratamento do pé diabético (OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; TELLECHEA et al., 2016), com tempo médio de 6 meses para cicatrização e necessidade de amputação em até um terço dos

casos. Estima-se que cerca de 25% dos pacientes diabéticos estão em risco de desenvolver úlcera em pé diabético ao longo da vida, e esta complicação ainda carece de estudos que envolvam a complexidade da sua gestão (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; EL-BAHY; ABOULMAGD; ZAKI, 2018; CARRO et al., 2018).

A cicatrização cutânea se caracteriza por processo dinâmico que envolve uma rede complexa de interações extracelulares, mediadores químicos e células locais e inflamatórias. Este processo tem como objetivos principais a restauração da integridade tecidual e a manutenção da homeostasia. O processo de cicatrização envolve três fases, que se relacionam de maneira dinâmica e não individualizadas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação ou remodelamento (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH 2007; REINKE; SORG 2012; SORG et al., 2017).

Feridas crônicas em pacientes com DM muitas vezes não seguem esta progressão ordenada, podendo persistir na fase inflamatória e não progredir para as próximas fases da cicatrização de feridas. A transição do estágio inflamatório para o proliferativo na cicatrização de feridas é tema de inúmeras pesquisas atuais, e a regulação sistêmica da inflamação desempenha papel importante nesta etapa (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; DINH et al., 2012; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; TELLECHEA et al., 2016; SORG et al., 2017; MOHSENI et al., 2018).

A relação entre o processo de cicatrização e a interação com a microbiota da pele já está bem estabelecida e já foi demonstrado que a microbiota local da pele pode fornecer estimulação tônica benéfica ao sistema imunológico do hospedeiro e impedir a invasão de outros microrganismos patogênicos. A redução da diversidade microbiana muitas vezes resulta em inflamação prolongada e atraso no processo de cicatrização de feridas (JOHNSON et al., 2018). Ainda existe muita discrepância na literatura em definir quais são as citocinas essenciais para a cicatrização e a contração de feridas e quais podem ser prejudiciais para o processo (GOREN et al., 2007; LEE et al., 2018). Entretanto, modular a inflamação durante a fase inflamatória da cicatrização parece ser fundamental para o sucesso do processo cicatricial (LEE et al., 2018).

Estudos recentes sugerem que, além da interação com a microbiota local da pele, alterações na microbiota intestinal também podem afetar positivamente ou

negativamente o processo de cicatrização de feridas, pela produção de moléculas antimicrobianas e pela regulação da resposta imune e inflamatória (ARCK et al., 2010; SASAKI; ZHANG; SCHWACHA, 2011; SORG et al., 2017; TSIOURIS et al., 2017). O eixo proposto por Arck et al como “eixo cérebro-intestino-pele” propõe que a modulação da microbiota intestinal pode melhorar a resposta imune sistêmica e afetar respostas teciduais periféricas (ARCK et al., 2010).

Neste sentido, modular a flora intestinal pode ser ferramenta importante para a melhora do processo cicatricial. As estratégias para a modulação da microbiota intestinal são os prebióticos, probióticos, simbióticos e o transplante de fezes, além de alterações dietéticas (FLESCH; POZIOMYCK; DAMIN, 2014; LUKIC et al., 2017).

O provável elo entre o uso de probióticos e a cicatrização é na modulação da inflamação, que pode ter efeitos positivos, protetores ou negativos na reparação de tecidos.

1.2 JUSTIFICATIVA

Considerando os benefícios que os probióticos podem exercer ao modular a resposta inflamatória sistêmica, com possível contribuição ao processo cicatricial, faz-se necessário avaliar os efeitos da suplementação perioperatória com probióticos na cicatrização no estado diabético.

Existem indícios de melhora do processo de cicatrização com a modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, mas os trabalhos são escassos e as vias de mecanismo não estão bem determinadas. Assim, há a necessidade de novos estudos que avaliem os efeitos da suplementação com probióticos sobre o reparo tecidual em diabéticos.

Até o presente momento não foi identificado nenhum estudo que tenha avaliado os efeitos da suplementação de probióticos no processo cicatricial cutâneo em ratos diabéticos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da suplementação perioperatória de probióticos no processo de cicatrização cutânea em ratos diabéticos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar macroscopicamente o processo cicatricial por contração das feridas excisionais nos dias 3, 7 e 10 de pós operatório;
- Avaliar a densitometria do colágeno neoformado, tipo I e tipo III nos dias 3 e 10 do pós operatório;
- Avaliar histologicamente, com coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), parâmetros histológicos agudos e crônicos e o grau de cicatrização nos dias 3 e 10 do pós operatório;
- Avaliar as alterações teciduais com estudo imunoistoquímico com os marcadores de Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-17 (IL-17), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β) nos dias 3 e 10 do pós operatório.

- Avaliar a evolução do peso e da glicemia dos ratos nos dias 3, 7 e 10 do pós operatório;
- Correlacionar o peso e glicemia dos ratos com os demais fatores avaliados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO

A habilidade dos organismos em regenerar tecidos para reparar as funções orgânicas tem sido descrita como uma das vantagens seletivas para sobrevivência na natureza. O processo de cicatrização e regeneração pode ocorrer em todas as partes do corpo humano. Na pele, a lesão da barreira epitelial resulta em ruptura e estresse celular, com necessidade de reparo mediante a cicatrização independentemente do agente que a causou. A cicatrização cutânea se caracteriza por processo dinâmico e coordenado que tem como objetivo principal a restauração da integridade tecidual e manutenção da homeostasia (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SALGADO; ARTIGIANI-NETO; LOPES-FILHO, 2016).

O processo de cicatrização foi descrito primeiramente por Carrel em 1910 (CARREL, 1910) e posteriormente o mesmo foi dividido três fases, sequenciais, e que se relacionam de maneira dinâmica e não individualizada: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação ou remodelamento. Estas podem ser subdivididas em cinco fases: fase inflamatória, fase proliferativa, fase de formação do tecido conjuntivo, fase de contração e fase de remodelamento (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SALGADO; ARTIGIANI-NETO; LOPES-FILHO, 2016).

2.1.1 Fase Inflamatória

A fase inflamatória se inicia imediatamente após a ruptura da barreira epitelial, com liberação de substâncias que estimulam a vasoconstrição. A vasoconstrição é seguida por vasodilatação, onde os trombócitos invadem a matriz, e o endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, com liberação de grânulos que atraem neutrófilos. As plaquetas iniciam a liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento para ativar a fase inflamatória. A vasodilatação pode ser reconhecida pela coloração vermelha e edema no local da lesão (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH 2007; PERAL et al., 2010).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração nas primeiras 24 horas após a lesão. Os neutrófilos são fundamentais para esterilização microbiana e remoção de compostos estranhos e degradação de tecido necrótico. Na sequência, ocorre regressão dos neutrófilos, quando a fase inflamatória é finalizada. Os neutrófilos são mediadores de diversas citocinas inflamatórias, incluindo o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e a Interleucina-6 (IL-6). Se os neutrófilos persistirem nos tecidos da lesão pode haver produção excessiva de citocinas inflamatórias, o que torna a cicatriz refratária (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; PERAL et al., 2010; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

Os macrófagos migram para a ferida entre 24-96 horas após a lesão, e têm papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos, na fagocitose de patógenos e na secreção de citocinas e fatores de crescimento. Ainda, os macrófagos são fundamentais para resolução da inflamação e para angiogênese, portanto para a transição para a fase proliferativa. Sem a presença de macrófagos há redução da formação de tecido de granulação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; SORG et al., 2017).

2.1.2 Fase Proliferativa

Esta fase dura entre 3 a 10 dias após a lesão, podendo estender até o término da segunda semana. O início da fase proliferativa depende da duração da fase inflamatória, sendo que em feridas grandes, profundas e contaminadas ou infectadas esta fase tende a durar mais. A fase proliferativa é constituída por 3 fases: reepitelização, angiogênese e formação de tecido de granulação (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

O processo de reepitelização ocorre precocemente, e é assegurado pelos queratinócitos locais nas bordas da ferida e pelas células tronco epiteliais dos folículos capilares ou glândulas sudoríparas. Se a membrana basal estiver intacta, as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Entretanto, se a membrana basal for lesada, as células das bordas da ferida começam a proliferar para restabelecer a barreira

protetora. O foco principal nesta fase é cobrir a superfície da cicatriz (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

A angiogênese é estimulada pelo TNF- α e é essencial para o processo de reepitelização adequada para garantir oferta de nutrientes, células imunológicas e oxigênio. A angiogênese é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares. O crescimento capilar rápido e robusto cria um leito vascular com mais capilares que o tecido normal (REINKE; SORG, 2012; DIPIETRO, 2016).

A formação do tecido de granulação é fundamental para finalizar a fase proliferativa, ao mesmo tempo que a fase de remodelamento se inicia. O tecido de granulação é composto por macrófagos, fibroblastos, neovasos e uma matriz de colágeno do tipo I, glicoproteínas e ácido hialurônico (SORG et al., 2017). O Fator de Crescimento Beta (TGF- β) estimula a produção de fibroblastos, que são as células dominantes desta fase, e que estimulam a produção de colágeno tipo III, promovendo a contração da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

2.1.3 Fase de Maturação ou Remodelamento

A formação da cicatriz marca o fim do processo de cicatrização, e ocorre em torno do 21º dia até um ano após a lesão. Esta fase resulta na substituição do tecido original por uma cicatriz, com deposição de colágeno tipo I ou maduro de maneira organizada, caracterizando um tecido não vascularizado e acelular. O colágeno produzido inicialmente é o colágeno do tipo III, que é mais fino que o presente na pele normal. Este colágeno é substituído pelo colágeno do tipo I, mais espesso e fundamental para aumentar a força tênsil da ferida, se aproximando da composição da derme saudável. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio e organização de colágeno, mas mesmo após um ano a ferida apresenta colágeno menos organizado que o da pele saudável. A cicatriz inicial tem coloração avermelhada pela grande densidade capilar, mas quando o fechamento é concluído os capilares regredem até que relativamente poucos permaneçam, resultando em cicatrizes hipopigmentadas após a maturação (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

Feridas crônicas são definidas como uma lesão que não obedece a ordem e o tempo de reparação para conseguir recuperar sua estrutura e funcionalidade integralmente (KIRITSI; NYSTRÖM, 2018). Muitas vezes estas feridas não cicatrizadas se mantêm em estado inflamatório crônico. Por outro lado, a resposta inflamatória excessiva durante a cicatrização pode resultar também em perda do controle normal entre síntese e degradação de colágeno, e pode resultar em queloides e cicatrizes hipertróficas. Estas condições ocorrem quase exclusivamente em humanos, sendo muito raro o seu aparecimento em outras espécies (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012; SORG et al., 2017).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido cognitivo, vasos e pele, e corresponde a até 80% do peso seco da derme. O colágeno é produzido principalmente pelos fibroblastos, e já foram identificados até o momento 19 tipos, com diversas diferenças em sua composição química e função biológica. Dentro da camada dérmica, o colágeno tipo I representa de 80-85%, com 10% do colágeno tipo III e traços de colágenos tipo IV, V, VI e VII. O colágeno está envolvido direta ou indiretamente em todas as fases do processo de cicatrização de feridas (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; GOULDING, 2015).

2.2 DIABETES MELLITUS

2.2.1 Diabetes Mellitus: Prevalência e Complicações

A prevalência de DM no mundo vem aumentando de maneira progressiva e alarmante nos últimos anos. O aumento da incidência está relacionado a diversos fatores, entre estes a maior prevalência de sobrepeso e obesidade, o estilo de vida sedentário, o crescimento e envelhecimento populacional e também o aumento da sobrevida em diabéticos. Atualmente existem aproximadamente 425 milhões de diabéticos no mundo. O Brasil ocupa a quarta posição na relação entre os países com maior número com DM no mundo, com prevalência de 14,3 milhões de diabéticos em 2015 e projeção de atingir 23,3 milhões em 2040 (<https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/factsfigures.html>; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017-

2018).

A hiperglicemia é o terceiro fator em importância de causa de mortalidade prematura, superada apenas pela hipertensão arterial sistêmica e pelo uso de tabaco. O DM e suas complicações resultaram em quase 5 milhões de mortes em 2015, o equivalente a um óbito a cada 6 segundos. As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbito entre os diabéticos, equivalendo a cerca de metade dos óbitos (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017-2018; ZHENG; LEY; HU, 2018).

A maioria dos países despende entre 5 a 20% do seu gasto em saúde com DM. Nos Estados Unidos, o DM representa um gasto de mais de 727 bilhões de dólares para o sistema de saúde (12% do gasto total com adultos) (<https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017-2018). No Brasil, dados recentes avaliando diabéticos do tipo 2 mostram gasto de U\$ 197 dólares por paciente por ano (HENRIQUES et al., 2018).

As complicações crônicas do DM são tradicionalmente divididas em macrovasculares, que incluem as doenças cardiovasculares (doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica) e as microvasculares, como a retinopatia, nefropatia e neuropatia. Estas complicações são extremamente prevalentes: cerca de metade dos portadores de DM2 apresenta complicações macrovasculares e cerca de um terço apresenta complicações microvasculares. Ainda, o DM tem sido associado também com outras inúmeras doenças, por contribuir para o agravamento direta ou indiretamente, como em doenças musculoesqueléticas, do sistema digestivo, de função cognitiva e diversos tipos de câncer (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2017-2018; ZHENG; LEY; HU, 2018).

Pacientes diabéticos são frequentemente submetidos a procedimentos cirúrgicos por complicações crônicas decorrentes da hiperglicemia, e apresentam maior risco de complicações pós-operatórias pela dificuldade de cicatrização (CAMPOS; POLESEL; CAMPOS, 2012; KIRITSI; NYSTRÖM 2018). Feridas dérmicas facilmente cicatrizadas em pacientes saudáveis podem evoluir para úlceras de difícil cicatrização em diabéticos, que são o principal contribuinte para amputação de membros inferiores nestes indivíduos (FALANGA, 2005; PEPPA; STAVROULAKIS; RAPTIS, 2009; DINH et al., 2012;

OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; SALAZAR; ENNIS; KOH, 2016; CARRO et al., 2018; JOHNSON et al., 2018).

Úlcera em pé diabético é a consequência também da neuropatia, pela dificuldade de percepção de lesões nas extremidade, e/ou doença vascular periférica. A úlcera em pé diabético é a principal causa de hospitalização de pacientes com DM em países desenvolvidos, e está entre as principais causas de morbi mortalidade, com tempo médio de 6 meses para a cicatrização e necessidade de amputação em até um terço dos casos (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; EL-BAHY; ABOULMAGD; ZAKI, 2018; CARRO et al., 2018).

Em uma publicação nacional, a incidência de amputações de membros inferiores na região metropolitana do Rio de Janeiro foi de 13,9 por 100 mil habitantes para a população geral e de 180,6 por 100 mil habitantes em diabéticos, o que representa uma taxa 13 vezes maior (SPICHLER et al., 2001).

O diagnóstico e o tratamento precoce em indivíduos com risco de desenvolver úlcera em pé diabético podem retardar ou prevenir desfechos adversos. Os indivíduos com maior risco de desenvolver úlcera em pé diabético ou necessitar amputação são, entre outros, os seguintes: controle glicêmico insatisfatório, neuropatia periférica com perda da sensibilidade periférica, fumantes, portadores de deformidades em pé, calo prévio, doença arterial periférica, comprometimento visual e pacientes com nefropatia diabética (American Diabetes Associations: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019).

A maioria das infecções em pé diabético são causadas por mais de um microrganismo, e geralmente estão associadas com bactérias aeróbicas gram-positivas como *staphylococci* e *streptococci*. A antibioticoterapia empírica pode ser direcionada estritamente a estes microrganismos, mas os pacientes em risco de infecção por organismos resistentes a antibióticos ou com infecções crônicas requerem regime de amplo espectro (American Diabetes Associations: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019).

2.2.2 Diabetes Mellitus e Cicatrização

Pacientes diabéticos apresentam prejuízo na cicatrização e apresentam maior risco de complicações no processo cicatricial (FALANGA, 2005; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; CARRO et al., 2018). A pele de portadores de DM tem propriedades biomecânicas inferiores, com maior rigidez e menor flexibilidade, o que aumenta o risco de lesões. Ainda, o DM parece alterar o metabolismo de colágeno, resultando em desequilíbrio na síntese e degradação deste. Além disso, o acúmulo dérmico de Produtos de Glicação Avançada, conhecidos como AGEs, parece ser uma causa potencial subjacente (PEPPA; STAVROULAKIS; RAPTIS, 2009; GOULDING, 2015).

A hiperglicemia parece afetar também a função dos polimorfonucleares, tanto em quantidades quanto em duração, contribuindo para o prolongamento da fase inflamatória (GOULDING, 2015). Análise de biópsia de pele de pacientes diabéticos em estudo prévio mostrou maior infiltração de células imunes quando comparados com indivíduos saudáveis, e este aumento da inflamação foi associado à falha na cicatrização em pacientes com DM (PERAL et al., 2010).

