

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Marina Barcelos de Miranda

**EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM FIBRAS SOLÚVEIS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS POR *Pseudomonas aeruginosa* EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

BELO HORIZONTE - MG

2023

Marina Barcelos de Miranda

**EFEITOS DE UMA DIETA RICA EM FIBRAS SOLÚVEIS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS POR *Pseudomonas aeruginosa* EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas..

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucíola da Silva Barcelos - Laboratório de Angiogênese e Células-tronco, departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

Co-orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

Co-orientador: Flaviano dos Santos Martins - Lab. Agentes Bioterapêuticos;

BELO HORIZONTE - MG

2023

043

Miranda, Marina Barcelos de.

Efeitos de uma dieta rica em fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos diabéticos [manuscrito] / Marina Barcelos de Miranda. – 2023.

152 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos. Co-orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fenômenos Fisiológicos da Pele. 2. Diabetes Mellitus. 3. Cicatrização. 4. Pectinas. I. Barcelos, Lucíola da Silva. II. Martins, Flaviano dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE Nº 372 DE MARINA BARCELOS DE MIRANDA

"Efeitos de Uma Dieta Rica em Fibras Solúveis na Cicatrização de Feridas Cutâneas Infectadas por Pseudomonas aeruginosa em Camundongos Diabéticos"

MARINA BARCELOS DE MIRANDA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **27 de abril de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Eline Lima Borges, ENF/UFMG

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes, ICB/ UFMG

Prof. Dr. Puebla Cassini Vieira, DCBIO/UEMG

Profa. Dra. Raquel Alves Costa, DCNAT/UFSJ

Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos, ICB/ UFMG - Orientador

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, ICB/ UFMG - Co-orientador

Belo Horizonte, 27 de abril de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 09/05/2023, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 09/05/2023, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Alves Costa, Usuário Externo**, em 09/05/2023, às 22:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciola da Silva Barcelos, Professora do Magistério Superior**, em 15/05/2023, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eline Lima Borges, Professora do Magistério Superior**, em 16/05/2023, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Puebla Cassini Vieira, Usuário Externo**, em 19/05/2023, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2271091** e o código CRC **FB3B43FF**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar, me guiar e por ter colocado pessoas incríveis no meu caminho.

À toda minha família, em especial, aos meus pais, Ana Maria Barcelos Guimarães, Antônio Timóteo de Miranda e Lourival Soares Guimarães (*in memoriam*) pela educação e criação que recebi, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus preciosos amigos, Sarah, Thalyta, Luanna, Antônia, Katlhin, Williane, Pâmela, Aline, Priscila, Elaine, Ildernandes e Airton, pelo apoio, pelo carinho e pela compreensão das ausências.

À equipe do Laboratório de Angiogênese e Células-tronco, Laura, Vitória, Michelly, Gilmara, Ana, Lígia, Mariane, Daniele, Alan, Alexandre, Elder e Lucas. Obrigada pelos momentos de trabalho em equipe, pelos conselhos, pela leveza que me proporcionaram, pelas risadas, comilanças e amizade. Em especial, gratidão à Laura, Vitória e Michelly, sem as quais este projeto não seria possível. Foi uma honra ter trabalhado com vocês.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG), aos professores, funcionários, equipe da limpeza, da manutenção e aos alunos do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (Departamento de Microbiologia). À minha orientadora, Lucíola da Silva Barcelos e meu co-orientador Flaviano dos Santos Martins pela confiança e orientações.

Aos financiadores e colaboradores, Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, do Laboratório de Genética Molecular de Probióticos e Patógenos, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução – ICB/UFMG; à Prof^a. Dr^a. Adaliene Versiani Matos Ferreira, do Laboratório de Imunometabolismo, Departamento de Nutrição - Enfermagem / UFMG; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

As feridas diabéticas apresentam a cicatrização prejudicada e colonização por bactérias que comprometem ainda mais o processo de cicatrização. Nossa hipótese é que as ações locais das fibras solúveis na microbiota intestinal têm um impacto sistêmico na cicatrização da pele. Avaliamos os efeitos de uma dieta enriquecida com pectina na cicatrização de células de feridas excisionais usando um modelo experimental murino de uma ferida diabética infectada por *Pseudomonas aeruginosa*. Camundongos C57BL6 receberam uma dieta padrão suplementada com pectina e foram divididos nos seguintes grupos: saudáveis, diabéticos e diabéticos com feridas infectadas. O diabetes foi induzido com estreptozotocina e confirmado pela presença de glicosúria e intolerância à glicose intraperitoneal. Em seguida, as dietas experimentais foram fornecidas. Após 14 dias, as feridas foram confeccionadas e inoculadas com *P. aeruginosa*. Após 7 e 14 dias de ferimento, os animais foram sacrificados e as feridas, sangue e fezes foram coletados. A pectina não alterou o peso. A taxa de sobrevivência dos camundongos saudáveis foi de 100%, e a dos outros grupos foi bem menor, com exceção do grupo diabético que recebeu pectina e teve uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 60%. A pectina otimizou o fechamento de feridas em grupos saudáveis e diabéticos, mesmo na presença de infecção. Independentemente da dieta aplicada, as feridas diabéticas infectadas apresentaram a mesma carga bacteriana. Corroborando com esses dados, o crescimento in vitro de *P. aeruginosa* não foi afetado pela microbiota aeróbia da pele, independentemente de a pele ter sido obtida de animais que receberam ou não dieta rica em pectina. Histologicamente, a pectina promoveu a redução do tecido de granulação nas feridas de animais saudáveis (7º dia) e animais diabéticos sem infecção (14º dia), mas não em feridas infectadas, e estimulou a epitelização e melhorou o escore total das feridas de todos os grupos, independentemente da presença de infecção. Apenas no grupo de diabéticos infectados suplementados com pectina foi observado aumento do infiltrado inflamatório no 7º dia após a lesão. A dieta rica em pectina proporcionou maior contagem de capilares nas feridas dos grupos diabéticos, independentemente da presença de infecção. Sistemicamente, a dieta rica em pectina não influenciou os níveis séricos de proteínas totais, albumina e creatinina de nenhum grupo. No entanto, promoveu aumento significativo nos níveis de triglicerídeos e VLDL em animais diabéticos com feridas não infectadas. As análises de sequenciamento metagenômico baseado no rRNA 16S mostraram mudanças relevantes nas comunidades microbianas locais do cólon e remotas da pele. A dieta rica em pectina aumentou a abundância relativa do filo *Bacterioidetes* e reduziu *Firmicutes* no intestino de animais diabéticos. Na infecção da ferida, a pectina promoveu novamente o aumento relativo do filo *Bacterioidetes* e reduziu *Firmicutes* nas fezes de animais diabéticos. Considerando os efeitos remotos sobre a microbiota cutânea, a pectina promoveu aumento relativo no filo *Proteobacteria* e reduziu *Firmicutes* na pele intacta do diabético, mas não nas feridas desses animais. Porém, em nítido contraste, na presença de infecção, a pectina promoveu redução na abundância relativa no filo *Proteobacteria* e aumentou *Firmicutes* nas feridas de camundongos diabéticos. Nossos dados sugerem que uma dieta rica em pectina aumenta a sobrevivência de animais diabéticos e acelera o fechamento de suas feridas na pele, mesmo na presença de infecção. O efeito modulador da pectina suplementada oralmente na microbiota do cólon e da pele também foi evidenciado. Esses dados sugerem um potencial efeito prebiótico dessa fibra solúvel na cicatrização de feridas cutâneas.