O desequilíbrio da resposta inflamatória parece ser um dos principais mecanismos associados ao prejuízo da cicatrização em indivíduos com DM. O acúmulo prolongado de células inflamatórias e a produção excessiva de citocinas inflamatórias faz com que os pacientes diabéticos apresentem prolongamento da fase inflamatória, não conseguindo progredir para as próximas fases do processo da cicatrização, o que retarda a síntese de colágeno e resulta em redução da força tênsil (FALANGA, 2005; DINH et al., 2012; OVIEDO-SOCARRÁS et al., 2014; ROSADO et al., 2015; SALAZAR; ENNIS; KOH, 2016; CARRO et al., 2018; JOHNSON et al., 2018). O retardo na cicatrização em pacientes diabéticos é uma das principais dificuldades no tratamento da úlcera em pé diabético (FALANGA, 2005; MOHSENI et al., 2018).

É importante destacar que todos os fatores descritos associados resultam em redução da resistência da ferida e aumento de deiscência que, somados ao grande risco de infecções neste grupo, resultam em aumento do tempo hospitalização e da taxa de mortalidade (FALANGA, 2005; LEPÄNTALO et al., 2011; ROSADO et al., 2015; CARRO

et al., 2018).

A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa na cicatrização é tema de inúmeras pesquisas atuais, e a regulação sistêmica da inflamação desempenha papel importante nesta etapa. O controle glicêmico evita que as feridas permaneçam no estágio inflamatório da cicatrização e promove a cicatrização de feridas por meio da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, da regulação negativa de fatores de crescimento, do estímulo da angiogênese e do aumento da epitelização (SALAZAR; ENNIS; KOH, 2016).

2.3 PROBIÓTICOS

2.3.1 Probióticos: Definições e Benefícios para o Hospedeiro

A microbiota intestinal começa a ser colonizada logo após o nascimento, é altamente diversificada entre os indivíduos e tende a permanecer estável ao longo de toda vida, com grande impacto em múltiplas funções fisiológicas. Mudanças no equilíbrio da microbiota intestinal e na sua diversidade podem desencadear doenças no sistema gastrointestinal e sistêmicas. Devido aos inúmeros efeitos locais e sistêmicos da microbiota intestinal, as abordagens que objetivam manipular a sua composição atingiram crescente importância nos últimos anos. Os tratamentos disponíveis para modulação da microbiota intestinal são os prebióticos, probióticos, simbióticos, manipulações dietéticas e transplante fecal (HO; CHAN; LI, 2015; LUKIC et al., 2017).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde. Estes microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos. No Brasil, o uso de probióticos requer prévia avaliação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa no 21, de 27 de julho de 2018. A avaliação da Anvisa contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2017).

As linhagens incluídas na lista de probióticos autorizados para o uso em suplementos pela Anvisa, por atenderem aos critérios avaliados, são: *Bacillus coagulans* GBI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus helveticus* R0052, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus rhamnosus* LR-32, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 e *Lactococcus lactis* LL-23 (ANVISA, 2017).

Os probióticos são considerados benéficos para a prevenção e tratamento de diversas doenças, como: doenças gastrointestinais (WILKINS; SEQUOIA, 2017), câncer (NAGANO et al., 2019), diabetes mellitus (KOUTNIKOVA et al., 2019), obesidade (BORGERAAS et al., 2018), infecções do trato respiratório (HOJSAK et al., 2010) e urogenital (HANSON et al., 2016) e condições cutâneas inflamatórias (HACINI-RACHINEL et al., 2009).

Diversos mecanismos pelos quais os probióticos conferem efeitos benéficos para o hospedeiro foram previamente comprovados, incluindo efeitos diretos de competição com bactérias patogênicas por nutrientes e locais de ligação, além da produção de substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, inativação de toxinas e metabólitos e modulação da resposta imune do hospedeiro. Alguns lactobacilos exibem atividade anti-inflamatória e imunossupressora, enquanto outros podem ter efeito pró inflamatório desejável e promover estimulação da resposta imune à patógenos (LUKIC et al., 2017).

2.3.2 Probióticos e Cicatrização

A microbiota parece exercer papel importante no processo de cicatrização. Estudo prévio demonstrou que a microbiota local da pele pode fornecer estimulação tônica benéfica ao sistema imunológico do hospedeiro e impedir a invasão de outros microrganismos patogênicos. Ainda, a redução da carga microbiana pode resultar em inflamação prolongada e atraso no processo de cicatrização de feridas (JOHNSON et al., 2018).

O eixo proposto por Arck et al como “eixo cérebro-intestino-pele” propõe que a

modulação da microbiota intestinal pode ter influência também na pele, com efeitos positivos ou negativos pela produção de moléculas antimicrobianas e pela regulação da resposta imune e inflamatória (ARCK et al., 2010).

Neste sentido, a suplementação com probióticos via oral em doenças que associam a microbiota intestinal com a pele já foi previamente estudada, com evidentes benefícios (ARCK et al., 2010; SASAKI; ZHANG; SCHWACHA 2011; SORG et al., 2017; TSIOURIS et al., 2017). Os lactobacilos e as bifidobactérias são os probióticos mais investigados como potenciais tratamentos para diversas doenças dermatológicas, incluindo os defeitos na cicatrização cutânea (BAQUERIZO NOLE; YIM; KERI, 2014).

A utilização de bifidobactérias e lactobacilos se mostrou benéfica na prevenção e tratamento de dermatite atópica em revisão sistemática prévia (MICHAIL et al., 2008). A suplementação com *Lactobacillus johnsonii* em 54 voluntários acelerou a recuperação da imunidade e a homeostase da pele após imunossupressão induzida por irradiação UV (GUÉNICHE et al., 2006).

Alguns estudos experimentais prévios mostraram benefícios na utilização de prebiótico ou probióticos também na cicatrização: Huseini et al mostraram que o uso de produtos com Kefir, que podem ser considerados probióticos, foi capaz de melhorar a cicatrização de queimaduras em ratos (HUSEINI et al., 2012). Além disso, as células de úlcera coletadas após o tratamento com *Lactobacillus plantarum* por 10 dias apresentaram menor carga bacteriana na ferida, além de indução de cicatrização de feridas (PERAL et al., 2010).

2.3.3 Probióticos e Diabetes Mellitus

A microbiota intestinal de indivíduos com DM apresenta diferenças quando comparada com a microbiota de não diabéticos. A composição da microbiota intestinal pode influenciar na extração de energia dos alimentos ingeridos, na permeabilidade intestinal a lipopolissacarídeos e conseqüentemente na inflamação sistêmica, no tempo de trânsito intestinal e na formação de ácidos graxos de cadeia curta, fundamentais para produção de GLP-1 (*Glucagon-like Peptide 1*). Todos estes fatores foram destacados como desencadeantes no desenvolvimento e progressão do DM2 e suas complicações

(LAZAR et al., 2019). Análises do estudo TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*), com amostras fecais de 783 crianças, mostraram efeito protetor dos ácidos graxos de cadeia curta também no desenvolvimento de DM1 (VATANEN et al., 2018).

A modulação da microbiota intestinal em indivíduos com DM pode favorecer a colonização por *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Prevotella* sp e reduzir a colonização por *Clostridium* sp, o que pode melhorar o controle glicêmico e reduzir a inflamação (LAZAR et al., 2019).

Os potenciais mecanismos de ação dos probióticos no controle glicêmico são: (1) os efeitos intraluminais e diretos na mucosa, com aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução da permeabilidade intestinal, redução da absorção de lipopolissacarídeos (LPS) e aumento da produção de GLP-1; (2) efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores com redução de citocinas pró-inflamatórias; (3) redução do estresse oxidativo com efeito protetor de células beta; (4) efeitos na expressão de genes envolvidos na homeostase da glicemia e na resistência à insulina, com aumento da sensibilidade via GLUT-4 (MIRAGHAJANI et al., 2017).

Diversas meta-análises comprovaram que os probióticos podem favorecer o controle glicêmico em diabéticos, além de contribuir para o controle de outros fatores de risco metabólicos, como controle lipídico, e que esta pode ser considerada mais uma estratégia de tratamento para o DM2 (LI et al., 2016; FIROUZI et al. 2017; KIM; KEOGH; CLIFTON, 2018; KOUTNIKOVA et al., 2019). O efeito protetor dos probióticos no controle glicêmico parece ser mais importante quando a suplementação é com mais de 3 cepas (KOUTNIKOVA et al., 2019) e em diabéticos não obesos (FIROUZI et al., 2017).

Com relação ao DM1, estudo experimental em ratos não obesos mostrou que a administração precoce (a partir de 4 semanas de vida) de probióticos induziu a produção de IL-10 e preveniu diabetes autoimune. Neste estudo, os autores observaram redução da destruição de célula beta. As cepas utilizadas neste estudo foram (*B. longum*, *B. infantis* and *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *L. bulgaricus* and *L. plantarum* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), e a suplementação foi via gavagem, 3 vezes por semana, entre a 4^a e a 32^a semanas de vida dos ratos. Os ratos utilizados neste estudo foram NOD (Non-Obese Diabetic), modelo que desenvolve

espontaneamente DM e mimetiza o aparecimento da doença em humanos (CALCINARO et al., 2005).

2.4 PROBIÓTICOS, CICATRIZAÇÃO E DIABETES MELLITUS

Não foi identificado até o momento estudo experimental que tenha avaliado o efeito da suplementação de probióticos na cicatrização em ratos induzidos ao DM. Em estudo clínico com pacientes portadores de úlcera em pé diabético a utilização de probióticos por 12 semanas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus Fermentum* and *Bifidobacterium bifidum* (2×10^9 UFC/g cada) se associou a redução da área de úlcera em pé diabético, além de melhorar o controle glicêmico (MOHSENI et al., 2018). Este estudo, entretanto, não elucidou os mecanismos de ação dos probióticos administrados por via oral na cicatrização cutânea.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

O projeto foi conduzido de acordo as normas previstas na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) após aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo, onde o experimento foi realizado.

Foram utilizados 46 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia), adultos, machos. Os ratos foram distribuídos em dois grupos: Probióticos (P) que receberam Probiatop® e Controle (C), que receberam maltodextrina, por via oral, com auxílio de uma espátula, na dose de 250mg de probiótico ou maltodextrina por dia. Cada grupo foi subdividido em dois grupos de acordo com o dia de eutanásia: 3° ou 10° PO (subgrupos P3=12 ratos, C3=12 ratos, P10= 11, C10=11 ratos).

Durante o período experimental os ratos foram mantidos sob temperatura ambiente controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e 12 horas escuro/ciclos de luz, com água e ração Presence® (Purina) *ad libitum*.

Os grupos receberam probiótico ou maltodextrina por 5 dias antes da realização da incisão e mantiveram este consumo até o dia da eutanásia. O probiótico ou maltodextrina foi ofertado via oral, com auxílio de uma espátula. Após abertura da cápsula com a dosagem exata de cada produto, o pó foi misturado com uma pequena quantidade de requeijão, para facilitar manipulação do produto e aceitação (Figura 1).

O probiótico ofertado foi o Probiatop®, composto pelas cepas (doses 1×10^9 UFC/g) *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Os ratos foram pesados antes da indução do DM, no dia da cirurgia e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório, com balança eletrônica (AM 5500® Marte, São Paulo, SP).

FIGURA 1: RATO CONSUMINDO PROBIÓTICO POR VIA ORAL COM AUXÍLIO DE ESPÁTULA (PÓ MISTURADO COM REQUEIJÃO CREMOSO)



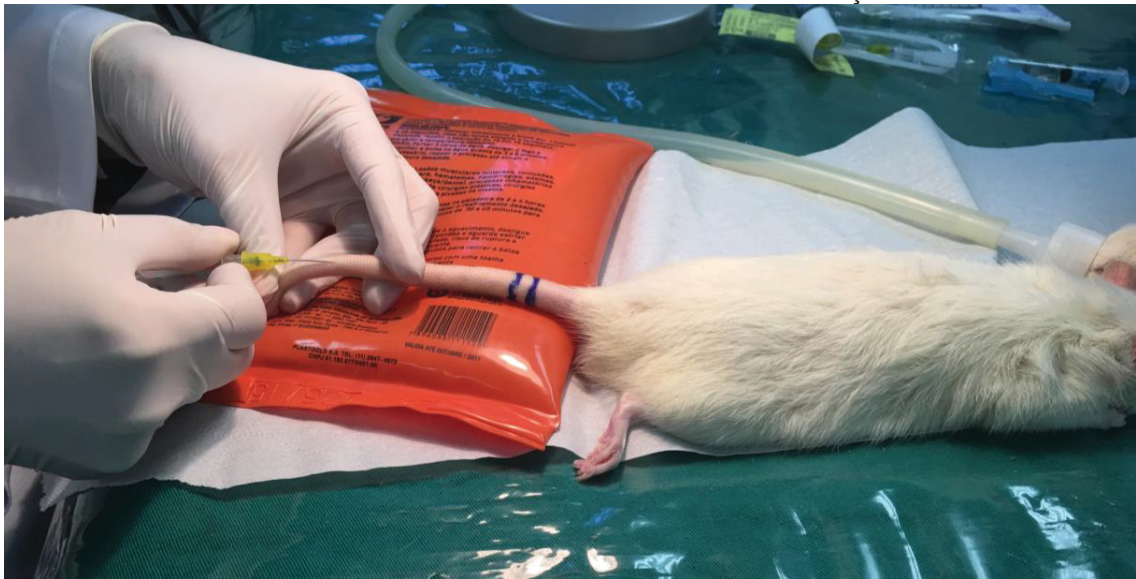
Fonte: A autora (2019)

3.2 INDUÇÃO AO DIABETES MELLITUS

Os ratos foram induzidos ao diabetes 72 horas antes de se iniciar a suplementação pré-operatória com probiótico ou placebo (8 dias antes do procedimento cirúrgico). Após 16 horas de jejum, os ratos foram submetidos a anestesia por inalação de isoflurano em campânula de vidro e depois mantidos em decúbito para receber injeção via veia caudal (Figura 2). A aloxana foi diluída em água destilada e aplicada em dose única de 40mg/kg (LUCCHESI; CASSETTARI; SPADELLA, 2015). Após 1h30min a alimentação foi reintroduzida. O DM foi confirmado após 48 horas da indução, sendo que

glicemia de jejum $>200\text{mg/dL}$ foi padronizada para o diagnóstico. Os níveis de glicose foram avaliados retirando uma gota de sangue mediante secção e ordenha da cauda, que foi colocada sobre fita reagente e avaliada pelo glicosímetro One Touch Select Simple[®] (Johnson e Johnson, Brasil). As glicemias foram avaliadas nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório.

FIGURA 2: INDUÇÃO AO DIABETES MELLITUS COM ALOXANA VIA VEIA CAUDAL COM AUXÍLIO DE BOLSA TÉRMICA PARA VACILITAR VASODILAÇÃO

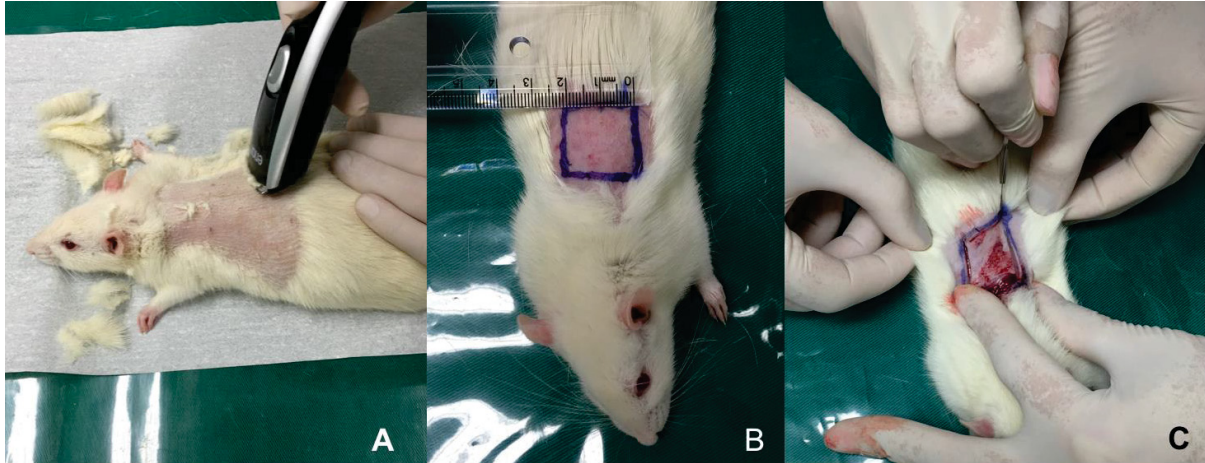


Fonte: A autora (2019)

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No dia da cirurgia os ratos foram anestesiados por inalação de isoflurano em campânula de vidro e pré-medicados com morfina na dose 4mg/kg IM. Foi realizada a tricotomia da região dorsal e antisepsia e em seguida incisão com bisturi guiada por um molde quadrado de $2\text{x}2\text{ cm}$, ressecando toda a espessura da pele e expondo a fáscia muscular dorsal (Figura 3). As feridas foram deixadas abertas para cicatrizar por segunda intenção. A analgesia foi realizada com uso de acetaminofeno líquido em dose diária de 200mg/kg por via oral, diluída na água ofertada, até o 4^o dia de pós-operatório.