Palavras-chave: pectina; fibras solúveis; ferida diabética infectada; microbiota; feridas crônicas.

ABSTRACT

Diabetic wounds have impaired healing dynamics and are often colonized by bacteria, which further compromise the healing process. Our group has studied the use of soluble fibers as healing stimulators. We hypothesized that the local actions of soluble fibers in the intestinal microbiota have a systemic impact on skin healing. We evaluated the effects of a pectin-enriched diet on the healing of excisional wound cells using an experimental murine model of a diabetic wound infected with *Pseudomonas aeruginosa*. C57BL6 mice received a standard diet supplemented with pectin and were divided into the following groups: healthy, diabetic, and diabetic with infected wounds. Diabetes was induced using streptozotocin and confirmed by the presence of glycosuria and intraperitoneal glucose intolerance. Immediately thereafter, experimental diets were provided. Then, after 14 days, wounds were prepared and inoculated with *P. aeruginosa*. After 7 and 14 days of wounding, the animals were euthanized and the wounds, blood, and feces were collected. Pectin did not alter weight. The survival rate of the healthy mice was 100%, and that of the other groups was much lower, with the exception of the diabetic group that received pectin and had a survival rate of approximately 60%. Pectin optimized wound closure in both healthy and diabetic groups, even in the presence of infection. Even so, regardless of the applied diet, the infected diabetic wounds showed the same bacterial load. Corroborating this data, in vitro growth of *P. aeruginosa* was not affected by the aerobic skin microbiota, regardless of whether the skin was obtained from animals that received or not a diet rich in pectin. Histologically, pectin promoted the reduction of granulation tissue in the wounds of healthy animals (7th day) and diabetic animals without infection (14th day), but not in infected wounds, and stimulated epithelialization and improved the total score of the wounds of all groups, regardless of the presence of infection. Interestingly, only in the infected diabetic group supplemented with pectin, an increase in the inflammatory infiltrate was observed on the 7th day after the injury. The pectin-rich diet provided higher capillary counts in the wounds of diabetic groups, regardless of the presence of infection. Systemically, the pectin-rich diet did not influence the serum levels of total proteins, albumin, and creatinine of any group. However, it promoted a significant increase in triglyceride and VLDL levels in diabetic animals with uninfected wounds. The 16S rRNA-based metagenomic sequencing analyses showed relevant changes in the local colonic and remote skin microbial communities. The pectin-rich diet increased the phylum Bacteroidetes and reduced Firmicutes in the intestine of both healthy and diabetic animals. In the presence of skin wounds, pectin maintained this effect only in healthy mice. Interestingly, under wound infection, pectin again promoted the increase in the phylum Bacteroidetes and reduced Firmicutes in the feces of diabetic animals. Considering the remote effects on cutaneous microbiota, pectin increased the phylum Proteobacteria and reduced Firmicutes in the intact diabetic skin, but not in the wounds from these animals. However, in sharp contrast, in the presence of infection, pectin reduced the phylum Proteobacteria and increased Firmicutes in the wounds of diabetic mice. Overall, our data suggest that a pectin-rich diet increases the survival of diabetic animals and accelerates the closure of their skin wounds, even in the presence of infection. The modulatory effect of oral-supplemented pectin on the colonic and skin microbiota was also evidenced. These data suggest a potential prebiotic effect of this soluble fiber on cutaneous wound healing.

Keywords: pectin; soluble fiber; infected diabetic wound; microbiota; chronic wounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Fisiologia da pele	11
2.2. Cicatrização de feridas	13
2.3. Feridas crônicas – A ferida diabética	15
2.4. Diabetes <i>mellitus</i>	18
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a infecção da ferida diabética	20
2.6. Pectina – Uma fibra alimentar	23
2.7. Pectina como potencial alvo terapêutico e prebiótico emergente	25
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1. Modelo experimental	31
5.2. Grupos e delineamento experimental	31
5.3. Indução do Diabetes <i>mellitus</i>	32
5.4. Teste de glicosúria e teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG)	33
5.5. Dietas experimentais	34
5.6. Confeção das feridas	35
5.7. Padronização do modelo de ferida infetada	36
5.8. Preparo da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e infecção das feridas	38
5.9. Peso corporal, ingestão alimentar e análise de sobrevivência	39
5.10. Análise da cinética de fechamento das feridas	39
5.11. Eutanásia e coleta das feridas	39
5.12. Perfil total de leucócitos circulantes	39
5.13. Dosagem de proteínas totais, albumina e creatinina	40

5.14. Análise de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL	40
5.15. Avaliação da carga bacteriana das feridas	41
5.16. Plaqueamento de tecido hepático	41
5.17. Técnica de halo inibição	42
5.18. Análise histológica	42
5.19. Contagem de capilares	43
5.20. Processamento de material e isolamento da enzima para dosagem de NAG e MPO	43
5.21. Ensaio enzimático para avaliação da atividade NAG nas feridas	44
5.22. Ensaio enzimático para avaliação da atividade de MPO nas feridas	44
5.23. Metagenômica	45
5.23.1. Coleta de amostras	45
5.23.2. Extração de DNA de fezes e pele para metagenômica	47
5.23.3. Isolamento e sequenciamento de DNA	47
5.23.4. Análise de bioinformática e taxonomia	47
5.23.5. Análise ecológica	48
5.24. Análise estatística	48
6. RESULTADOS	49
6.1. Confirmação do diabetes	49
6.2. Peso ponderal	50
6.3. Ingestão alimentar	52
6.4. Análise de sobrevivência	54
6.5. Análise de fechamento das feridas	54
6.6. Análise do plaqueamento e teste de halo dispersão	57
6.7. Análise histológica das feridas	58
6.7.1. Infiltrado inflamatório das feridas	58
6.6.2. Espessura da crosta	59
6.7.3. Tecido de granulação	60
6.7.4. Epitelização	61
6.7.5. Escore total	62
6.7.6. Fotomicrografias de pele basal e das feridas coletadas	63
6.7.7. Contagem de capilares	67
6.8. Leucócitos totais circulantes	68