FIGURA 3: A: TRICOTOMIA DA REGIÃO DORSAL, B: MOLDE QUADRADO 2X2CM, C: INCISÃO COM BISTURI



Fonte: A autora (2019)

3.4 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO DA FERIDA

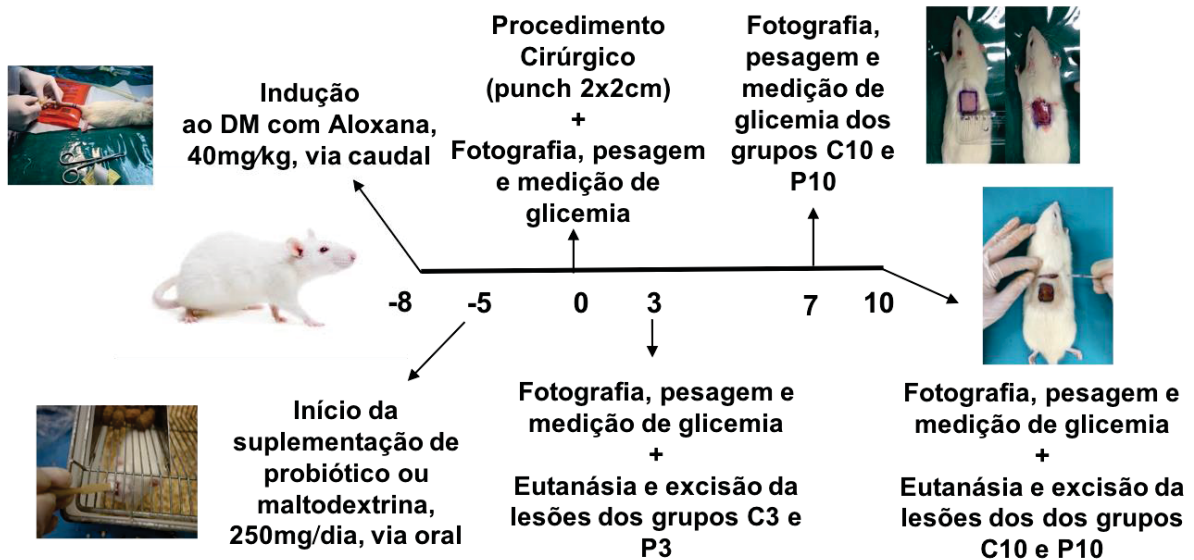
As feridas foram macroscopicamente avaliadas por fotografias digitais realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 para análise das taxas de contração da ferida com *software* Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA). As feridas foram fotografadas a uma distância padronizada de 15cm com máquina fotográfica grande-angular de 12 megapixel.

3.5 EUTANÁSIA

No 3º (Grupos C3 e P3) e 10º dia (Grupos C10 e P10) de pós-operatório os ratos foram submetidos à eutanásia em sistema fechado de campânula de vidro com isoflurano em dose letal. Após a constatação do óbito, a ferida foi excisada com margem de 1cm.

O resumo do modelo experimental pode ser observado na figura 4.

FIGURA 4: RESUMO DO MODELO EXPERIMENTAL



Fonte: A autora (2019)

3.6 DENSITOMETRIA DO COLÁGENO

A densitometria do colágeno foi realizada para identificar e quantificar o colágeno tipo I e tipo III utilizando a coloração de Picosirius Red *F3BA* (PSR), microscopia ótica sob luz polarizada e análise de imagens em *software* específico. As imagens foram registradas pelos Software AxioVision 4.9 (Zeiss, Alemanha) e analisadas pelo software Image-Pro Plus® 4.5; (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA).

3.7 ESTUDO HISTOLÓGICO POR COLORAÇÃO COM HE

As amostras foram cortadas em blocos em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura, e submetidos à coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)(Figura 5). Em seguida, as peças foram submetidas aos processos de desidratação e diafanização em xilol, e coradas com HE. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40 (Tóquio, Japão), com magnificação de 20x. Na leitura, foram avaliados tipos e quantidade das células predominantes na reação inflamatória

(polimorfonucleares), presença de edema intersticial e congestão vascular e o grau de formação de tecido de fibroblastos, neovasos e monócitos. Estes dados foram classificados em acentuado (3), moderado (2) ou discreto (1) e transformados em variáveis quantitativas por meio da atribuição de índice aos achados histológicos. A presença de polimorfos nucleares, edema e a congestão foram indicativos de processo inflamatório agudo, pontuando negativamente, e a formação de fibroblastos, neovasos e monócitos foram indicativos de processo inflamatório crônico, pontuando positivamente (Quadro 1). Após a atribuição dos índices, estes foram somados para totalizar escore final para posterior avaliação estatística entre os grupos estudados (VIZZOTTO et al., 2003). A análise e atribuição dos índices foi realizada por 3 avaliadores em momentos distintos.

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO E ATRIBUIÇÃO DE ÍNDICES AOS ACHADOS HISTOLÓGICOS POR HE

Parâmetros Avaliados	Intensidade		
	Acentuado	Moderado	Discreto
Polimorfonucleares	-3	-2	-1
Edema	-3	-2	-1
Congestão	-3	-2	-1
Fibroblastos	3	2	1
Neovasos	3	2	1
Monócitos	3	2	1

Fonte: Adaptado de VIZZOTTO et al. (2003)

FIGURA 5: CORTE PARA PREPARO DE COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA



Fonte: A autora (2019)

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

As lesões excisadas foram emblocadas paralelamente em parafina para posterior construção de blocos de *Tissue Microarray*. Foram avaliadas individualmente as reações imunoistoquímicas com os antígenos: Interleucina-6 (Interleucina-6, monoclonal mouse, Abcan®, Cambridge MA, EUA; clone ab9234, diluição 1:400, interleucina-17 (Interleucina 17; Policlonal mouse, dog e human; Abcan®, Cambridge MA, EUA, clone ab79056; diluição 1:200), Fator de Necrose Tumoral TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa (TA20); monoclonal mouse, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Califórnia EUA, WB, diluição 1:50) e Fator de Transformação do Crescimento Beta TGF- β (Fator de Transformação Beta1, Policlonal coelho, Spring Bioscience, Pleasnton, Californnia, EUA; N/A, diluição 1:100). As lâminas imunomarcadas foram digitalizadas pelo Scanner Axio Scan.Z1. (Zeiss, Alemanha).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics®, v.20.

Os resultados foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos controle e probiótico, em cada dia de eutanásia, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este mesmo teste foi usado para as comparações entre os dias de avaliação, dentro dos grupos controle e probiótico. Para avaliação da associação entre duas variáveis quantitativas foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. A avaliação da condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os principais dados desta tese foram organizados em 2 artigos.

4.1 ARTIGO 1

EFFECTS OF PROBIOTICS SUPPLEMENTATION ON SKIN WOUND HEALING IN DIABETIC RATS

Suplementação Perioperatória com Probióticos na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos Diabéticos

Letícia Fuganti Campos¹, Eliane Tagliari¹, Thais Andrade Costa Casagrande², Lúcia de Noronha³, Antônio Carlos L. Campos¹, Jorge Eduardo F Matias¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná

² Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo

³ Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Correspondence:

Letícia Fuganti Campos

E-mail: le_campos@hotmail.com

Fundings: The main author of this work received grant from the CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil

Conflict of interest: This study received partial financial support from FQM-FARMA.

Background: Chronic wounds in patients with Diabetes Mellitus often become incurable due to prolonged and excessive production of inflammatory cytokines. The use of probiotics modifies the intestinal microbiota and modulates inflammatory reactions.

Objective: To evaluate the influence of perioperative supplementation with probiotics in the cutaneous healing process in diabetic rats. **Methods:** 46 rats were divided into 4 groups (C3, P3, C10, P10) according to the treatment (P: Probiotic or C: Control, both orally administered) and day of euthanasia: 3rd or 10th postoperative days. All rats were induced to Diabetes Mellitus 72 hours before starting the experiment with alloxan. Supplementation was initiated 5 days before the incision and maintained until euthanasia.

Scalpel incision was guided by a 2x2cm mold and the wounds were left to heal per second-intention. The wounds were digitally measured. Collagen densitometry was done with *Picrosirius Red* staining. Histological parameters were analyzed by staining by Hematoxylin-Eosin. **Results:** The contraction of the wound was faster in the P10 group which resulted in a smaller scar area ($p=0.011$). There was an increase in type I collagen deposition from the 3rd to the 10th postoperative day in the probiotics group ($p=0.016$), which did not occur in the control group ($p=0.487$). The histological analysis showed a better degree of healing in the P10 group ($p=0.005$), with fewer polymorphonuclear ($p < 0.001$) and more neovessels ($p=0.001$). **Conclusions:** Perioperative supplementation of probiotics stimulates skin wound healing in diabetic rats, possibly due to attenuation of the inflammatory response and increased neovascularization and type I collagen deposition.

Key words: probiotics, wound healing, diabetes mellitus, alloxan.

Racional: Feridas crônicas em pacientes diabéticos muitas vezes se tornam incuráveis devido à produção prolongada e excessiva de citocinas inflamatórias. A utilização de probióticos modifica a microbiota intestinal e modula reações inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação perioperatória com probióticos no processo de cicatrização cutânea em ratos diabéticos. **Metodologia:** 46 ratos foram divididos em 4 grupos (C3, P3, C10, P10) conforme tratamento (P: Probiótico ou C: Controle, via oral) e dia de eutanásia: 3º ou 10º dia de pós-operatório. Todos os ratos foram induzidos ao diabetes mellitus 72 horas antes de iniciar o experimento com aloxana. A suplementação foi iniciada 5 dias antes da cirurgia e mantida até a eutanásia. Foi realizada incisão com bisturi guiada por molde de 2x2cm e a ferida foi deixada para cicatrizar por segunda intenção. As feridas foram medidas digitalmente. A densitometria de colágeno foi determinada com coloração *Picrosirius Red*. A histologia foi avaliada por coloração com Hematoxilina-Eosina. **Resultados:** A contração da ferida foi maior no grupo P10, o que resultou em menor área cruenta ($p=0,011$). Houve aumento do colágeno tipo I do 3º para o 10º dia de pós-operatório no grupo P10 ($p=0,016$), o que não ocorreu no grupo controle ($p=0,487$). A análise histológica mostrou melhor grau de cicatrização no grupo P10 ($p=0,005$), com menos polimorfonucleares ($p < 0,001$) e mais neovasos

($p=0,001$). **Conclusões:** A suplementação perioperatória de probióticos promove aceleração da cicatrização cutânea em ratos diabéticos, possivelmente por atenuar a resposta inflamatória e aumentar a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I.

Palavras-chave: probióticos, cicatrização, diabetes mellitus, aloxana.

INTRODUCTION

Approximately 425 million adults are affected by Diabetes Mellitus (DM) worldwide, and this disease was responsible for 4 million deaths in 2017 and a US\$ 727 billion spending on health care in the United States (12% of total healthcare spending with adults)¹.

Diabetic patients present impairment in healing due to imbalance of the inflammatory response, with prolonged accumulation of inflammatory cells and excessive production of inflammatory cytokines, alteration of collagen synthesis and reduction of tensile strength²⁻⁶. These factors when associated result in reduced wound resistance and therefore increased dehiscence which, added to the larger risk of infections in this group, result in increased hospitalization time and mortality rate^{3,4,5-7}.

The combination of impairment in the healing process with peripheral vascular disease and the difficulty in the perception because of the neuropathy in extremity injuries result in an increased risk for the development of diabetic foot disease. Diabetic foot ulcer is the leading cause of hospitalization of DM patients in developed countries and is among the leading causes of morbidity and mortality, with an average healing time of 6 months and need for amputation in up to one third of the cases. This complication still demands studies addressing the complexity of its management⁴⁻⁷.

Damage to the epithelial barrier results in dermis rupture and epithelial cell stress, requiring repair through healing. Skin healing is characterized by a dynamic process that involves a complex network of extracellular interactions, chemical mediators, and inflammatory cells. The main objective of this process is the restoration of tissue integrity and the maintenance of homeostasis. The healing process involves three sequential phases, which might be subdivided in four or five phases, that are dynamically related and

not individualized: inflammatory phase, cellular proliferation phase, conjunctive tissue formation phase, contraction phase and the final wound_remodelling phase⁸⁻¹⁰.

Chronic wounds in patients with DM often do not follow this orderly progression and may persist in the inflammatory phase and do not progress to the next stages of wound healing. The transition from inflammatory to proliferative stage in wound healing is the subject of intensive current research, and systemic regulation of inflammation plays an important role at this stage^{2,5,6,11,12}.

The relationship between the healing process and the interaction with the skin microbiota is already well established. It has been shown that the local microbiota may provide tonic stimulation to the host's immune system and prevent invasion of other pathogenic microbes. Loss of microbial diversity often results in prolonged inflammation and delay of wound healing process¹³. Recent studies suggest that, in addition to interaction with the local microbiota, changes in the intestinal microbiota may also positively or negatively affect the wound healing process by producing antimicrobial molecules, and regulating the immune and inflammatory response^{12,14-17}. Arck et al¹⁶ proposed the existence of a "brain-intestine-skin axis". According to this theory, intestinal bacteria may interfere with remote skin healing by modulating release of inflammatory cytokine expression.

Therefore, modulating the intestinal microflora might be an important strategy for improving the skin healing process. The tools for modulation of intestinal microbiota are prebiotics, probiotics, symbiotics and stool transplantation, in addition to dietary changes. Commercial probiotics products contain known and quantified bacteria, and the strains most applicable in clinical situations are lactobacilli (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) and bifidobacterium (*bifidobacterium Lactis*)¹⁸. The main link between probiotic use and healing is modulation of inflammation, which can have positive effects on tissue repair.

OBJECTIVE

To evaluate the influence of perioperative probiotic supplementation on the skin healing process of diabetic rats.

METHODS

Experimental model: The study was part of the Research on Tissue Healing Group of the Graduate Program in Surgery of the Federal University of Parana, Curitiba, Brazil. The project was conducted according to the rules provided by Federal Law No. 11,794, of October 8 2008, standards provided by the National Council for Animal Experimentation Control. The study protocol was approved by the Animal Use Ethics Commission of the Positivo University, where the experiment was carried out. A total of 46 males adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia) were used. The rats were divided into two groups: Probiotics (P) that received Probiatop®, and Control (C), which received maltodextrin. Both supplementations were orally administered with the aid of a spatula, at a dose of 250 mg probiotic or maltodextrin once a day. Each group was subdivided into two subgroups according to the day of euthanasia: 3rd or 10th postoperative (PO) (subgroups P3 = 12 rats, C3 = 12 rats, P10 = 11, C10 = 11 rats). During the experimental period the rats were kept under controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and 12 hours dark/light cycles, with water and rat chow Presence® (Purina, São Paulo, Brazil) *ad libitum*. The groups received probiotic or maltodextrin for 5 days before the creation of the skin excisional wound and maintained this consumption until the day of euthanasia. The probiotic offered was Probiatop®, composed of 4 strains (doses 1×10^9 CFU/g) *Lactobacillus paracasei* LPC-37®, *Bifidobacterium lactis* HN0019®, *Lactobacillus rhamnosus* HN001® and *Lactobacillus acidophilus* NCFM®. These doses are within the evidence-based recommendations for humans¹⁸. The rats were weighed before the DM induction, on the day of surgery and on days 3, 7 and 10 postoperatively, with an electronic scale (AM 5500® Marte, São Paulo, SP).

Induction of diabetes mellitus: All rats were induced to DM 72 hours before starting the preoperative probiotic or placebo supplementation (8 days before surgery). After 16 hours of fasting, the rats underwent isoflurane inhalation anesthesia in a glass bell and were then placed in a decubitus position to receive injection of alloxan monohydrate (*Sigma Chemical Co, USA*) through the caudal vein. Alloxan was diluted in distilled water and applied in a single dose of 40mg/kg¹⁹. After 1h30min rat chow and water were reintroduced. The confirmation of the diagnosis of diabetes mellitus DM was done 48

hours after induction, and fasting glucose > 200mg/dl was standardized for diagnosis. Animals that died on post induction period were replaced to avoid compromising the final group numbers. Glucose levels were assessed by taking manually a drop of blood from the tail, which were placed on reagent strip and evaluated by the One Touch Select Simple® glucometer (Johnson and Johnson, Brazil). Blood glucose levels were evaluated on days 0, 3, 7 and 10 postoperatively.