6.9. Infiltrado de macrófagos nas feridas	69
6.10. Infiltrado de neutrófilos nas feridas	70
6.11. Proteínas totais, albumina e creatinina	71
6.12. Triglicérides, colesterol total, VLDL, LDL e HDL	72
6.13. Metagenômica de fezes	74
6.13.1. Análise de fezes em momento anterior à administração das dietas experimentais	74
6.13.2. Análise de fezes após duas semanas de dieta experimental	77
6.13.3. Análise de fezes após quatro semanas de dieta experimental	83
6.14. Metagenômica de pele	101
6.14.1 Análise de pele basal após duas semanas de dieta experimental	101
6.14.2 Análise de pele após quatro semanas de dieta experimental	104
6.15. Compilado dos resultados	113
 7. DISCUSSÃO	 116
 8. CONCLUSÃO	 133
 9. REFERÊNCIAS	 134

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009) e configura um dos principais fatores que podem influenciar na dinâmica da cicatrização de feridas (CAMPOS *et al.*, 2007). A etiologia das feridas crônicas é multifatorial e nem todos os mecanismos são conhecidos, em função da diversidade de fatores associados. Denomina-se feridas crônicas aquelas que não conseguem progredir e cumprir de forma adequada todas as fases ordenadas do processo cicatricial, se perpetuando em pelo menos alguma das fases (SIDDIQUI; BERNSTEIN 2010; FRYKBERG; BANKS, 2015; ZHAO *et al.*, 2016). O pé diabético é uma das complicações crônicas mais comuns da doença, chegando a atingir cerca de 15% dos diabéticos, resultando muitas vezes em perda de mobilidade, amputações, isolamento social e depressão (BADESCU *et al.*, 2016; OROSCO *et al.*, 2019).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (PA) é o tipo mais frequentemente associado às feridas diabéticas. Em indivíduos saudáveis não causa grandes prejuízos, porém, estabelece uma infecção robusta e persistente em feridas diabéticas, causando graves danos aos tecidos e várias complicações (SIDDIQUI; BERNSTEIN 2010; GOLDFUSKY *et al.*, 2015; GIANINO *et al.*, 2018). Segundo dados do Ministério da Saúde, a Pesquisa Nacional de Saúde e a VIGITEL indicam a prevalência de diabetes na população brasileira, em 2013, de 6,2 e 6,9% respectivamente (SAÚDE, 2016). Segundo Orosco *et al.* (2019), no Brasil, cerca de 22.244 pacientes diabéticos foram hospitalizados para procedimentos relacionados ao pé diabético em 2014 (OROSCO *et al.*, 2019).

O tratamento das feridas diabéticas crônicas inclui uma abordagem multidisciplinar, que envolve controle glicêmico, tratamento das comorbidades, exame vascular, avaliações hemodinâmicas e combate das infecções bacterianas (FRYKBERG; BANKS, 2015; GOLDFUSKY *et al.*, 2015). Diante deste cenário desafiador, há várias pesquisas em desenvolvimento visando otimizar o tratamento das feridas infectadas crônicas. Dentre estas estratégias, destaca-se a possibilidade de modulação do microbioma, que pode repercutir na cicatrização cutânea (SCALES; HUFFNAGLE, 2013; JOHNSON *et al.*, 2018).

A qualidade da microbiota intestinal é crucial para o bom funcionamento do sistema imunológico, em contrapartida, uma microbiota desequilibrada predispõe a patologias (HAND *et al.*, 2016; FRIEDRICH *et al.*, 2017). A produção de metabólitos, como os Ácidos Graxos de

Cadeia Curta (AGCC), é frequentemente reduzida em indivíduos com diabetes, disbiose, obesidade, distúrbios autoimunes e câncer (NAGPAL *et al.*, 2018). O consumo de prebióticos resulta em mudanças específicas no intestino e na produção de AGCC, tornando o ambiente mais favorável para o crescimento de bactérias benéficas e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (HUTKINS *et al.*, 2016; DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019).

Quanto à microbiota da pele, sabe-se que a colonização bacteriana ocorre em todas as feridas, agudas e crônicas (SCALES; HUFFNAGLE, 2013), mas o perfil bacteriano das feridas de indivíduos saudáveis apresenta diferenças significativas quando comparado ao perfil de feridas de pacientes diabéticos (XU; HSIA, 2018). A microbiota da pele tem um papel fundamental na resposta inflamatória e este conhecimento tem direcionado estratégias para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para as feridas crônicas infectadas (SCALES; HUFFNAGLE, 2013; JOHNSON *et al.*, 2018). Moduladores da microbiota, como os prebióticos, podem ser úteis na manutenção e restauração de uma microbiota cutânea saudável, beneficiando a cicatrização de feridas crônicas (NAGPAL *et al.*, 2018). No contexto de doenças inflamatórias de pele e dermatites, por exemplo, os prebióticos são muitas vezes indicados por favorecerem bactérias convenientes e proporcionarem a descolonização de bactérias patogênicas; sua utilização está relacionada a uma menor incidência de alergias de pele em crianças (PELUCCHI *et al.*, 2012).