Surgical procedure: On the day of surgery, the rats were anesthetized by inhalation of isoflurane in a glass bell and were premedicated with 4mg/kg intramuscularly (IM) morphine. Dorsal region trichotomy and antisepsis were performed, followed by a scalpel incision guided by a 2x2cm square mold, resecting the entire thickness of the skin and exposing the dorsal muscular fascia. The wounds were left open to heal by second intention. Postoperative analgesia was performed with oral acetaminophen at a daily dose of 100mg/kg orally, diluted in the water, until the 4th postoperative day.

Wound Contraction Assessment: Wounds were macroscopically evaluated by digital photographs taken on days 1, 3, 7, and 10. For the analysis of wound contraction rates the wound area was measured using the Image-Pro Plus® 4.5 software (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA). The wounds were photographed at a standard distance of 15cm.

Euthanasia: On the 3rd (Groups C3 and P3) and 10th day (Groups C10 and P10) postoperatively the rats were euthanized in a closed glass bell system with isoflurane. Immediately after death, the wound was excised with a 1cm margin.

Collagen Densitometry: Collagen densitometry was performed to identify and quantify type I and type III collagen using Picrosirius Red F3BA (PSR) staining, polarized light optical microscopy, and software image analysis. Images were recorded by AxioVision 4.9 Software (Zeiss, Germany) and analysed by Image-Pro Plus® 4.5 software; (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, USA).

Histological study by Hematoxylin-Eosin (HE) staining: The samples were cut into rotary microtome blocks, with 5 micrometer thick sections, and subjected to HE staining. Then, the pieces were submitted to the dehydration and diaphanization processes in xylol, and stained with HE. Slide reading was performed using an Olympus BX40 (Tokyo, Japan) optical microscope with 20x magnification. The histological analysis included the types and number of predominant cells of inflammatory reaction (polymorphonuclear), presence of interstitial edema and vascular congestion, and the degree of fibroblast, neovessels and monocyte tissue formation. These data were classified as accentuated (3), moderate (2) and discrete (1) and transformed into quantitative variables by assigning the index to histological findings. The presence of polymorphonuclear, edema and congestion were indicative of acute inflammatory process, punctuating negatively, and the formation of fibroblasts, neovessels and monocytes were indicative of chronic inflammatory process, punctuating positively. After the indices were assigned, they were summed to total the final score for further statistical evaluation among the studied groups²⁰.

Statistical analysis: Results were described as mean and standard deviation (SD). For comparison between groups, the nonparametric Mann-Whitney test was used. Comparisons between assessment days within the same group were made using the non-parametric Kruskal-Wallis test. For correlation analysis, the Spearman coefficient was used. Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance. Data were analysed using the IBM SPSS Statistics® software, v.20.

RESULTS

Groups C3 and C10 showed weight loss between the induction of DM and the eutanasian at the 10th day ($p < 0.001$), while groups P3 and P10 showed no weight reduction within the same period ($P3=0.789$, $P10=0.433$). (Table 1)

Table 1 – Body weight evolution between pre induction and euthanasia in groups C3, P3, C10, P10

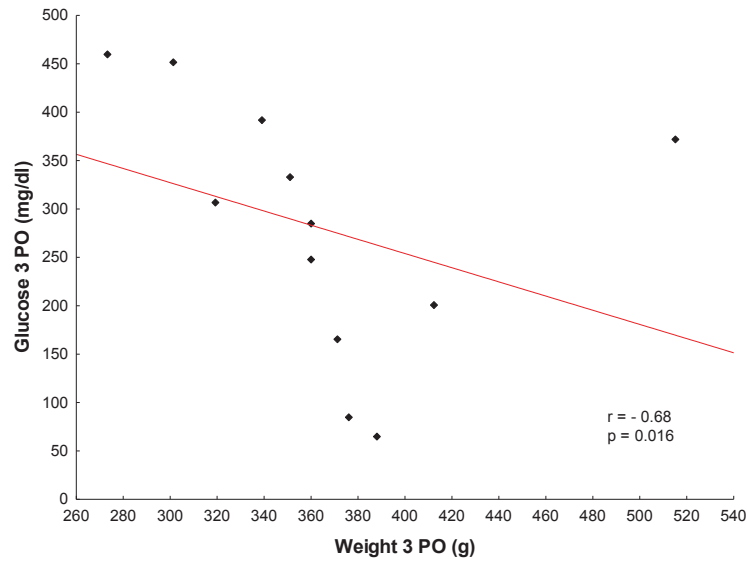
Group	Variable	n	Average(g)±SD	p*value
P3	Pre-induction body weight	12	373±25	
	Day of surgery body weight	12	368±21	
	3rd PO body weight	12	364±61	0,789
C3	Pre-induction body weight	12	392±40	
	Day of surgery body weight	12	392±46	
	3rd PO body weight	12	332±59	<0,001
P10	Pre-induction body weight	11	368±22	
	Day of surgery body weight	11	359±17	
	3rd PO body weight	11	351±30	
	7rd PO body weight	11	353±27	
	10th PO body weight	11	358±35	0,433
C10	Pre-induction body weight	11	361±45	
	Day of surgery body weight	11	337±55	
	3rd PO body weight	11	330±62	
	7rd PO body weight	11	320±62	
	10th PO body weight	11	320±65	0,001

Rats receiving probiotics had lower blood glucose levels at the time of surgery for group P10 as compared with C10 (321 ± 146 vs. 541.2 ± 112 mg/dl, $p=0.001$), as well as at the 3rd PO (281 ± 132 vs. 405 ± 147 mg/dl, $p=0.040$).

The glycemia of the 3rd PO in group C3 was negatively correlated with the weight of the 3rd PO in this group. (Spearman correlation coefficient = -0.68, $p=0.016$), indicating that the higher the blood glucose values, the lower the weight. There was no significant difference on the other days. (Table 2)(Graph 1)

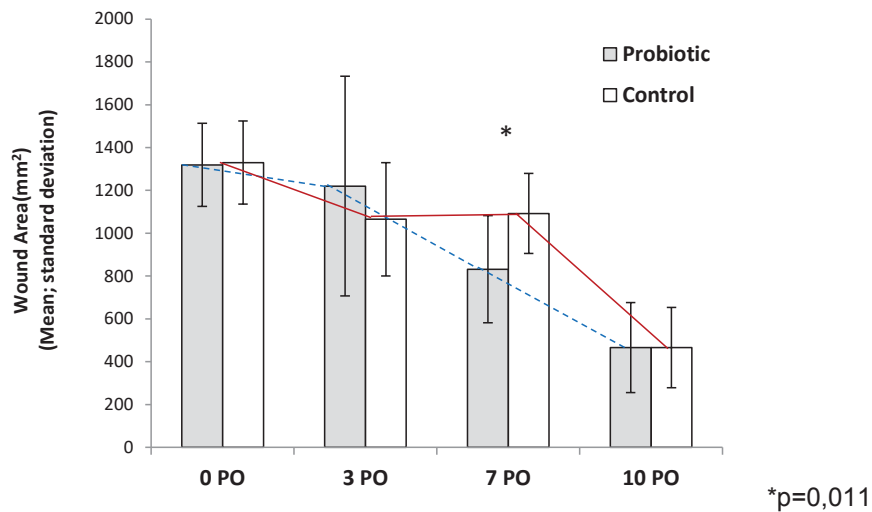
Table 2 - Spearman correlation coefficient for blood glucose and body weight in groups P3, C3, P10 and C10 in the 3rd PO, 7th PO and 10th PO

Group	Variable	n	Correlation Coefficient of Spearman	p value
P3	Glycemia 3rd PO x Body Weight 3rd PO	12	0,15	0,640
C3	Glycemia 3rd PO x Body Weight 3rd PO	12	-0,68	0,016
P10	Glycemia 7th PO x Body Weight 7th PO	11	-0,33	0,327
C10	Glycemia 7th PO x Body Weight 7th PO	11	-0,33	0,327
P10	Glycemia 10th PO x Body Weight 10th PO	11	-0,56	0,072
C10	Glycemia 10th PO x Body Weight 10th PO	11	-0,52	0,104



Graph 1 – Spearman correlation coefficient for blood glucose and body weight on 3rd PO day for the Control Group (C3)

Wound contraction was greater in group P10 as compared to group C10, which resulted in smaller wound area in the 7th PO (847 ± 189 vs $1054 \pm 269\text{mm}^2$, $p=0.049$). (Graph 2) (Figure 1)



Graph 2 - Wound contraction in both Control and Probiotic rats. Note that the use of probiotic accelerated wound healing. This difference was significant on day 7th

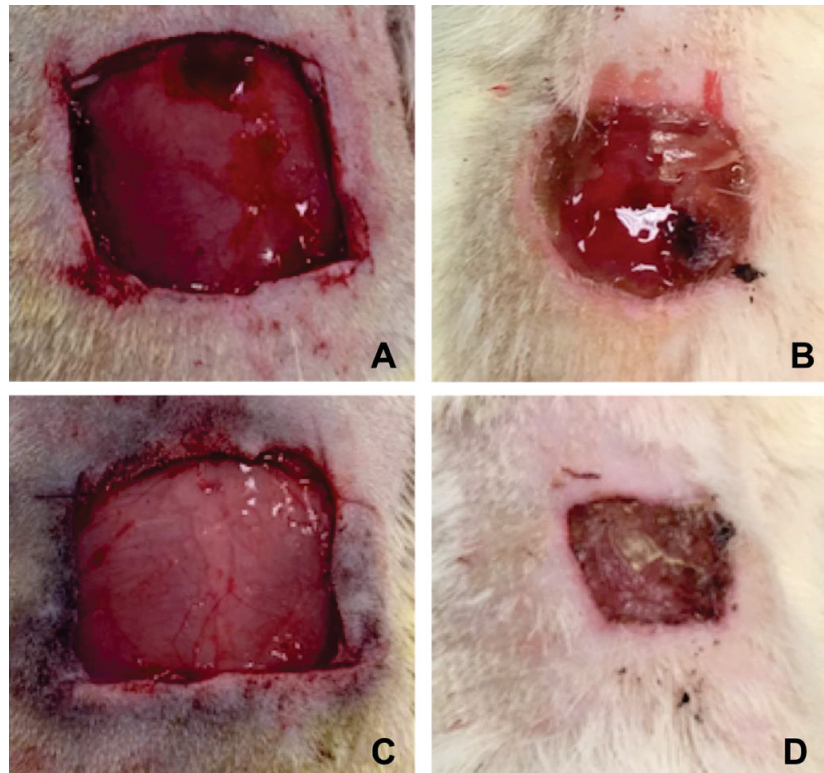


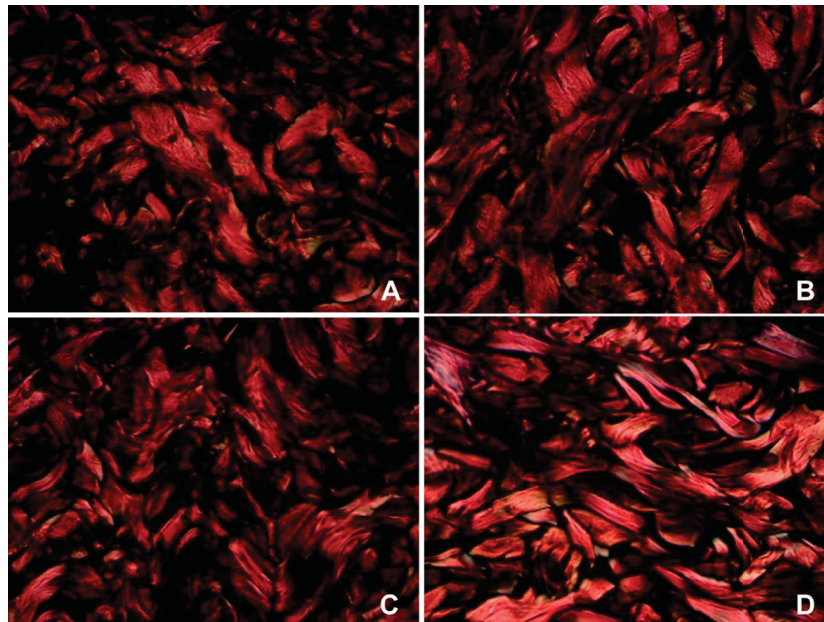
Figure 1 - Example of wound contraction area at: A: Day of surgery in the Control Group; B: 7PO in the Control Group; C: Day of surgery in the Probiotic Group; D: 7PO in Probiotic Group

In the control groups there was a positive correlation between weight and wound area according to the Spearman's Correlation Coefficient ($C_3 = 0.69$, $p = 0.014$; $C_{10} = 0.63$, $p = 0.037$).

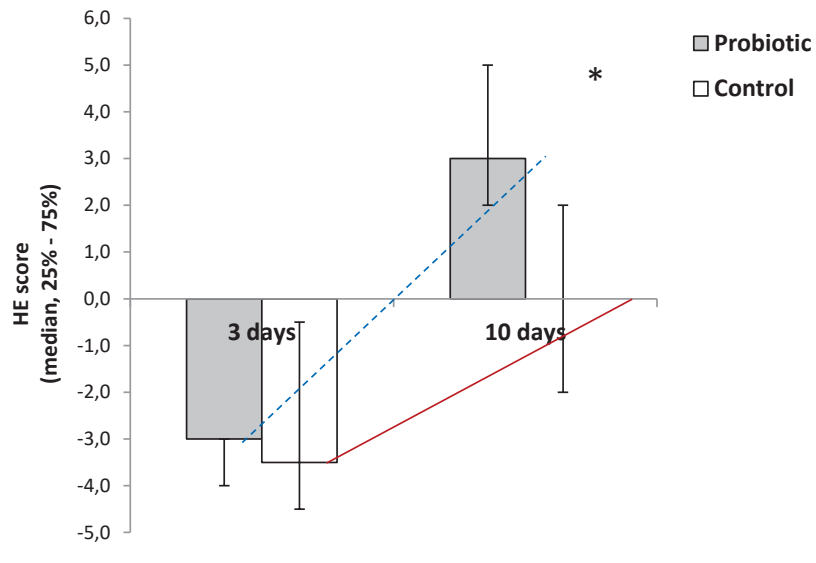
There was an increase in type I collagen deposition from the 3rd to the 10th day in the groups receiving probiotics ($p=0.016$), which did not occur in the control groups ($p=0.487$). (Table 3) (Figure 2). There was no significant difference for collagen type III analysis.

Table 3 – Type I and Type III collagen deposition on 3rd and 10th PO on Probiotic Group vs Control Group

Variable	Group	3 rd day		10 th day		p* (3 ^d x 10 ^d)
		n	Mean ± standard deviation	n	Mean ± standard deviation	
Type I Collagen Area (m μ ²)	Probiotics	12	0,58 ± 0,32	11	1,04 ± 0,50	0,016
	Control	12	0,82 ± 0,46	11	0,85 ± 0,24	0,487
	p* (C x P)		0,160		0,562	
Type III Collagen Area (m μ ²)	Probiotics	12	0,009 ± 0,011	11	0,011 ± 0,012	0,928
	Control	12	0,015 ± 0,011	11	0,010 ± 0,012	0,169
	p* (C x P)		0,178		1	

Figure 2 – Example of type I collagen deposition on: A: 3rd PO on Control group; B: 10th PO on Control group; C: 3rd PO on Probiotic group; D: 10th PO on Probiotic group

Analysis of the final histological score by HE showed a better healing process in the P10 group when compared to C10 (P10=3 vs. C10=0) ($p=0.005$) (Graph 3), with less polymorphonuclear cells (P10= -1 vs. C10= -2, $p < 0.001$) and more neovessels (P10=3 vs. C10=1, $p=0.001$) (Figure 3). There were no significant differences for the other parameters.



Graph 3 - Histological score by HE to evaluate degree of wound healing process on Control (C) and Probiotics (P) *p=0.005

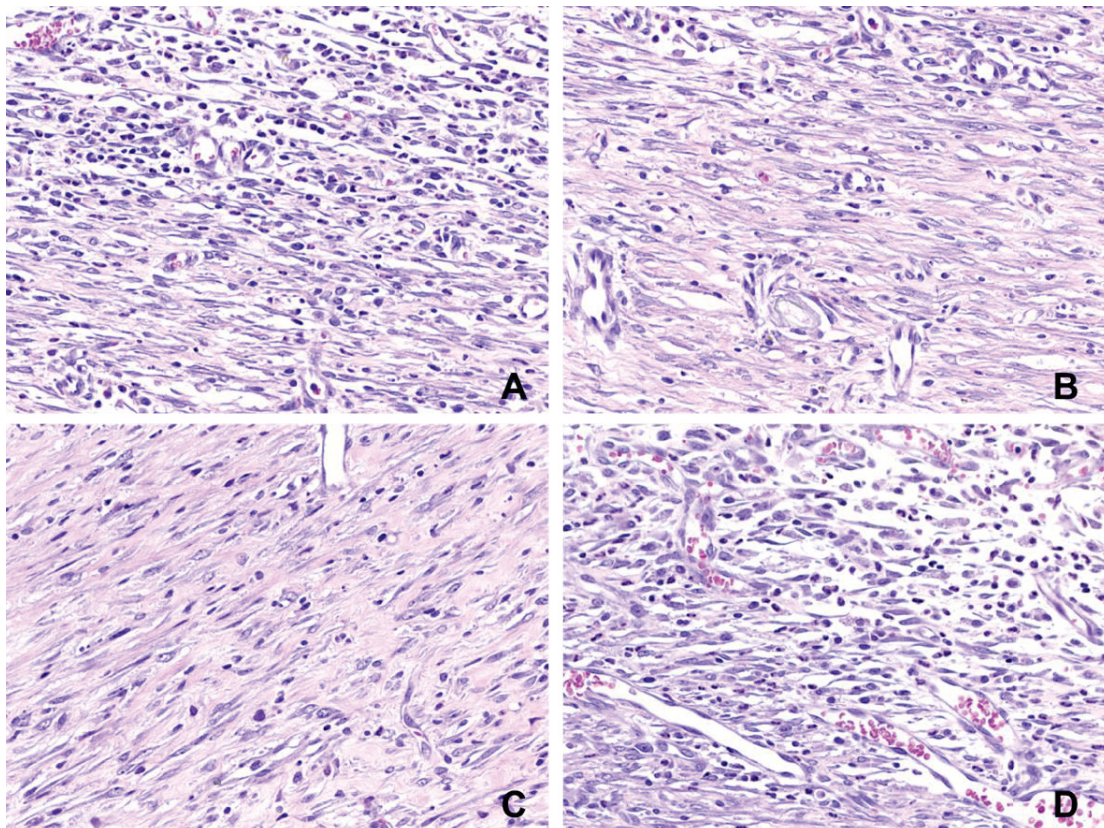


Figure 3 - Example of microphotographies demonstrating: A: Accentuated presence of polymorphonuclear cells on Control group; B: Discrete presence of polymorphonuclear cells on Probiotic group; C: Discrete presence of neovessel on control groups; D: Accentuated presence of neovessels on probiotic group (20x)

DISCUSSION

The present study, in diabetic rats, demonstrated benefit of oral probiotics supplementation in wound healing, mature collagen deposition, neovascularization stimulation and reduction of the inflammatory process, as well as attenuating weight loss and improving glycemic control. Some previous experimental studies have also shown benefits of the use of prebiotic or probiotic on wound healing: Huseini²¹ et al showed that the use of Kefir products, which may be considered a kind of probiotics, was able to improve wound healing in rats. Importantly, however, none of these studies included diabetic rats.

In addition, patients' chronic leg ulcer cells collected after topical treatment with *Lactobacillus plantarum* for 10 days showed lower bacterial load on the wound, in addition to inducing wound healing²².

In the present study, wound contraction was faster in the Probiotic group compared to Control, resulting in a smaller wound area, due to increased type I collagen deposition and increased of neovessels formation. A recent study²³ showed similar results with 12-week probiotic supplementation *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus Fermentum* and *Bifidobacterium bifidum* (2×10^9 UFC/g each) in diabetic patients with diabetic foot ulcer. In that study, probiotics supplementation reduced the ulcer size and resulted in better glycemic control. The anti-infectious mechanisms of the probiotics in patients with diabetic foot ulcers suggested on that study included the improved ability to fight with pathogenic microorganisms or by modulating host immune responses, the production of various antimicrobials substances and their anti-inflammatory properties²³.

The healing remodeling phase is characterized by organized collagen deposition, with replacement of the initial collagen (type III) and production of thicker and more organized mature collagen (type I), approaching the composition of the healthy dermis¹⁰. In the present study it was possible to observe an increase of mature collagen deposition (type I) in the group that received probiotics as compared to controls.

Another finding of this study was the higher neovascular formation in group P10 compared to C10. The number of vessels have been shown to be decreased after DM induction on rats². Improvement of neovascularization via angiogenesis is essential for

the proper reepithelialization process by ensuring adequate nutrient supply, immune cells and oxygen. Rapid and robust vascular growth creates a vascular bed with more capillaries than the normal tissue^{8,9,11,23,24}.

The reduction of polymorphonuclear cells in group P10 as compared to C10 suggests that perioperative supplementation with probiotics was able to attenuate prolonged and excessive inflammatory cytokine expression. Neutrophils infiltrate shortly after wound injury for microbial sterilization and removal of foreign compounds, and then regression should occur until production ceases when the inflammatory phase is terminated. If neutrophils persist in the lesion tissues, there may be excessive production of inflammatory cytokines, which makes the scar refractory. Skin biopsy analysis in a previous study showed that diabetic patients had higher immune cell infiltration when compared to healthy individuals, and that this increased inflammation is associated with failure to heal in patients with DM. The use of topical probiotic (*Lactobacillus plantarum*) in diabetic and non-diabetic patients with chronic infected leg ulcers was able to reduce neutrophils, reduce bacterial load and induce wound healing²².

Perioperative probiotic supplementation in diabetic rats prevented weight loss, which occurred in the control group. Insulin is the best known and essential anabolic hormone for maintaining glucose homeostasis and cell growth and differentiation, stimulating liver and adipocyte lipogenesis, protein synthesis and inhibiting degradation. The inability of the body to utilize glucose because of the lack of insulin can lead to catabolism, with proteolysis and lipolysis as mechanisms to provide energy²⁵. In this study, the Spearman correlation coefficient indicated that the higher the glycemic value, the lower the body weight, which suggests that perioperative supplementation with probiotics favoured glycemic control and consequently avoided catabolism and weight loss. A recent systematic review with DM2 patients showed that the use of probiotics reduced fasting blood glucose (in 19 studies), glycated haemoglobin (HbA1C) (in 13 studies), insulin (in 13 studies) and HOMA-IR (in 10 studies)²⁶.

The potential mechanisms of probiotics actions on glycemic control are: (1) direct intraluminal effects on the microbiota, with increase in the production of short-chain fatty acids (SCFAs), intestinal permeability reduction and lipopolysaccharides, and increases the production of Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1); (2) anti-inflammatory and

immunomodulatory effects, with reduction of pro-inflammatory cytokines; (3) reduction of oxidative stress, with protective effect of beta cells; (4) Effects of gene expression involved in glucose homeostasis and insulin resistance, as sensitization increases via GLUT-4²⁷.

The proper treatment of DM can prevent the maintenance of the wound on the inflammation phase and thus promotes the wound healing, by the negative regulation of pro-inflammatory cytokines, the regulation of growth factors, the stimulation of angiogenesis and the epithelialization process^{4,28}. Malnutrition, especially protein malnutrition, can also impair wound healing by prolonging the inflammatory phase, decreasing fibroblast synthesis and proliferation, angiogenesis and collagen synthesis^{6,10}. However, it is important to note that in this study there was no correlation between glycemia and wound area and, surprisingly, there was a positive correlation between body weight and wound area, which indicates that the higher the weight, the larger the wound area. Thus, it can be interpreted that the mechanism of action of probiotics in accelerating wound contraction was not related to better glycemic control or weight loss prevention, but rather to reduced inflammation.

No experimental study similar to this has been identified so far in the literature. In a clinical study with patients with diabetic foot, similar results were found, without, however, elucidating the mechanisms involved²⁴. However, the present study has some limitations: the diabetes model used mimics an acute disease condition, due to the Aloxana toxic effect on beta cells¹⁹, different from the chronic one presented by patients with chronic wound complications. Chronic DM causes numerous complications to the healing process, especially peripheral vascular disease, which were not extrapolated to the rats of this study. Still, the animals in this study were not being treated for DM, and recent studies have been correlating chronic metformin use with changes in microbiota²⁶; and were not consuming artificial sweeteners, widely used in diabetes patients and also known as harmful to the gut microbiota²⁹. Nevertheless, the beneficial effect of probiotics on the modulation of the inflammatory response was confirmed in this model. Rat microbiota differs from human microbiota and certainly clinical studies investigating the influence of probiotics on wound healing in diabetic patients are needed to define the real benefit as well as to define the optimal dose, perioperative supplementation time and most indicated strains.

CONCLUSIONS

Perioperative supplementation of probiotics promotes accelerated skin healing in diabetic rats, possibly because their use was associated with attenuation of the inflammatory response, and were also associated with increased neovascularization and increased type I collagen deposition.

REFERENCES

1. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>.
2. Oviedo-Socarrás T, Vasconcelos AC, Barbosa IX, Pereira NB, Campos PP, Andrade SP. Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvasc Res* [Internet]. 2014 May;93:23–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286214000429>
3. Rosado P, Cheng H-T, Wu C-M, Wei F-C. Influence of diabetes mellitus on postoperative complications and failure in head and neck free flap reconstruction: A systematic review and meta-analysis. Eisele DW, editor. *Head Neck* [Internet]. 2015 Apr;37(4):615–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.23624>
4. El-Bahy AAZ, Aboulmagd YM, Zaki M. Diabetex: A novel approach for diabetic wound healing. *Life Sci*. 2018;207:332–9.
5. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736–43.
6. Lepántalo M, Apelqvist J, Setacci C, Ricco J-B, de Donato G, Becker F, et al. Chapter V: Diabetic Foot. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. 2011 Dec;42:S60–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078588411600129>
7. Carro G V, Saurral R, Sagüez FS, Witman EL. [Diabetic foot among hospitalized patients in Latin America]. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 78(4):243–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30125251>
8. Salgado FLL, Artigiani-Neto R, Lopes-Filho G de J. Growth factors and cox2 in wound healing: an experimental study with ehrlich tumors. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* [Internet]. 2016 Dec;29(4):223–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202016000400223&lng=en&tlng=en

9. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35–43.
10. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* [Internet]. 2007 Mar;20(1):51–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202007000100010&lng=pt&tlng=pt
11. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* [Internet]. 2012 Nov;61(11):2937–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688339>
12. Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA, Christy RJ, Nicholson SE, et al. The cutaneous microbiome and wounds: New molecular targets to promote wound healing. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
13. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res.* 2017;58(1–2):81–94.
14. Wagner NRF, Zapparoli MR, Crus MRR, Schieferdecker MEM, Campos ACL. Postoperative changes in intestinal microbiota and use of probiotics in roux-en-y gastric bypass and sleeve vertical gastrectomy: an integrative review. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* [Internet]. 2018 Dec 6;31(4). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202018000400500&lng=en&tlng=en
15. Tsiouris CG, Kelesi M, Vasilopoulos G, Kalemikerakis I, Papageorgiou EG. The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2017 Jun 15;104:230–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28392493>
16. Arck P, Handjiski B, Hagen E, Pincus M, Bruenahl C, Bienenstock J, et al. Is there a “gut-brain-skin axis”? *Exp Dermatol* [Internet]. 2010 May;19(5):401–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113345>
17. Kiritsi D, Nyström A. The role of TGFβ in wound healing pathologies. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2018;172:51–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.004>

18. Flesch A, Poziomyck A, Damin D. O uso terapêutico dos simbióticos. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2014;27(3):206–9.
19. Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT. Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *J Diabetes Res* [Internet]. 2015;2015:494578. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789328>
20. Vizzotto Junior AO, Noronha L de, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2003 Jun;39(2):143–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
21. Huseini HF, Rahimzadeh G, Fazeli MR, Mehrazma M, Salehi M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns* [Internet]. 2012 Aug;38(5):719–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237053>
22. Peral MC, Rachid MM, Gobbato NM, Huaman Martinez MA, Valdez JC. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2010 Mar;16(3):281–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519855>
23. Mohseni S, Bayani M, Bahmani F, Tajabadi-Ebrahimi M, Bayani MA, Jafari P, et al. The beneficial effects of probiotic administration on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018;34(3).
24. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016;100(5):979–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27406995>
25. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011 Aug;93 Suppl 1:S52-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864752>
26. Koutnikova H, Genser B, Monteiro-Sepulveda M, Faurie J-M, Rizkalla S,

- Schrezenmeir J, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* [Internet]. 2019 Mar 30;9(3):e017995. Available from: <http://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2017-017995>
27. Miraghajani M, Dehsoukhteh SS, Rafie N, Hamedani SG, Sabihi S, Ghiasvand R. Potential mechanisms linking probiotics to diabetes: a narrative review of the literature. *Sao Paulo Med J* [Internet]. 2017 Apr;135(2):169–78. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802017000200169&lng=en&tlng=en
28. Salazar JJ, Ennis WJ, Koh TJ. Diabetes medications: Impact on inflammation and wound healing. *J Diabetes Complications* [Internet]. 30(4):746–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796432>
29. Lobach AR, Roberts A, Rowland IR. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019 Feb;124:385–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30557670>

4.2 ARTIGO 2

PERIOPERATIVE SUPPLEMENTATION WITH PROBIOTICS REDUCES IL-17 EXPRESSION AND ACCELERATES HEALING OF CUTANEOUS WOUNDS IN DIABETIC RATS

Letícia Fuganti Campos¹, Eliane Tagliari¹, Thais Andrade Costa Casagrande², Lúcia de Noronha³, Antônio Carlos L. Campos¹, Jorge Eduardo F Matias¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná

² Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo

³ Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Introduction: Chronic wounds in patients with Diabetes Mellitus (DM) often become incurable due to prolonged and excessive production of inflammatory cytokines. The use of probiotics modulates the intestinal microbiota and reduces inflammatory reactions. Our previous results, recently published, showed that perioperative probiotic supplementation promoted accelerated wound healing in diabetic rats, possibly by attenuating the inflammatory response and increasing neovascularization and type I collagen deposition. In that study, probiotic supplementation also prevented weight loss and promoted better glycemic control. **Objective:** To evaluate the influence of perioperative probiotics supplementation on the production of inflammatory cytokine IL-17 in the wound healing process in diabetic rats. **Methods:** The methods have been published previously. Briefly, 46 rats were divided into 4 groups (C3, P3, C10, P10) according to treatment received (P: Probiotic - Probiatop®, 250mg / day, orally) or control (C: maltodextrin, 250mg / day, orally) and euthanasia day: 3rd or 10th postoperative (PO). All rats were induced to DM 72 hours before starting the experiment with Aloxana (40mg/kg, via caudal vein). Supplementation was started 5 days before surgery and continued until euthanasia. A punch incision was made and the wounds were left to heal by second intention. Wounds were digitally measured to calculate wound area. The immunohistochemical study was performed using Tissue Microarray blocks for analysis of IL-17 marker. **Results:** IL-17 was lower in P3 when compared to C3 (Med:50;Min:11,4/Max:229,5 vs Med:174,6; Min:29,6/Max:479,9, p=0,02). The body weight on the 3rd PO day in group C3 was negatively correlated with the IL-17 levels (Spearman correlation coefficient = -0.68,

$p=0.015$), indicating that the higher the body weight, the lower the IL-17 levels. The glycemia on the 10th PO day in group P10 was positively correlated with the IL-17 levels (Spearman correlation coefficient = -0.76 , $p=0.011$), indicating that the higher the glycemia, the higher the IL-17 levels.

Conclusions: Perioperative probiotic supplementation promotes IL-17 reduction what may explain acceleration on wound healing in diabetic rats.

Keywords: probiotics, healing, diabetes mellitus, alloxan, interleukin-17.

Introdução: Feridas crônicas em pacientes com Diabetes Mellitus (DM) geralmente se tornam incuráveis devido à produção prolongada e excessiva de citocinas inflamatórias. O uso de probióticos modula a microbiota intestinal e reduz as reações inflamatórias. Nossos resultados anteriores, publicados recentemente, mostraram que a suplementação perioperatória com probióticos promoveu a cicatrização acelerada de feridas em ratos diabéticos, possivelmente por atenuar a resposta inflamatória e aumentar a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I. Nesse estudo, a suplementação com probióticos também impediu a perda de peso e promoveu um melhor controle glicêmico. **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação perioperatória de probióticos na produção da citocina inflamatória IL-17 no processo de cicatrização de feridas em ratos diabéticos. **Métodos:** Os métodos foram publicados anteriormente. Resumidamente, 46 ratos foram divididos em 4 grupos (C3, P3, C10, P10) de acordo com o tratamento recebido (P: Probiótico - Probiatop®, 250mg/dia, por via oral) ou controle (C: maltodextrina, 250mg/dia, por via oral) e dia da eutanásia: 3^o ou 10^o pós-operatório (PO). Todos os ratos foram induzidos ao DM 72 horas antes de iniciar o experimento com Aloxana (40 mg/kg, via veia caudal). A suplementação foi iniciada 5 dias antes da cirurgia e continuou até a eutanásia. Foi feita uma incisão e as feridas foram deixadas para cicatrizar por segunda intenção. As feridas foram medidas digitalmente para calcular a área da ferida. O estudo imuno-histoquímico foi realizado com blocos de Tissue Microarray para análise do marcador IL-17. **Resultados:** A IL-17 foi menor no P3 quando comparado ao C3 (Med:50;Min:11,4/Max:229,5 vs Med:174,6; Min:29,6/Max:479,9, $p=0,02$). O peso corporal no terceiro dia de PO no grupo C3 apresentou correlação negativa com os níveis de IL-17 (coeficiente de correlação de Spearman= $-0,68$,

$p=0,015$), indicando que quanto maior o peso corporal, menores os níveis de IL-17. A glicemia no décimo dia de PO no grupo P10 foi positivamente correlacionada com os níveis de IL-17 (coeficiente de correlação de Spearman = $-0,76$, $p=0,011$), indicando que quanto maior a glicemia, maiores os níveis de IL-17.