A pectina, classificada como fibra alimentar solúvel e candidato a prebiótico, é proveniente de frutas e vegetais, modula o ambiente intestinal, estimula a produção de AGCC, favorece o crescimento de bactérias benéficas e inibe o crescimento de bactérias patogênicas, resultando em efeitos benéficos locais e sistêmicos (LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018; DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019; LOLOU; PANAYIOTIDIS, 2019). Em publicação recente, Canesso *et al.* (2023) avaliaram os efeitos das dietas ricas em fibras solúveis na cicatrização de feridas excisionais em camundongos GPR43 e GP43^{-/-}. Observaram que o fechamento das feridas foi acelerado nos camundongos submetidos a dieta rica em fibras solúveis e que este efeito é dependente do receptor GPR43 com ativação do inflamassoma NLRP4 e produção de IL18.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano em termos de extensão, é contínua com as membranas mucosas, reveste a superfície do corpo e se renova continuamente. Exerce muitas funções vitais, como prevenção à perda excessiva de água, termorregulação e proteção contra agentes agressores, sejam eles agressores externos, poluição, exposição ultravioleta, agentes físicos, químicos e infecções. A pele ainda é capaz de estabelecer um equilíbrio dinâmico e responder a alterações no ambiente externo e interno. Para tal, conta com controle hemodinâmico, hidroeletrolítico, termorregulação, metabolismo energético, sistema sensorial e de defesa contra agressores externos. A pele e suas estruturas derivadas pertencem ao sistema tegumentar. Os anexos cutâneos incluem cabelos, pelos, músculo eretor do pelo, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas (KANITAKIS, 2002; KOLARSICK *et al.*, 2011).

A pele é constituída por três camadas principais: 1) epiderme, que é a mais superficial e é subdividida em outras camadas; 2) derme, que é uma camada intermediária; e 3) hipoderme, que é a camada mais profunda. A epiderme é composta predominantemente por melanócitos, queratinócitos, células de Langerhans e células de Merkel. É comumente dividida em quatro camadas, de acordo com a morfologia, posição e diferenciação dos queratinócitos, são elas: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (MCLAFFERTY *et al.*, 2012; KOLARSICK *et al.*, 2011).

A camada basal ou germinativa é a mais profunda da epiderme, é composta por uma única linha de queratinócitos colunares, e ainda, melanócitos e células de Merkel, sendo a única camada da epiderme contendo células capazes de realizarem divisão celular. As células resultantes da divisão repõem as células da própria camada e parte migra para as camadas superiores, mas nem todas as células basais possuem potencial de divisão. A nutrição do estrato basal é proveniente do suprimento sanguíneo da camada inferior, a derme. Contudo, à medida que estas células migram para as camadas superiores, eles receberem menos nutrição e morrem (MCLAFFERTY *et al.*, 2012; KOLARSICK *et al.*, 2011).

A camada espinhosa, subjacente à camada basal, possui de cinco a treze camadas de células espinhosas, que são queratinócitos histologicamente diferenciados que possuem projeções que se assemelham a espinhos quando vistos sob um microscópio. À medida que as

células se movem no estrato, eles perdem sua capacidade de divisão e sofrem uma mudança de formato, tornando-se poliédricas, o que contribui para a forma e flexibilidade características da pele. Desmossomos estão presentes nos espaços intracelulares entre as células espinhosas, fornecendo resistência e estabilidade ao tecido. Esta camada ainda conta com a presença de células de Langerhans, especializadas na resposta imunológica (KOLARSICK *et al.*, 2011; MCLAFFERTY *et al.*, 2012)

A camada granulosa, subjacente à camada espinhosa, é formada por três a cinco camadas de células, que são mais longas e achatadas. Os queratinócitos possuem em seu interior grânulos de cerato-hialina, que promovem cornificação ou queratinização do estrato. Assim, nesta camada, as células sofrem apoptose, perdem seu núcleo e se tornam queratinizadas. A queratina é a proteína responsável pela flexibilidade e resistência deste estrato (KOLARSICK *et al.*, 2011; MCLAFFERTY *et al.*, 2012).

A camada lúcida é encontrada somente em regiões do corpo que possuem uma camada grossa de pele, por exemplo, a palma das mãos e as solas dos pés. Esta camada contém três a cinco camadas de queratinócitos mortos, achatados e ricos em queratina (MCLAFFERTY *et al.*, 2012; KOLARSICK *et al.*, 2011).

A camada córnea é a mais superficial da epiderme, é repleta de queratina e é formada por células mortas, achatadas, denominadas corneócitos. Esta camada fornece proteção mecânica, proteção contra o calor, evita a perda de água e a invasão de agentes estranhos, além de passar por um processo natural diário de descamação, que culmina na remoção do acúmulo de células mortas na superfície da pele. (MCLAFFERTY *et al.*, 2012).

A derme se encontra entre a epiderme e o tecido subcutâneo e compreende a maior parte da pele. Esta camada fornece nutrientes e suporte físico para a epiderme, fornece flexibilidade, elasticidade, resistência à tração, proteção contra lesões mecânicas, retém água, auxilia na regulação térmica e possui receptores sensoriais. É composta por matriz extracelular rica em fibras colágenas, elásticas e reticulares, vasos sanguíneos, terminações nervosas e anexos epidérmicos. Quanto aos elementos celulares, é composta por células mesenquimais primitivas, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos, que migram para a derme em resposta à estímulos. A derme é composta por duas camadas: a papilar, mais superficial, composta por tecido conjuntivo frouxo, rica em vasos e terminações nervosas, como os corpúsculos de Meissner e Krause, e a reticular que é a mais profunda e mais espessa, composta por tecido conjuntivo denso não modelado, é rica em colágeno e fibras elásticas, possui

mecanorreceptores e vasos sanguíneos (MCLAFFERTY *et al.*, 2012; KOLARSICK *et al.*, 2011). A hipoderme é a camada mais profunda da pele, também conhecida como panículo adiposo. Os lóbulos de células de gordura (lipócitos) são separados entre si por fibras, colágeno e vasos sanguíneos. Esta camada é constituída de adipócitos, colágeno, estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Desempenha ação no isolamento térmico, proteção contra traumas, mobilidade e reserva energética (KOLARSICK *et al.*, 2011).