Conclusões: A suplementação peri-operatória de probióticos promove redução da IL-17, o que pode explicar a aceleração da cicatrização de feridas em ratos diabéticos.

Palavras-chave: Probióticos, cura, diabetes mellitus, aloxana, interleucina-17.

INTRODUCTION

The prevalence of chronic non-healing wounds is increasing globally as a result of the increased incidence of diabetes mellitus (DM), obesity and population aging.¹ Diabetic foot ulcer is a serious and extremely prevalent complication in DM, and about 25% of patients with DM are at risk of developing this complication throughout their lives². The elements associated with the pathophysiology of the diabetic foot are ischemia, neuropathy and infection³.

Normal wound healing is a complex process that involves sequential phases that are dynamically related and not individualized: inflammatory, proliferative, connective tissue formation, contraction and remodeling phases⁴⁻⁸. Excessive inflammation results in further protease degradation of growth factors and extracellular matrix components, as well as reduced sensitivity of epidermal cells to growth factors⁹⁻¹³. Diabetic patients present impaired healing due to prolonged accumulation of inflammatory cells and excessive production of inflammatory cytokines, and delayed healing is one of the main therapeutic difficulties associated with diabetic foot ulcer^{9,13}. Therefore, it is tempting to speculate that modulation of the inflammatory phase might affect the success of wound healing¹⁶.

Modulation of inflammation, however, can be considered a difficult strategy, in part because the recruited macrophages have a heterogeneous function. There is still a discrepancy regarding which inflammatory cytokines are essential for wound healing and which are harmful^{1,14}. Cytokine IL-17 has been described as a determinant in the change of proinflammatory macrophages for wound repair^{1,15}, and its modulation seems to improve healing. Therefore, this could be a potential therapeutic option for chronic wounds

with excessive inflammation¹. IL-17 has been associated with several diseases and increased risk of complications due to increased inflammation¹⁶⁻²⁰. The administration of IL-17 in a previous study has delayed wound contraction, collagen deposition and neutrophil production¹⁶, and treatment with interleukin blockers has already been shown to accelerate healing¹.

Due to the increasing global problems of antibiotic resistance, the use of probiotic treatment is pertinent and promising, as they have the ability to strengthen the immune system, have anti-inflammatory effects and therefore can improve wound healing²¹⁻²⁵. The axis proposed by Arck et al as the “brain-intestine-skin axis” suggests that the modulation of the intestinal microbiota may improve the systemic immune response and affect peripheral tissue responses²⁵.

In this sense, modulating the intestinal flora may be an important strategy for reducing interleukin-17 production and therefore improving the healing process. To the best of our knowledge no experimental study similar to this has been identified so far.

OBJECTIVE

To evaluate the influence of perioperative probiotics supplementation on interleukin-17 production in the skin healing process of diabetic rats.

METHODS

The study was part of the Research on Tissue Healing Group of the Graduate Program in Surgery of the Federal University of Parana, Curitiba, Brazil. The project was conducted according to the rules provided for in Federal Law No. 11,794, of October 8, 2008, standards provided by the National Council for Animal Experimentation Control. The study protocol was approved by the Animal Use Ethics Commission of the Positivo University, where the experiment was carried out.

The study protocol has been published previously. Briefly, 46 rats were divided into 4 groups (C3, P3, C10, P10) according to the treatment received (P: Probiotic - Probiatop®, 250mg/day, orally administered) or control (C: maltodextrin, 250mg/day, orally administered) and day of euthanasia: 3rd or 10th postoperative (PO). All rats were induced to DM 72 hours before starting the experiment with Alloxan (40mg per kg of

bodyweight, through caudal vein). Supplementation was initiated 5 days before the incision and maintained until the day of euthanasia. An incision was made with punch and the wounds were left per second-intention healing.

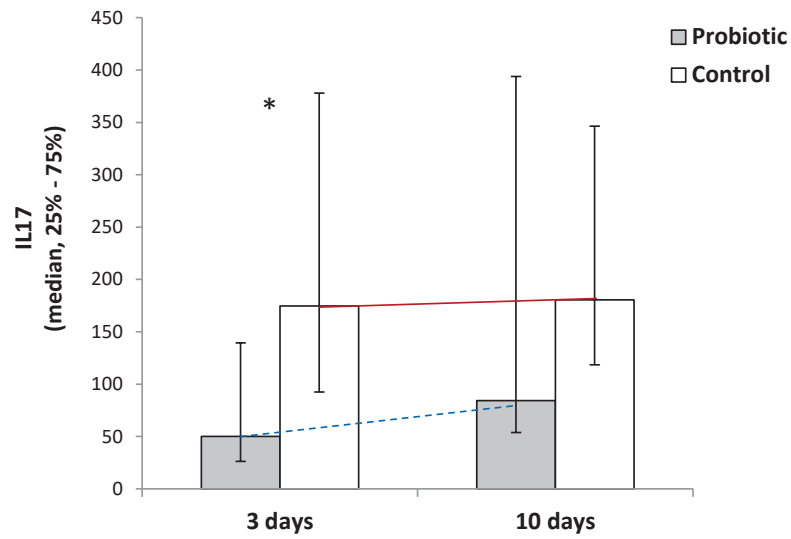
To perform the immunoistochemical study, the excised lesions were parallelized in paraffin for subsequent construction of Tissue Microarray blocks. Immunoistochemical reactions with the antigens were individually evaluated: interleukin-17 (Interleukin 17; Polyclonal mouse, dog and human; Abcan®, Cambridge MA, USA, clone ab79056; 1: 200 dilution) Immunoblotted slides were scanned by the Axio Scan.Z1 Scanner (Zeiss, Germany).

Results were described as median and minimum and maximum values. For comparison between groups, the nonparametric Mann-Whitney test was used. Comparisons between assessment days within the same group were made using the non-parametric Kruskal-Wallis test. For correlation analysis, the Spearman coefficient was used. Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance. Data were analyzed using the IBM SPSS Statistics® software, v.20.

RESULTS

Our previously published results showed that the contraction of the wound was greater in group P10 as compared to group C10, which resulted in a smaller wound area (832 ± 187 vs $1092 \pm 250 \mu\text{m}^2$, $p = 0.011$). There was an increase in type I collagen from the 3rd to the 10th postoperative day in the group receiving probiotics ($p = 0.016$), which did not occur in the control group ($p = 0.487$).

In this present study, IL-17 was lower in P3 when compared to C3 (Med:50;Min:11,4/Max:229,5 vs Med:174,6; Min:29,6/Max:479,9, $p=0,02$). (Graph 1) (Figure1)



Graph 1: Analysis of IL-17 on the 3rd PO day and on the 10th PO day, P=Probiotics, C=Control. IL-17 was lower in P3 when compared to C3 ($p < 0,05$). P10 was lower when compared to C10, with no statistic significance

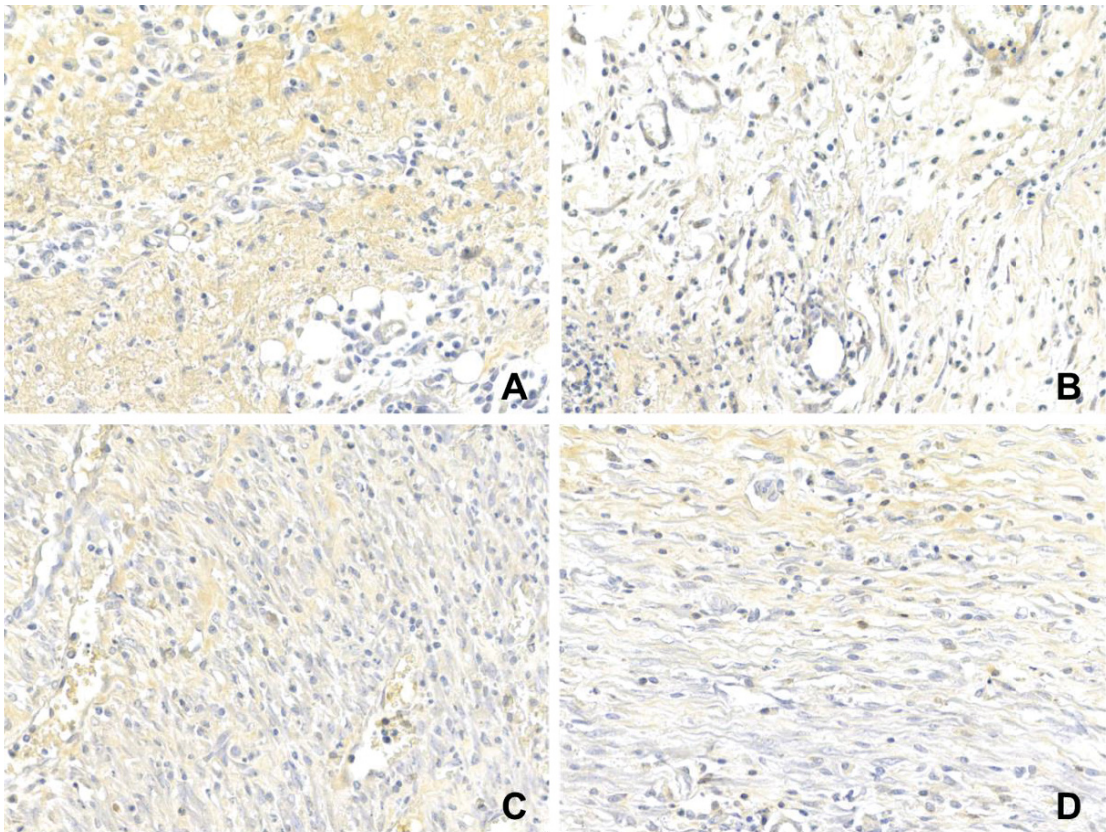
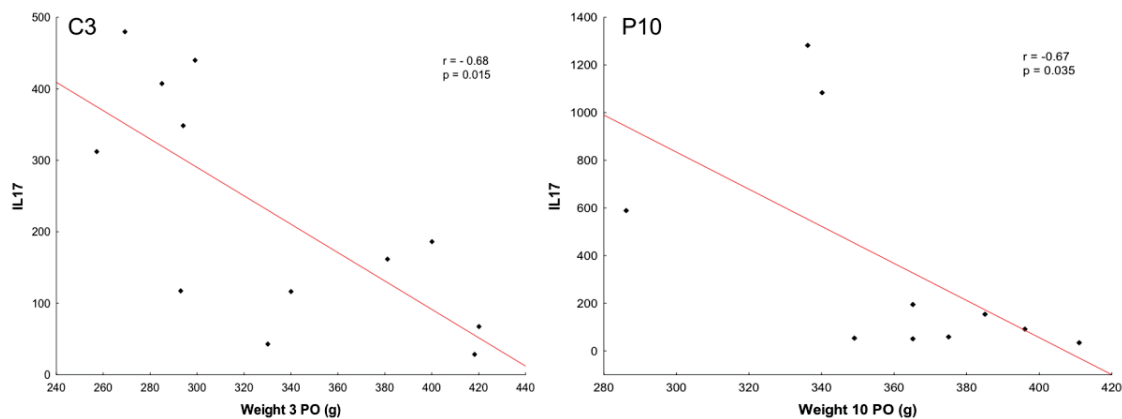


Figure 1 - Example of immunohistochemical study on: A: 3rd PO of Control group ; B: 3rd PO on Probiotic group; C: 10th PO on Control group; D: 10th PO on Probiotic group. Note that there was a significant difference on 3rd PO of Control Group vs. 3rd PO of Probiotic Group, as is shown on A and B (20x)

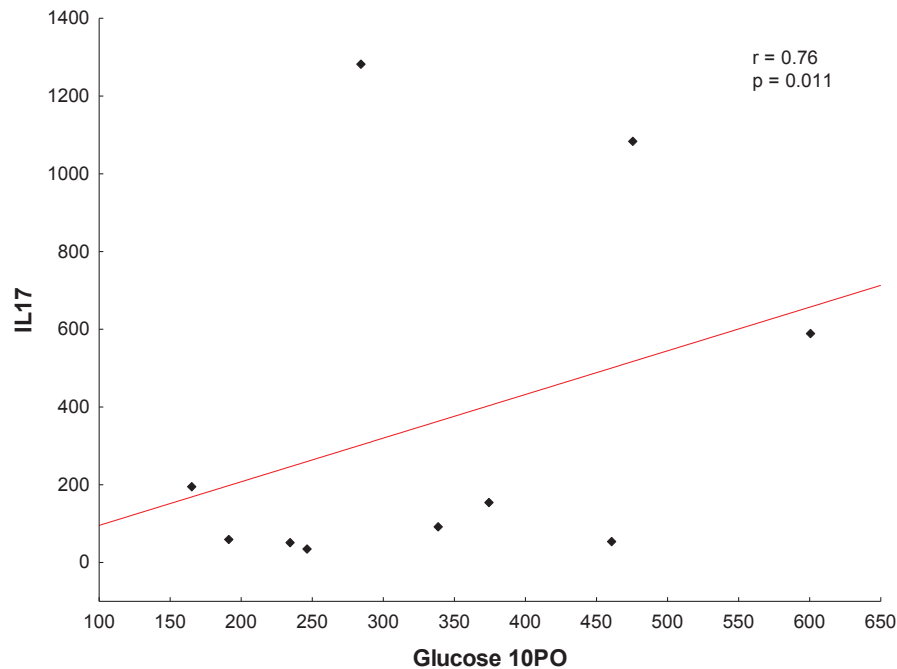
Our previously published results showed that groups C3 and C10 presented weight loss between DM induction and 10thPO ($p < 0.001$), while groups that received probiotics maintained their weight in the same period ($P3 = 0.789$, $P10 = 0.433$). Rats receiving probiotics had lower blood glucose at the time of surgery (P10) compared to group C10 (321 ± 146 vs. 541.2 ± 112 mg/dl, $p = 0.001$), as well as at the 3rd PO (281 ± 132 vs. 405 ± 147 mg / dl, $p = 0.040$).

The body weight on the 3rd PO in group C3 was negatively correlated with the IL-17 levels (Spearman correlation coefficient = -0.68 , $p=0.015$), indicating that the higher the body weight, the lower the IL-17 levels. Similar results were found on the 10th PO day (Spearman correlation coefficient = -0.67 , $p=0.035$) (Graph 2).



Graph 2 - Spearman correlation coefficient for body weight and IL-17 in groups C3 and P10, the higher the body weight, the lower the IL-17 levels

The glycemia on the 10th PO day in group P10 was positively correlated with the IL-17 levels (Spearman correlation coefficient = -0.76 , $p=0.011$), indicating that the higher the glycemia, the higher the IL-17 levels (Graph 3).



Graph 3 - Spearman correlation coefficient for glycemia and IL-17 in groups P3, C3, P10 and C10 in the 3rd PO, 7th PO and 10th PO, the higher the glycemia, the higher the IL-17 levels

DISCUSSION

Wound inflammation is an important phase of wound healing. Balancing this phase is critical, as both defective and excessive inflammation result in delayed healing. This is partly related to the dual role of macrophages as effectors of cellular immunity, but also as drivers of tissue repair^{1,9-13}. IL-17 plays a role in determining these inflammatory macrophages, and IL-17 inhibition alters the inflammatory phenotype of macrophages, which generally reduces wound inflammation¹.

In a previously study IL-17 has also been associated with neutrophil recruitment, previously, where neutrophil-depleted rats showed a significant improvement in acute wound closure. IL-17 deficiency resulted in reduced neutrophil infiltration¹⁶. In our previously published results we demonstrated that the rats supplemented with probiotics presented a reduction in the number of neutrophils according to the histological study by Hematoxylin-Eosin (HE) staining.

A recent experimental study has shown increased levels of IL-17 in diabetic rat wounds as well as the role of this interleukin in neutrophil adhesion to endothelial cells

and extravascular neutrophil migration. Experimental administration of IL-17 delayed wound contraction, reduced collagen deposition and accelerated neutrophil accumulation¹⁶. In obese diabetic rats, treatment with anti-IL17A blocking antibodies improved wound reepithelization, with accelerated wound closure and reduced inflammatory macrophage expression¹.

There are also some interesting recent clinical studies with IL-17: in burn patients, IL-17 increased complications by increasing inflammation¹⁷. IL-17 expression also played an important role in the pathogenesis of perianal abscess and anal fistula¹⁸. IL-17 has also been recently associated with various diseases such as cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease¹⁶⁻²⁰. Furthermore, clinical studies with the administration of IL-17 antagonists have shown to be highly effective in treating psoriasis. In contrast, these medications are associated with exacerbation of inflammatory bowel disease²¹.