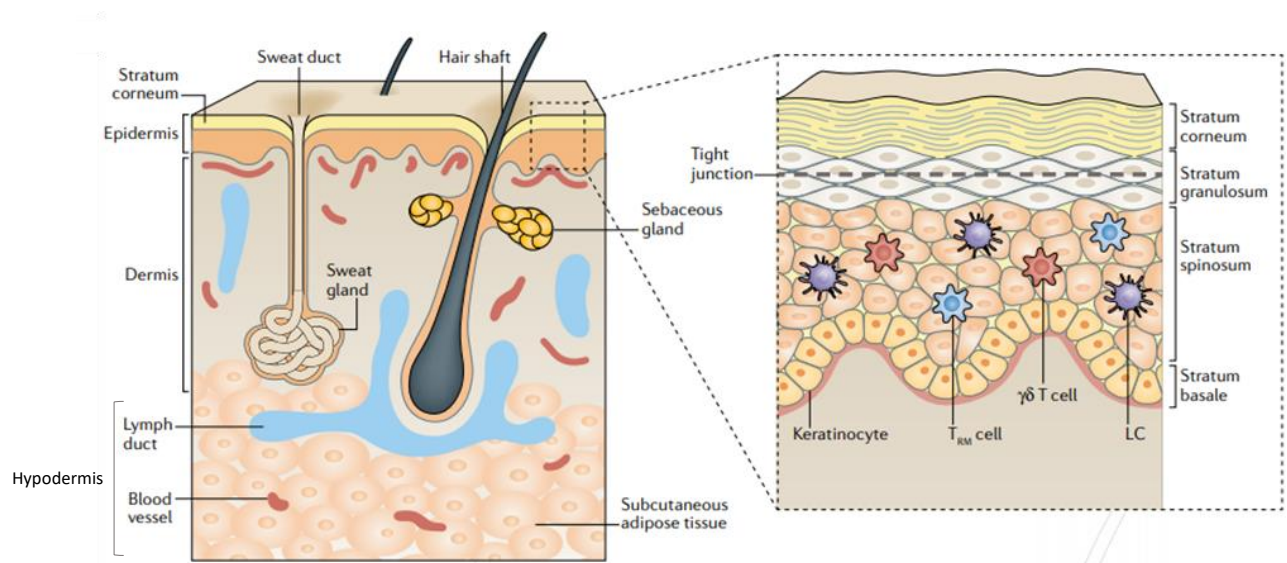


Figura 1: Estruturas e camadas da pele. Imagem retira e adaptada de KABASHIMA *et al.* (2019).

2.2. Cicatrização de feridas

A quebra da integridade física do epitélio estimula o reparo tecidual, que pode se dar de duas formas: pela regeneração, na qual ocorre a recomposição da atividade funcional do tecido, e pela cicatrização, na qual ocorre restabelecimento da homeostasia do tecido e culmina com a formação de cicatriz (BALBINO *et al.*, 2005).

A cicatrização de feridas é iniciada em resposta a danos físicos, químicos ou biológicos, que desencadeiam uma cascata de eventos ordenados, que interagem para a reconstituição tecidual (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007). CLARK (1993) classificou a cicatrização de feridas nas fases inflamatória, de proliferação ou granulação e de remodelação ou maturação. Contudo, alguns autores destacam o processo inicial de hemostasia como uma fase anterior à inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2019).

A hemostasia ocorre imediatamente após a lesão tecidual. A ruptura do endotélio de vasos danificados estimula os vasoconstritores, como a endotelina, além de outros mediadores, como as prostaglandinas, liberadas pelo rompimento das células lesadas. Na sequência, ocorre a contração do músculo liso no endotélio, com o objetivo de interromper o sangramento local (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007).

A injúria do endotélio estimula a adesão, agregação e desgranulação plaquetária. A agregação plaquetária e a junção destas com as fibras de fibrina, trombina, glóbulos brancos e vermelhos, formam um coágulo, que interrompe o sangramento e atua como um arcabouço tanto para as células que irão migrar para o sítio da lesão como para a síntese de citocinas e fatores do crescimento. A desgranulação corresponde à liberação de grânulos pelas plaquetas, que contêm em seu interior citocinas, mediadores vasoativos e quimiotáticos, que irão estimular a migração de células inflamatórias para o local da lesão e mais plaquetas para a cascata de coagulação (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007; FURIE; FURIE, 2008).

A fase inflamatória é caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos para o local da lesão e sinais clínicos de rubor, tumor, calor e dor (BALBINO *et al.*, 2005). Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são proteínas localizadas na membrana plasmática ou citoplasma das células e são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), a microrganismos (MAMPs) e a danos (DAMPs) que são moléculas endógenas liberadas quando ocorre danos nos tecidos. Assim, PAMPs, MAMPs e DAMPs ativam e iniciam respostas imunes, recrutando células inflamatórias para o local da lesão (GONG *et al.*, 2020). Selectinas e integrinas localizadas na superfície das células endoteliais e dos leucócitos são ativadas e dão início às etapas de rolagem e adesão de leucócitos pela superfície do endotélio, próximo ao local da lesão, seguido do rastejamento e transmigração através das barreiras endoteliais, que são abertas transitoriamente (VESTWEBER, 2015).

Os neutrófilos são os primeiros a chegar na lesão. Estas células destroem potenciais patógenos e desbridam a ferida, para tal, liberam grânulos tóxicos contendo antimicrobianos, geram armadilhas extracelulares (NETs) e ainda liberam uma série de mediadores quimiotáticos (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007; PAPAYANNOPOULOS, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019). Em sequência, ocorre intensa migração de monócitos, que se diferenciam em macrófagos no local da lesão. Estas células dão sequência ao desbridamento, secretam citocinas, fatores de crescimento, fagocitam neutrófilos apoptóticos, contribuem para a

angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a fase proliferativa (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007).

Na fase inflamatória, os mastócitos também estão presentes, sendo a maioria infiltrantes oriundos de tecidos próximos. As células dendríticas apresentadoras de antígenos se manifestam na pele como células de Langerhans e estão envolvidas na estimulação de linfócitos T. O sistema imune adaptativo, representado pelos linfócitos T e B, respondem em momento mais tardio, porém de forma específica. Secretam anticorpos, produzem citocinas e fatores de crescimento (LANDÉN *et al.*, 2016).

A fase proliferativa, então, se inicia e é caracterizada por epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Nesta fase, ocorre intensa proliferação e migração das células epiteliais presentes nas bordas da ferida. A angiogênese se intensifica, em resposta ao fator de necrose tumoral (TNF), e garante a entrega de nutrientes e oxigênio, para manutenção da homeostase e para permitir a proliferação e regeneração celular. Os fibroblastos adjacentes migram para a ferida e sofrem ativação, saindo do seu estado de quiescência, em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) estimula os fibroblastos a produzirem colágeno e a se transformarem em miofibroblastos, promovendo a contração da ferida (BALBINO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2007).

A fase de remodelamento ocorre posteriormente, após total preenchimento da ferida por tecido de granulação. Esta fase é caracterizada por deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno inicialmente produzido na ferida, o tipo III, é fino e desorganizado. Ao longo do processo de cicatrização este colágeno vai sendo gradualmente degradado por collagenases, principalmente na fase inflamatória e, de forma concomitante, vai sendo substituído por um tipo de colágeno mais denso e organizado, o tipo I. A produção do colágeno tipo I se intensifica na fase de remodelamento. A reorganização da nova matriz reflete o aumento da força tênsil da ferida e no aspecto da cicatrização (CAMPOS *et al.*, 2007).

2.3. Feridas crônicas – A ferida diabética

Os eventos da cicatrização podem não ser bem sucedidos e diversos são os fatores que podem influenciar nesta dinâmica, como isquemia, presença persistente de corpo estranho, deficiências vitamínicas, hipotireoidismo, doenças hereditárias, alterações da coagulação, idade

avançada, trauma grave, queimaduras, sepse, tabagismo, radioterapia, desnutrição, uso de corticosteróides, colonização bacteriana, diabetes, dentre outros (CAMPOS *et al.*, 2007; FRYKBERG; BANKS, 2015). Queloides e cicatrizes hipertróficas também são distúrbios da cicatrização, pontuados por uma resposta inflamatória excessiva, com descontrole no processo de síntese e degradação de colágeno (CAMPOS *et al.*, 2007).

A etiologia das feridas crônicas comumente é multifatorial, o que dificulta a elucidação de todos os mecanismos moleculares envolvidos na diversidade de casos. Independente da duração, as feridas crônicas são aquelas que não conseguem progredir e cumprir de forma adequada todas as fases ordenadas do processo cicatricial, se perpetuando em alguma das fases, mais comumente, na fase inflamatória. A grande maioria das feridas crônicas se enquadra em três categorias: úlceras venosas e arteriais; úlceras de pressão e úlceras diabéticas (FRYKBERG; BANKS, 2015; SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010; ZHAO *et al.*, 2016).

O pé diabético é uma complicação multifatorial que reside na incapacidade do organismo diabético em orquestrar um processo de reparo tecidual de forma adequada e eficiente. É uma das complicações crônicas mais comuns da doença, atinge cerca de 15% dos pacientes diabéticos ao longo da vida, podendo resultar em perda de mobilidade, amputação, isolamento social e depressão (BĂDESCU *et al.*, 2016; OROSCO *et al.*, 2019). Cerca de 52,2% das amputações realizadas no Hospital Regional de São Paulo, regulado pelo SUS, em 2016 correspondiam a pacientes com complicações do diabetes. No Brasil, 22.244 pacientes com diabetes foram hospitalizados para procedimentos relacionados ao pé diabético em 2014. Considerando estas hospitalizações, os custos foram de Int \$ 9,89 milhões (OROSCO *et al.*, 2019).

A fisiopatologia completa da ferida diabética ainda não está totalmente elucidada. Seus precursores são variados, incluindo neuropatia; aumento de estresse oxidativo; isquemia; menor taxa de reepitelização da ferida; aumento de infecções; redução da angiogênese; redução da função leucocitária e propensão a formação de um fenótipo inflamatório, que predispõe a desordens graves no reparo tecidual destas feridas (BLAKYTNY; JUDE, 2006; HESKETH *et al.*, 2017).

No organismo diabético, a neuropatia diabética torna o pé diabético mais susceptível a rupturas e infecções (GIANINO *et al.*, 2018). Cerca de 50% dos indivíduos com diabetes desenvolvem esta complicação (FELDMAN *et al.*, 2020). A neuropatia diabética constitui-se de um grupo heterogêneo de manifestações clínicas e subclínicas que acometem o sistema

nervoso autonômico periférico, em função da hiperglicemia crônica. É caracterizada pela danificação gradativa e progressiva dos nervos de membros periféricos, além de alterações fenotípicas nas células da ferida e diminuição na liberação de citocinas por macrófagos. Ocorre assim a perda da função sensorial, que se inicia comumente nas extremidades inferiores (NASCIMENTO *et al.*, 2016; GIANINO *et al.*, 2018; FELDMAN *et al.*, 2020).

Os macrófagos envolvidos no processo cicatricial não são uma população homogênea. Diferentes subconjuntos de monócitos são recrutados em momentos distintos e específicos durante o curso da ferida, impulsionando a resolução do processo. Os macrófagos ativados podem ser amplamente divididos em duas categorias: macrófagos ativados classicamente (tipo M1), que possuem um estado de ativação pró-inflamatório e macrófagos ativados alternativamente (M2), representando estados opostos de ativação anti-inflamatória e pró-reparativa. Contudo, sabe-se que a hiperglicemia altera a mudança fenotípica dos macrófagos, fazendo com que a predominância seja, durante todo o processo, de macrófagos com perfil M1. Este perfil é caracterizado por um fenótipo pró-inflamatório, com altos níveis de TNF e interleucina-6 (IL6), dentre outros mediadores pró-inflamatórios (HESKETH *et al.*, 2017; KIMBALL *et al.*, 2018).

A eferocitose, remoção de células apoptóticas, processo promovido pelos macrófagos, também é um fator que sofre alteração em consequência da hiperglicemia crônica. A eferocitose promove a manutenção da homeostase em tecidos saudáveis, é essencial após inflamações agudas, previne a necrose secundária, interrompe as respostas inflamatórias e promove a ativação de vias pré-resolutivas. Quando a eferocitose é comprometida, como no diabetes descontrolado, estes processos também são comprometidos e consequentemente ocorre a perpetuação do processo inflamatório (HESKETH *et al.*, 2017; DORAN *et al.*, 2020).

A hiperglicemia crônica também causa comprometimento na produção e na atividade do óxido nítrico (NO), que é um radical livre gasoso secretado pelo endotélio, modulador da função endotelial; aumenta o estresse oxidativo, que por sua vez estimula a geração de mediadores inflamatórios e ainda contribui para o aumento dos produtos avançados da glicosilação não-enzimática (AGEs), que são proteínas e lipídios que se tornam glicosilados após a exposição a açúcares oxidados e atuam modificando proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica, moléculas da matriz extracelular, sinalizações, causando disfunção celular e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (REIS *et al.*, 2008; ASSMANN *et al.*, 2016).