As described in our recently published results, perioperative probiotic supplementation in diabetic rats prevented weight loss, which occurred in the control group. The Spearman correlation coefficient indicated that the higher the glycemic value, the lower the weight, which suggests that probiotics supplementation favored glycemic control and consequently avoided weight loss. Glycemic control prevents wounds from remaining in the inflammatory stage of healing and promotes wound healing by down-regulating proinflammatory cytokines, down-regulating growth factors, stimulating angiogenesis and increasing epithelialization²². We have also shown in our previously published results, however, that there was no correlation between glycemia and wound area. However, the present study showed that the glycemia on the 10th PO day was positively correlated with the IL-17 levels, indicating that the higher the glycemia, the higher the IL-17 levels, as we would expect from the literature. Malnutrition, especially protein malnutrition, can also impair wound healing by prolonging the inflammatory phase, decreasing fibroblast synthesis and proliferation, angiogenesis and collagen synthesis^{3,7}. We have also shown in our previously published results that there was a positive correlation between body weight and wound area, which indicates that the higher the body weight, the larger the wound area. In the present study, however, the body weight was

negatively correlated with the IL-17 levels in both Control and Probiotic groups, indicating that the higher the body weight, the lower the IL-17 levels, as we would expect.

To the best of our knowledge no experimental study similar to this has been identified so far. However, the present study has some limitations, already highlighted in our previous study: the diabetes model used mimics an acute disease condition, due to toxic effect on beta cells by Aloxana²³, different from the chronic one presented by patients with chronic wound complications. The animals in this study were not receiving DM treatment, and recent studies have been correlating chronic metformin use with changes in the microbiota²⁴; and were not consuming artificial sweeteners, widely used in diabetes patients and also known as being harmful to the gut microbiota²⁵. Furthermore, chronic DM causes other complications to the healing process, as peripheral vascular disease, which were not extrapolated to the rats of this study. Even with those limitations, the beneficial effect of probiotics in decreasing IL-17 was confirmed in this model. Rat microbiota differs from human microbiota and certainly clinical studies investigating the effect of probiotic supplementation on IL-17 and wound healing in diabetic patients are needed to define the real benefit as well as to define the optimal dose, perioperative supplementation time and most indicated strains.

CONCLUSION

Perioperative probiotic supplementation promotes IL-17 reduction what may contribute to the acceleration on wound healing in diabetic rats receiving probiotics.

REFERENCES

1. Lee J, Rodero MP, Patel J, Moi D et al. Interleukin-23 regulates interleukin-17 expression in wounds, and its inhibition accelerates diabetic wound healing through the alteration of macrophage polarization. *FASEB J* 2018;23(4):2086-94
2. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 2005;293(2):217-28.
3. Lepantalo M, Apelqvist J, Setacci C, et al. Chapter V: Diabetic foot. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;42 Suppl 2:S60-74.
4. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and

- regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
5. Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA et al. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9):2699.
 6. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschiski. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 2017; 58:81-94.
 7. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8.
 8. Salgado FLL, Artigiani-Neto R, Lopes-Filho GJ. Avaliação dos fatores de crescimento e Cox-2 na cicatrização de camundongos com neoplasia de Ehrlich. *Arq Bras Cir Dig* 2016;29(4): 223-6.
 9. Mohseni S, Bayani M, Bahmani F, Tajabadi-Ebrahimi M et al. The beneficial effects of probiotic administration on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab Rev* 2018;34(3).
 10. Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA et al. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9):2699.
 11. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschiski. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 2017; 58:81-94.
 12. Tellechea A, Leal EC, Kafanas A, Auster ME et al. Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. *Diabetes* 2016;65(7):2006-19.
 13. Oviedo-Socarras T, Vasconcelos AC, Barbosa IX, Pereira NB et al. Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvasc Res*. 2014; 93: 23–29.
 14. Goren I, Muller E, Schiefelbein D, Christen U, Pfeilschifter J, Muhl H., Frank S. Systemic anti-TNF alpha treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *J Invest Dermatol* 2007;127(9):2259-67.
 15. Rodero MP, Hodgson SS, Hollier B, Combadiere C, Khosrotehrani K. Reduced Il17a expression distinguishes a Ly6c(lo)MHCII(hi) macrophage population promoting wound healing. *J. Invest. Dermatol*. 2013;133(3): 783–92.

16. Takagi N, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, et al. IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute in skin. *Exp Dermatol* 2017;26(2):137-44.
17. Sasaki JR, Zhang Q, Schwacha MG. Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns* 2011;37(4):646-51
18. Wang JP, Cai C, Du JL, Shi HQ, Dai ZH, Zhong ZF. Role of interleukin-17 in the pathogenesis of perianal abscess and anal fistula: a clinical study on 50 patients with perianal abscess. *ANZ J Surg* 2019 Mar;89(3):244-247
19. Finley PJ, DeClue CE, Sell AS, DeBartolo JM, Shormick LP. Diabetic wounds exhibit decreased Ym1 and arginase expression with increased expression of IL-17 and IL-20. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5(11):486-94.
20. Ramani K, Biswas OS. Interleukin-17: Friend or foe in organ fibrosis. *Cytokine* 2019
21. Hohenberger M, Cardwell LA, Oussedik E, Feldman SR. Interleukin-17 inhibition: role in psoriasis and inflammatory bowel disease. *J Dermatolog Treat* [Internet]. 2018 Feb;29(1):13–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28521565>
22. Salazar JJ, Ennis WJ, Koh TJ. Diabetes medications: Impact on inflammation and wound healing. *J Diabetes Complications* [Internet]. 30(4):746–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796432>
23. Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT. Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *J Diabetes Res* [Internet]. 2015;2015:494578. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789328>
24. Koutnikova H, Genser B, Monteiro-Sepulveda M, Faurie J-M, Rizkalla S, Schrezenmeir J, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2019 Mar 30;9(3):e017995.
25. Lobach AR, Roberts A, Rowland IR. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food Chem Toxicol*. 2019 Feb;124:385–99.

5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÃO GERAL

A suplementação perioperatória de probióticos promove aceleração da cicatrização cutânea em ratos diabéticos, possivelmente por atenuar a resposta inflamatória e aumentar a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I

5.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A suplementação perioperatória de probióticos acelera macroscopicamente o processo cicatricial de contração das feridas excisionais.

O uso oral de probióticos aumentou a deposição de colágeno do tipo I entre o 3º e 10º PO. Não houve diferença significativa no colágeno do tipo III.

Histologicamente o uso de probióticos resultou em menor número de polimorfonucleares e maior formação de neovasos, o que sugere atenuação da resposta inflamatória e contribuição para o processo cicatricial.

A suplementação perioperatória de probióticos reduz a expressão de IL-17, o que corrobora com a redução do processo inflamatório e aceleração da cicatrização. O TGF beta foi inferior no grupo probióticos quando comparado com o grupo controle, pelo provável mecanismo de feedback negativo pela cicatrização mais precoce da ferida. Não houve diferença significativa nos valores de IL-6 e TNF alfa.

Não houve perda de peso no grupo que recebeu probióticos, enquanto o grupo controle apresentou perda de peso. O uso de probióticos associou-se a glicemias mais baixas do que no grupo controle.

A glicemia foi correlacionada negativamente com o peso, ou seja, quanto mais altos os níveis de glicemia, mais baixos foram os valores de peso. Não houve correlação entre glicemia e área cruenta. Entretanto, houve correlação positiva entre peso e área cruenta, indicando que quanto maior o peso, maior a área cruenta. Este resultado sugere que o mecanismo de ação dos probióticos na aceleração da contração da ferida não foi relacionado ao melhor controle glicêmico ou prevenção da perda de peso, mas sim com

a redução da inflamação. O peso foi negativamente correlacionado com a IL-17, ou seja, quanto mais alto o peso corporal, mais baixos os níveis de IL-17. A glicemia foi positivamente correlacionada com os valores de IL-17, indicando que quanto mais alta a glicemia, mais altos os valores de IL-17. Estes resultados sugerem que a suplementação com probióticos atenua a resposta inflamatória e isto contribui para o controle glicêmico e para evitar a perda de peso.

REFERÊNCIAS

American Diabetes Associations. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. 2019. **Diabetes Care** 42 (1): 124–38.

ANVISA 2017: Gerência-Geral de Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
<[Http://Portal.Anvisa.Gov.Br/Documents/3845226/0/Análise+das+Linhagens+de+Probióticos__23042018.Pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95](http://Portal.Anvisa.Gov.Br/Documents/3845226/0/Análise+das+Linhagens+de+Probióticos__23042018.Pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95)>. Acesso em: Janeiro de 2018.

ARCK, P.; HANDJISKI, B.; HAGEN, E.; PINCUS, M. et al. Is There a ‘Gut-Brain-Skin Axis’? **Experimental Dermatology** 19 (5): 401–5, 2010. DOI.10.1111/j.1600-0625.2009.01060.x.

BAQUERIZO, N.; KATHERINE, L.; ELIZABETH, Y. I. M.; JONETTE, E. K. Probiotics and Prebiotics in Dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology** 71 (4): 814–21, 2014. DOI.10.1016/j.jaad.2014.04.050.

BORGERAAS, H. L. K. J.; SKATTEBU, J.; HERTEL, J. K.; HJELMESAETH, J. Effects of Probiotics on Body Weight, Body Mass Index, Fat Mass and Fat Percentage in Subjects with Overweight or Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Obesity Reviews** ,19 (2): 219–32, 2018. DOI.10.1111/obr.12626.

BROUGHTON, G; JEFFREY, E. J.; CHRISTOPHER, E. A. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery** 117 (7 Suppl): 12S-34S, 2006. DOI.10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2.

CALCINARO, F. S.; DIONISI, M. M.; CANDELORO, P.; BONATO, V. et al. Oral Probiotic Administration Induces Interleukin-10 Production and Prevents Spontaneous Autoimmune Diabetes in the Non-Obese Diabetic Mouse. **Diabetologia** 48 (8): 1565–75, 2005. DOI.10.1007/s00125-005-1831-2.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. **ABCD Arq Bras Cir Dig** (São Paulo) 20 (1): 51–58, 2007. DOI.10.1590/S0102-67202007000100010.

CAMPOS, L. F.; POLESEL, M. G.; CAMPOS, A. C. L. Terapia Nutricional No Doente Cirúrgico Diabético. In: Antonio Carlos Ligocki Campos. **Tratado de Nutrição e Metabolismo em Cirurgia**. 1º Edição. Local: Rio de Janeiro, 2012. Editora Rubio. Páginas 662–66.

CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the American Medical Association** 55 (25): 2148, 1910. DOI.10.1001/jama.1910.04330250044011.

CARRO, G. V.; SAURRAL, R., SAGÜEZ, F. S.; WITMAN, E. L. Diabetic Foot among Hospitalized Patients in Latin America. **Medicina** 78 (4): 243–51, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30125251>>. Acesso em: Janeiro de 2018.

DINH, T.; TECILAZICH, F., KAFANAS, A.; DOUPIS, J., et al. Mechanisms Involved in the Development and Healing of Diabetic Foot Ulceration. **Diabetes** 61 (11): 2937–47, 2012. DOI.10.2337/db12-0227.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and Wound Repair: When Enough is Enough. **Journal of Leukocyte Biology** 100 (5): 979–84, 2016. DOI.10.1189/jlb.4MR0316-102R.

EL-BAHY, A. A. Z.; ABOULMAGD, Y. M.; ZAKI, M. Diabetex: A Novel Approach for Diabetic Wound Healing. **Life Sci** 207: 332–39, 2018. DOI.10.1016/j.lfs.2018.06.020.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018: Epidemiologia e Impacto Global do Diabetes Mellitus. Páginas 12–18.

FALANGA, V. Wound Healing and Its Impairment in the Diabetic Foot. **Lancet** 366 (9498): 1736–43, 2005. DOI. 10.1016/S0140-6736(05)67700-8.

FINLEY, P.J.; DECLUE, C. E.; SELL, S. A.; DEBARTOLO, J. M.; SHORNICK, L. P. Diabetic Wounds Exhibit Decreased Ym1 and Arginase Expression with Increased

Expression of IL-17 and IL-20. **Advances in Wound Care** 5 (11): 486–94, 2016. DOI.10.1089/wound.2015.0676.

FIROUZI, S.; MAJID, H.A.; ISMAIL, A.; KAMARUDDIN, N. Z. et al. Effect of Multi-Strain Probiotics (Multi-Strain Microbial Cell Preparation) on Glycemic Control and Other Diabetes-Related Outcomes in People with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. **European Journal of Nutrition** 56 (4): 1535–50, 2017. DOI.10.1007/s00394-016-1199-8.

FLESCH, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. D. C. O uso terapêutico dos simbióticos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, 27 (3): 206–9, 2014.

GOREN, I.; MÜLLER, E.; SCHIEFELBEIN, D.; CHRISTEN, U. et al. Systemic Anti-TNFalpha Treatment Restores Diabetes-Impaired Skin Repair in Ob/Ob Mice by Inactivation of Macrophages. **The Journal of Investigative Dermatology**, 127 (9): 2259–67, 2007. DOI.org/10.1038/sj.jid.5700842.

GOULDING, V. The Effects of Diabetes on Collagen within Wound Healing. **The Diabetic Foot Journal**, 18 (2): 75–80, 2015.

GUÉNICHE, A.; BENYACOUB, J.; BUETLER, T. M.; SMOLA, H.; BLUM, S. Supplementation with Oral Probiotic Bacteria Maintains Cutaneous Immune Homeostasis after UV Exposure. **European Journal of Dermatology** 16 (5): 511–17, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101471>>. Acesso em: Janeiro de 2018.

FERIEL, H. R., GHEIT, H., LUDUEC, J. B. L, DIF, F. et al. Oral Probiotic Control Skin Inflammation by Acting on Both Effector and Regulatory T Cells. **PloS One** 4 (3): e4903, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004903>>. Acesso em: Janeiro de 2018.

HANSON, L.; VANDEVUSSE, L.; JERMÉ, M.; ABAD, C. L.; SAFDAR, N. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. **Journal of Midwifery & Women's Health** 61 (3): 339–55, 2016

DOI.10.1111/jmwh.12472.

HENRIQUES, R.S.; STEIMBACH, L.M.; BAPTISTA, D.R.; LENZI, L. et al. Custos Diretos de Diabetes do Tipo 2: Um Estudo de Custos de Doenças Brasileiro. *Int J Technol Avaliar Cuidados de Saúde*. Jan 2018; 34(2):180-8.

HO, J. T. K.; CHAN, C. F. C.; LI, J. C. B. Systemic Effects of Gut Microbiota and Its Relationship with Disease and Modulation. **BMC Immunology**, 16 (March): 21, 2015. DOI.10.1186/s12865-015-0083-2.

HOHENBERGER, M.; CARDWELL, L. A.; OUSSEDIK, E.; FELDMAN, S. R. Interleukin-17 Inhibition: Role in Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease. **The Journal of Dermatological Treatment**, 29 (1): 13–18, 2018.

DOI.10.1080/09546634.2017.1329511.

HOJSAK, I.; SNOVAK, N.; ABDOVIĆ, S.; SZAJEWSKA, H. et al. Lactobacillus GG in the Prevention of Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections in Children Who Attend Day Care Centers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Clinical Nutrition**, 29 (3): 312–16, 2010. DOI.10.1016/j.clnu.2009.09.008.

International Diabetes Federation. Disponível em:

<<https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>>. Acesso em: Setembro de 2019.

HUSEINI, H.F.; RAHIMZADEH, G.; FAZELI, M. R.; MEHRAZMA, M.; SALEHI, M. Evaluation of Wound Healing Activities of Kefir Products. **Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries** 38 (5): 719–23, 2012.

DOI.10.1016/j.burns.2011.12.005.

JOHNSON, T. R.; GÓMEZ, B.I.; MCINTYRE, M. K.; DUBICK, M. A. et al. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, 19 (9), 2018.

DOI.10.3390/ijms19092699.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M.. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Insulin Sensitivity. **Nutrition Research Reviews**, 31 (1): 35–51, 2018. DOI.10.1017/S095442241700018X.

KIRITSI, D.; NYSTRÖM, A. The Role of TGF β in Wound Healing Pathologies. **Mechanisms of Ageing and Development**, 172: 51–58, 2018. DOI.10.1016/j.mad.2017.11.004.

KOUTNIKOVA, H.; GENSER, B.; MONTEIRO-SEPULVEDA, M.; FAURIE, J. C. et al. Impact of Bacterial Probiotics on Obesity, Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Related Variables: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **BMJ Open**, 9 (3): e017995, 2019. DOI.10.1136/bmjopen-2017-017995.

LAZAR, V.; DITU, L. M.; PIRCALABIORU, G. G.; PICU, A. et al. Gut Microbiota, Host Organism, and Diet Triologue in Diabetes and Obesity. **Frontiers in Nutrition**, 6: 21, 2019. DOI.10.3389/fnut.2019.00021.

LEE, J.; RODERO, M. P.; PATEL, J.; MOI, D. et al. Interleukin-23 Regulates Interleukin-17 Expression in Wounds, and Its Inhibition Accelerates Diabetic Wound Healing through the Alteration of Macrophage Polarization. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 32 (4), 2018. DOI.10.1096/fj.201700773R.