As feridas crônicas possuem um tratamento subjetivo. A avaliação completa do paciente irá orientar seu tratamento e para tal recomenda-se uma abordagem multidisciplinar. Diabéticos necessitam de um tratamento voltado para o controle glicêmico e para as comorbidades associadas que podem, inclusive, afetar a cura da ferida. É importante que seja realizado um exame vascular, avaliação da ferida, avaliação da existência de perturbações hemodinâmicas e da presença de infecções. As infecções bacterianas contribuem para o agravamento das feridas e, quando detectadas, o tratamento pode incluir desbridamento, drenagem cirúrgica de abscessos e terapia antimicrobiana guiada por cultura de tecidos (FRYKBERG; BANKS, 2015; GOLDUFSKY *et al.*, 2015).

2.4. Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) pode ser definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia, decorrente da produção diminuída ou ausente de insulina pelo pâncreas e/ou pela resistência periférica à ação da insulina. Este distúrbio crônico pode ser classificado em vários tipos, dos quais destacam-se o diabetes tipo 1 (DM1), o tipo 2 (DM2) e o gestacional. Há ainda outros tipos menos prevalentes: síndromes monogênicas; relacionado à doenças do pâncreas exócrino e uso de medicamentos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

O diagnóstico do diabetes é confirmado quando a concentração de glicose no sangue é superior 7,0 mmol/L (126mg/dL) em condição de jejum ou acima de 11,1 mmol/L (200mg/dL) em checagem aleatória com sintomas; pela concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) acima de 48 mmol/mol (6,5%) ou pela glicemia igual ou superior a 200 mg/dl, duas horas após uma sobrecarga de 75 g de glicose. É necessário que mais de um exame apresente alteração para concluir o diagnóstico (MAAHS *et al.*, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019; COBAS *et al.*, 2022).

A classificação do diabetes depende da integração de características clínicas, sintomas, índice de massa e gordura corporal, conjuntamente ao uso de biomarcadores, como autoanticorpos pancreáticos. Contudo, é considerável o número de classificações errôneas (DIMEGLIO *et al.*, 2018). Conforme um estudo sobre a precisão do diagnóstico no Reino Unido, em diagnósticos de indivíduos com 35 anos ou mais, cerca de 56% deles são errôneos (HOPE *et al.*, 2016).

O diabetes do tipo 1 (DM1) é resultante de um distúrbio autoimune mediado por células T, que atacam as células β pancreáticas produtoras de insulina (MAAHS *et al.*, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019; NORRIS *et al.*, 2020). Sua etiologia é complexa, pois envolve a influência de vários fatores, como exposição a gatilhos ambientais, microbioma, genoma, metabolismo, sistema imunológico, exposição a agentes infecciosos (vírus da rubéola congênita, por exemplo) e toxinas (DANEMAN, 2006; MAAHS *et al.*, 2010; DIMEGLIO *et al.*, 2018; NORRIS *et al.*, 2020).

Apesar do seu desenvolvimento ter uma influência genética, a maioria das pessoas diagnosticadas com DM1 não possuem familiares com a doença ou a combinação dos alelos HLA de maior risco, dificultando sua prevenção e indicando a existência de outros fatores etiológicos. Anteriormente, o DM1 era definido como um tipo juvenil, mas atualmente sabe-se que pode ocorrer em qualquer faixa etária (ATKINSON *et al.*, 2014), tanto que 50% dos casos ocorrem em adultos (DIMEGLIO *et al.*, 2018). É responsável por 10% do total de casos de diabetes no mundo e sua incidência vem aumentando há décadas (MAAHS *et al.*, 2010; NORRIS *et al.*, 2020). O diabetes autoimune latente em adultos (LADA) é um subtipo. É uma condição heterogênea, que compartilha características clínicas e metabólicas com o diabetes do tipo 1 e do tipo 2, o que contribui para falsas quantificações dos casos (DIMEGLIO *et al.*, 2018; POZZILLI; PIERALICE, 2018).

O diabetes do tipo 2 (DM2) é responsável por 90 a 95% dos casos totais, era referido como diabetes não insulino dependente ou diabetes de início na vida adulta. Atualmente é de conhecimento que pode se desenvolver em qualquer faixa etária, e tem sido diagnosticado em crianças cada vez mais precocemente. Sua etiologia é multifatorial, mas sabe-se que está fortemente relacionada com a porcentagem de gordura corporal, alimentação e estilo de vida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). O tecido adiposo induz um processo inflamatório caracterizado por infiltração de macrófagos e leucócitos, que sofrem uma mudança para um fenótipo pró-inflamatório, que conduz ao quadro de sensibilidade à insulina e intolerância à glicose (WEISBERG *et al.*, 2003; BURHANS *et al.*, 2019). Comumente a DM2 tem um diagnóstico mais tardio, pois a hiperglicemia se desenvolve de forma gradual, podendo ter poucos sintomas iniciais. A resistência à insulina pode melhorar com a redução da porcentagem corporal e mudanças no estilo de vida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

O Diabetes *mellitus* Gestacional (DMG) é caracterizado pelo estado hiperglicêmico durante qualquer momento da gravidez (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019). Mulheres com DMG possuem um risco quase 8 vezes maior de desenvolver DM2 posteriormente e ainda apresentam risco maior de terem síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, parto precoce, malformação e natimortos. O DMG ainda está associado a maior crescimento fetal e perinatal, morbidades e maiores chances das crianças desenvolverem DM2 na vida adulta (CLAUSEN *et al.*, 2008; HAPO *et al.*, 2008; DAMM, 2009).

Os sintomas de hiperglicemia acentuada podem incluir poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, visão turva, cansaço, formigamento nos membros, suscetibilidade às infecções e cetoacidose diabética. Todos os subtipos de diabetes podem culminar nas mesmas complicações crônicas, embora as taxas de progressão possam ser diferentes para cada tipo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019). As consequências crônicas do diabetes não controlado são: hiperglicemia com cetoacidose, que podem levar à insuficiência respiratória (KONSTANTINOV *et al.*, 2015); retinopatia com potencial perda de visão (DUH *et al.*, 2017); nefropatia e possível insuficiência renal (PICCOLI *et al.*, 2015); neuropatia periférica, com risco de úlceras nos pés, amputações e articulações de Charcot; neuropatia autonômica, causando sintomas gastrointestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual (BARRETT *et al.*, 2017). Pacientes com diabetes têm uma incidência aumentada para doença cardiovascular aterosclerótica, arterial periférica, doença cerebrovascular, hipertensão e anomalias do metabolismo das lipoproteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). Apesar dos avanços nos cuidados e serviços médicos, o diabetes e suas complicações estão intimamente associados a um substancial ônus médico, psicológico e financeiro. Embora insulina, mudança de hábitos alimentares e de vida permaneçam sendo a base da terapia do diabetes, vários outros tratamentos vêm sendo desenvolvidos para serem utilizados de forma complementar aos tratamentos já existentes (DIMEGLIO *et al.*, 2018).