LEPÄNTALO, M.; APELQVIST, J.; SETACCI, C.; RICCO, J. B. et al. Chapter V: Diabetic Foot. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, 42 (December): S60–74, 2011. DOI.10.1016/S1078-5884(11)60012-9.

LI, C.; LI, X.; HAN, H.; CUI, H. et al. Effect of Probiotics on Metabolic Profiles in Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. **Medicine** 95 (26): e4088, 2016. DOI.10.1097/MD.0000000000004088.

LOBACH, A. R.; ROBERTS, A.; ROWLAND, I. R. Assessing the in Vivo Data on

Low/No-Calorie Sweeteners and the Gut Microbiota. **Food and Chemical Toxicology**, 124 (February): 385–99, 2019. DOI.10.1016/j.fct.2018.12.005.

LUCCHESI, A. N.; CASSETTARI, L. L.; SPADELLA, C. T. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver That Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. **Journal of Diabetes Research**, 2015: 494578, 2015. DOI.10.1155/2015/494578.

LUKIC, J.; CHEN, V.; STRAHINIC, I.; BEGOVIC, J. et al. Probiotics or Pro-Healers: The Role of Beneficial Bacteria in Tissue Repair. **Wound Repair and Regeneration**, 25 (6): 912–22, 2015. DOI.10.1111/wrr.12607.

MICHAIL, S. K.; STOLFI, A.; JOHNSON, T.; ONADY, G. M. Efficacy of Probiotics in the Treatment of Pediatric Atopic Dermatitis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 101 (5): 508–16, 2008. DOI.10.1016/S1081-1206(10)60290-6.

MIRAGHAJANI, M.; DEHSOUKHTEH, S. S.; RAFIE, N.; HAMEDANI, S. G. et al. Potential Mechanisms Linking Probiotics to Diabetes: A Narrative Review of the Literature. **Sao Paulo Medical Journal**, 135 (2): 169–78, 2017. DOI.10.1590/1516-3180.2016.0311271216.

MOHSENI, S.; BAYANI, M.; BAHMANI, F.; TAJABADI-EBRAHIMI, M. et al. The Beneficial Effects of Probiotic Administration on Wound Healing and Metabolic Status in Patients with Diabetic Foot Ulcer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 34 (3), 2018. DOI.10.1002/dmrr.2970.

NAGANO, T.; OTOSHI, T.; HAZAMA, D.; KIRIU, T. et al. Novel Cancer Therapy Targeting Microbiome. **OncoTargets and Therapy**, 12: 3619–24., 2019 DOI.10.2147/OTT.S207546.

OVIEDO-SOCARRÁS, T.; VASCONCELOS, A. C.; , BARBOSA, I. X.; PEREIRA, N. B.

et al. Diabetes Alters Inflammation, Angiogenesis, and Fibrogenesis in Intraperitoneal Implants in Rats. **Microvascular Research**, 93 (May): 23–29, 2014.

DOI.10.1016/j.mvr.2014.02.011.

PEPPA, M.; STAVROULAKIS, P.; RAPTIS, S.A. Advanced Glycoxidation Products and Impaired Diabetic Wound Healing. **Wound Repair and Regeneration**, 17 (4): 461–72, 2009. DOI.10.1111/j.1524-475X.2009.00518.x.

PERAL, M. C.; RACHID, M. M.; GOBBATO, N. M.; MARTINEZ, M. A. H.; VALDEZ, J. C. Interleukin-8 Production by Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Chronic Infected Leg Ulcers Treated with *Lactobacillus Plantarum*. **Clinical Microbiology and Infection**, 16 (3): 281–86, 2010. DOI.10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x.

RAMANI, K.; BISWAS, P. S.. Interleukin-17: Friend or Foe in Organ Fibrosis. **Cytokine**, 120 (August): 282–88, 2019. DOI.10.1016/j.cyto.2018.11.003.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, 49 (1): 35–43, 2012. DOI.10.1159/000339613.

ROSADO, P.; HSU-TANG, C.; CHAO-MIN, W.; FU-CHAN, W. Influence of Diabetes Mellitus on Postoperative Complications and Failure in Head and Neck Free Flap Reconstruction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Head & Neck**, 37 (4): 615–18, 2015. DOI.10.1002/hed.23624.

SALAZAR, J. J.; WILLIAM, J. E.; TIMOTHY, J. K. Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. **Journal of Diabetes and Its Complications**, 30 (4): 746–52, 2016. DOI.10.1016/j.jdiacomp.2015.12.017.

SALGADO, F. L.; ARTIGIANI-NETO, R.; LOPES-FILHO, G. J. Growth factors and COX2 in Wound Healing: An Experimental Study with Ehrlich Tumors. **ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)** 29 (4): 223–26, 2016. DOI.10.1590/0102-6720201600040003.

SASAKI, J. R., ZHANG, Q.; SCHWACHA, M. G. Burn Induces a Th-17 Inflammatory Response at the Injury Site. **Burns : Journal of the International Society for Burn**

Injuries, 37 (4): 646–51, 2011. DOI.10.1016/j.burns.2011.01.028.

SINGH, N. Preventing Foot Ulcers in Patients With Diabetes. **JAMA**, 293 (2): 217, 2005. DOI.10.1001/jama.293.2.217.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, H.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, 58 (1–2): 81–94, 2017. DOI.10.1159/000454919.

SPICHLER, E. R.; SPICHLER, D.; LESSA, I.; COSTA, A. et al. Capture-Recapture Method to Estimate Lower Extremity Amputation Rates in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, 10 (5): 334–40, 2001. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892001001100007>.

TAKAGI, N.; KAWAKAMI, K.; KANNO, E., TANNO, H. et al. IL-17A Promotes Neutrophilic Inflammation and Disturbs Acute Wound Healing in Skin. **Experimental Dermatology**, 26 (2): 137–44, 2017. DOI.10.1111/exd.13115.

TELLECHEA, A.; LEAL, E. C.; KAFANAS, A.; AUSTER, M. E., et al. Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. **Diabetes**, 65 (7): 2006–19, 2016. DOI.10.2337/db15-0340.

TSIOURIS, C. G.; KELESI, M.; VASILOPOULOS, G.; KALEMIKERAKIS, I.; PAPAGEORGIOU, E. G. The Efficacy of Probiotics as Pharmacological Treatment of Cutaneous Wounds: Meta-Analysis of Animal Studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 104 (June): 230–39, 2017. DOI.10.1016/j.ejps.2017.04.002.

VATANEN, T.; FRANZOSA, E. A.; SCHWAGER, R.; TRIPATHI, S. et al. The Human Gut Microbiome in Early-Onset Type 1 Diabetes from the TEDDY Study. **Nature** 562 (7728): 589–94, 2018. DOI.10.1038/s41586-018-0620-2.

VIZZOTTO JUNIOR, A. O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D. L. H.; CAMPOS, A. C. L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **J Bras Patol e Med Lab** Jun;39(2):143–9, 2003.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acessado em: Janeiro de 2018.

WANG, J. P.; CAI, C.; DU, J. L.; SHI, H. Q. et al. Role of Interleukin-17 in the Pathogenesis of Perianal Abscess and Anal Fistula: A Clinical Study on 50 Patients with Perianal Abscess. **ANZ Journal of Surgery**, 89 (3): 244–47, 2019.

DOI.10.1111/ans.14874.

WILKINS, T.; SEQUOIA, J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. **American Family Physician** 96 (3): 170–78, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28762696>>. Acesso em: Janeiro de 2018.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B.. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. **Nature Reviews Endocrinology**, 14 (2): 88–98, 2018. DOI.10.1038/nrendo.2017.151.

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 295

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

IDENTIFICAÇÃO
Suplementação perioperatória de probiótico na cicatrização de feridas em ratos diabéticos
PROFESSOR ORIENTADOR
THAIS ANDRADE COSTA CASAGRANDE
INSTITUIÇÃO DO PESQUISADOR
Universidade Positivo
ALUNOS ENVOLVIDOS
Nenhum aluno envolvido
OBJETIVO
<p>Geral: Verificar se o uso de probióticos, via oral, melhora feridas cutâneas em ratos, mediante densitometria do colágeno.</p> <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Avaliar a alteração nos marcadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), interleucina 6 (IL-6), interleucina17 (IL17) e fator de crescimento vascular (VGEF) por imunohistoquímica; * Avaliar histologicamente (por HE) o grau de cicatrização epitelial nas 3 fases de cicatrização: inflamatória, proliferativa e de maturação ; * Avaliar densitometria do colágeno neoformado, tipo I e tipo III * Avaliar a morfometria das cicatrizes em tempos diferentes (3, 7, e 10 dias); Os ratos serão submetidos a uma de lesões cutânea – feridas excisionais dorsais para estudos de planigrafia, por punch de 1,5cmx1,5cm. * Avaliar o peso dos animais em 4 tempos (início, 3, 7 e 10 dias), afim da verificar se o uso do probiótico altera o peso dos animais. Investigar in vivo os efeitos tóxicos de uma dieta materna contendo Benzoato de Sódio e a sua repercussão na prole adulta de ratos Wistar.
SÍNTESE DO PROJETO
<p>A população mundial de diabéticos totaliza 387 milhões de pessoas, que frequentemente são submetidos a procedimentos cirúrgicos por complicações crônicas decorrentes da hiperglicemia, e apresentam maior risco de complicações pós-operatórias pela dificuldade de cicatrização. A regulação sistêmica da inflamação desempenha papel importante na cicatrização de feridas, e a microbiota intestinal interage com a inflamação do hospedeiro. A hipótese do presente trabalho é que a suplementação com probióticos poderia favorecer a cicatrização por modular a resposta inflamatória, particularmente nos pacientes diabéticos nos quais a dificuldade de cicatrização está associada com a hiperinflamação na fase inflamatória, que impede evolução para as demais fases da cicatrização. Os experimentos ocorrerão no Biotério da Universidade Positivo, sob temperatura controlada (22 ± 1° C) e 12 horas escuro/ciclos de luz. Serão utilizados 72 ratos adultos, obtidos no biotério da Universidade Positivo, que serão distribuído em seis grupos de 12 ratos cada, sendo:</p> <p>Grupo 1 - Ratos diabéticos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 3 de pós-operatório</p> <p>Grupo 2 - Ratos diabéticos com suplementação perioperatória de probiótico Lactofos avaliados no dia 3</p>


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
 Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
 Fax: (41) 317-3030
 ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 295
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

de pós-operatório

Grupo 3 - Ratos diabéticos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 7 de pós-operatório

Grupo 4 - Ratos diabéticos com suplementação perioperatória de probiótico Lactofos avaliados no dia 7 de pós-operatório

Grupo 5 - Ratos diabéticos controle suplementados com maltodextrina avaliados no dia 10 de pós-operatório

Grupo 6 - Ratos diabéticos com suplementação perioperatória de probiótico Lactofos avaliados no dia 10 de pós-operatório

Durante o período experimental, os ratos serão acomodados individualmente em caixas de polipropileno apropriadas, com cama de cepilho, recebendo água e ração Presence® (Purina) ad libitum ao longo de todo estudo. Os grupos receberão o probiótico ou maltodextrina por 5 dias antes da realização da incisão e manterão este consumo até o dia do eutanásia, no 3o, 7o ou 10o dia de pós operatório. A dosagem será de 100mg de probiótico ou placebo por dia.

O probiótico optado para este estudo é o Probiatop®.

A administração de probiótico ou placebo será feita via oral, com auxílio de uma espátula, adaptado para este trabalho. A espátula será colocada em sua boca, contendo a dose apropriada do probiótico ou da maltodextrina.

Os ratos serão induzidos ao diabetes 72 horas antes de iniciar suplementação pré-operatório com probiótico ou placebo. A indução será com aloxana, método que apresenta melhor eficácia com menor mortalidade. Os animais serão submetidos a jejum de 24 horas (para aumentar susceptibilidade ao DM), pesagem e dosagem da glicemia na pré-indução. Os níveis de glicose serão avaliados retirando uma gota de sangue mediante secção e ordenha da cauda, que será colocada sobre fita reagente e avaliada pelo glicosímetro One Touch Select Simple® (Johnson e Johnson, Brasil). Os ratos serão submetidos a anestesia por inalação de isoflurano em campânula de vidro e depois mantidos em decúbito dorsal, para depois receber injeção intraperitoneal de aloxana monohidratada. A aloxana 2% será diluída em solução fisiológica e aplicada em dose única de 120mg/kg, que é a dose mais eficaz para obtenção de maior número de animais diabéticos e menor incidência de óbitos³⁸. Após 1h30min a alimentação será reintroduzida. A indução ao DM deverá ser confirmada, sendo que glicemia de jejum >200mg/dl será necessária para o diagnóstico (a glicemia normal para ratos Wistar adulto é de 50 à 135mg/dl).

O controle do peso dos animais será realizado após a aclimação e nos dias, antes da indução do diabetes, no dia da incisão e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório, para verificar se a indução ao diabetes ou o uso do probiótico poderá alterar o peso dos animais. Será utilizada balança eletrônica (AM 5500® Marte, São Paulo, SP) para a aferição e a unidade utilizada será o grama (g).

No dia do procedimento cirúrgico para realização da ferida dorsal, os ratos ficarão em jejum por 4 horas e serão induzidos à anestesia por inalação de isoflurano em campânula de vidro e depois mantidos em decúbito dorsal, com associação de cloridrato de quetamina 80mg/kg e cloridrato de xilasina 10mg/kg por via intramuscular. O animal anestesiado será fixado à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com elásticos de látex, colocando os quatro membros em extensão para expor o campo operatório. Em seguida será realizada a tricotomia da região dorsal e antissepsia.

Os ratos serão submetidos a uma ferida quadrada por punch medindo 1,5x1,5cm, para avaliação morfológica da contração da ferida e estudo de reepitelização. As feridas serão deixadas abertas para cicatrizar por segunda intenção (Fig 4). Ao fim do procedimento cirúrgico, os ratos serão mantidos em ambiente até completa recuperação. Ao término do ato operatório cada rato será colocado em gaiola isolada até completa recuperação anestésica. Após a recuperação anestésica, cada rato será recolocado em sua gaiola de origem, onde voltarão a receber água e ração ad libitum após 2 horas do procedimento. A analgesia será realizada com uso de acetaminofeno líquido em dose diária de 200mg/kg/dia por via oral, até o 4o dia de pós-operatório.

As feridas serão macroscopicamente avaliadas por fotografias digitais padronizadas realizadas nos dias 1,3,5, 7 e 10 para posterior análise das taxas de contração da ferida com software específico. As feridas


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
 Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
 Fax: (41) 317-3030
 ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 295
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

serão fotografadas a uma distância padronizada, apoiando-se a câmara fotográfica sobre uma régua de 15 cm. Outra régua graduada em milímetros será posicionada sobre o dorso superior do rato, no mesmo nível da lesão, com identificação do respectivo animal. As fotos serão feitas em ambiente iluminado e sem flash. As áreas das feridas excisionais serão calculadas usando o ImageJ software (National Institutes of Health, EUA).

No 3o, 7o e 10o dia de pós-operatório os ratos serão submetidos à eutanásia em sistema fechado de câmpula de vidro com isoflurano. Imediatamente após a constatação do óbito, cada rato será submetido à excisão da ferida. A glicemia de jejum deverá ser avaliada antes da eutanásia para confirmar manutenção do estado diabético.

As lesões serão excisadas com margem de 1cm e armazenadas em formalina 10%, para posterior estudo histológico com HE, imunistoquímico e densitometria do colágeno. Todos os estudos serão analisados no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), com auxílio da Dra Lúcia de Noronha. As lesões excisadas serão emblocadas paralelamente em parafina para posterior construção de blocos de Tissue Microarray, para otimizar análise imunistoquímica. Os blocos de Tissue Microarray facilitam a comparação de amostras e economizam tempo e material.

A densitometria do colágeno consiste em identificar e quantificar o colágeno maduro (tipo 1) e imaturo (tipo 3), utilizando-se a colocação de Picosirius Red, microscopia ótica sob luz polarizada e realizando-se análise de imagens em software (Image-Pro-Plus 4.5; Mídia cibernética, São Paulo, Brasil). A percentagem de componentes de colágeno apresentados em vermelho e laranja (tipo 1) e verde (tipo 3) será então calculada.

O estudo histológico será por coloração por Hematoxilina-Eosina (HE), para determinar grau de cicatrização. Em seguida serão avaliadas individualmente as reações imunistoquímicas, com o anticorpo primário, que se liga ao antígeno específico. Os antígenos avaliados serão: TNF-a, IL6, IL17 e IL10. O antígeno é reconhecido por um anticorpo secundário, ao qual também se liga um complexo enzimático (streptavina-biotina-peroxidase). Nas reações positivas, a peroxidase transforma a substância cromogênica, em coloração específica, a qual é reconhecida e quantificada pelo sistema, sendo esta coloração específica para cada um destes marcadores e determinada por seus fabricantes específicos.

COMENTÁRIOS DO RELATOR

Sem comentários adicionais

PARECER

Recomenda a Aprovação