2.5. *Pseudomonas aeruginosa* e a infecção da ferida diabética

Os níveis de concentração de bactérias são anormalmente maiores em feridas crônicas, conduzindo a ferida a uma estagnação no estágio inflamatório. Uma das bactérias mais comumente encontradas em feridas diabéticas é a *Pseudomonas aeruginosa* (PA) (SIDDIQUI; BERNSTEIN 2010; GIANINO *et al.*, 2018). Na infecção, a proliferação bacteriana supera a resposta imune do hospedeiro causando prejuízos na resolução da cicatrização. Este

desequilíbrio se dá em função de vários fatores, como aumento da carga microbiana, virulência das bactérias presentes na ferida, ação sinérgica de diferentes bactérias e a incapacidade do hospedeiro em orquestrar uma resposta inflamatória satisfatória, o que ocorre em consequência de determinadas condições, como diabetes, desnutrição, uso prolongado de esteróides, obesidade, idade avançada ou presença de corpos estranhos (SALCIDO, 2007).

Os biofilmes não foram objeto de estudo neste trabalho, contudo, definidos como comunidades bacterianas complexas, inseridas em uma matriz protetora de biopolímero autoproduzido (GOLDUFSKY *et al.*, 2015; FRANKLIN *et al.*, 2015), estão altamente associados a inflamação persistente em feridas diabéticas. Tais feridas são caracterizadas por fenótipo inflamatório persistente, com aumento de células polimorfonucleares, aumento de citocinas inflamatórias e metaloproteinases (MMPs) (SCALISE *et al.*, 2015). Sabe-se que o diagnóstico clínico de infecções em feridas crônicas é limitado a sinais clínicos subjetivos. Sem uma definição clara de colonização *versus* infecção, há dificuldades para comparações e interposições entre os estudos sobre feridas infectadas (SPROCKETT *et al.*, 2015). Dentro deste contexto, alguns estudos propõem os conceitos de ferida colonizada, colonização crítica e ferida infectada (SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010). Quando a concentração de bactérias na ferida é inferior a 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido, considera-se que a ferida está colonizada, sendo esta concentração incapaz de causar danos ao processo de cicatrização (SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010). A colonização crítica é definida como um estado de transição entre a colonização da superfície bacteriana, na qual não há prejuízo no processo de cicatrização (FRANK *et al.*, 2005). Já uma concentração igual ou superior a 10^5 UFC/grama, considera-se que tais bactérias são capazes de interferir no processo de cicatrização de feridas saudáveis, constituindo a ferida infectada (SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010; SERRA *et al.*, 2015).

A PA é uma bactéria gram-negativa, aeróbia estrita, visualizada como bastonetes e que possui flagelos, o que lhe permite mobilidade. É encontrada no solo, na água, no esgoto, em vegetais, animais e humanos (MICHALSKA; WOLF, 2015). Não causa prejuízos em ferida de indivíduos saudáveis, no entanto, nas feridas diabéticas causa danos teciduais graves, inibe o reparo tecidual e estabelece uma infecção robusta e persistente (GOLDUFSKY *et al.*, 2015; JUAN *et al.*, 2017). É frequentemente encontrada em pacientes com fibrose cística, leucemia aguda, transplantados, feridas diabéticas, traqueostomias, cateteres e feridas cutâneas exsudativas (MICHALSKA; WOLF, 2015).

As bactérias gram-negativas são predominantes nas feridas diabéticas, dentre as quais a PA é o patógeno mais detectado (FERNANDES *et al.*, 2007; RAMAKANT *et al.*, 2011). A PA produz um vasto arsenal de fatores envolvidos na sua regulação, transporte, adaptação e patogenicidade. A infecção é efetivada pela estrutura de virulência denominada sistema de secreção tipo III (T3SS), que existem em 4 tipos (ExoU, ExoT, ExoS e ExoY). O injetossomo T3SS permite a bactéria translocar proteínas para o citoplasma do hospedeiro. Estas toxinas efetoras modificam processos celulares e promovem a infecção (GOLDUFSKY *et al.*, 2015).

As cepas de PA possuem extensa capacidade metabólica; resistência à antibióticos; mecanismos de adaptação, incluindo quorum sensing (QS); rede regulatória da motilidade-sessilidade; radiação adaptativa; sistemas CRISPR-Cas e produz biofilme. A PA é caracterizada pela produção de pigmentos fluorescentes difusíveis nos meios de cultura, como a pioverdina e a piocianina. Dentre seus principais fatores de virulência, destacam-se sua cápsula de polissacarídeo antifagocítica, endotoxinas, exotocinas, exoenzimas, proteases e fosfolipases (ALHAZMI, 2015; MORADALI *et al.*, 2017).

O QS permite que as bactérias atuem como comunidade. Este mecanismo de comunicação controla o crescimento, resistência a antibióticos, processos biológicos, virulência, ajuste de vias metabólicas e a adaptação bacteriana, por meio de várias vias de sinalizações químicas interconectadas, de acordo com a densidade populacional e pela regulação da expressão de genes específicos. O QS pode determinar o grau dos danos e os estágios clínicos da infecção, levando em consideração os fatores ambientais e imunológicos do hospedeiro, além da competição bacteriana local (SMITH; IGLEWSKI, 2003; MORADALI *et al.*, 2017).

A radiação adaptativa diz respeito a capacidade da PA colonizar diversos nichos e hospedeiros, bem como manter infecções persistentes à longo prazo. Neste processo de adaptação ocorre a geração de diversos clones, diversificados em uma variedade de genótipos e fenótipos ao longo do tempo, até que os descendentes mais favoráveis e adaptados sejam selecionados (MORADALI *et al.*, 2017). O sistema CRISPR/Cas diz respeito a uma maquinaria de imunidade adaptativa da bactéria contra elementos genéticos móveis. (MORADALI *et al.*, 2017; WIEDENHEFT; BONDY-DENOMY, 2017).

O papel desempenhado pela infecção em feridas crônicas ainda não é totalmente esclarecido, mas é de conhecimento que indivíduos diabéticos apresentam alto risco de desenvolver feridas crônicas e que as comorbidades do DM podem atuar em conjunto,

influenciando na cronicidade da ferida. Todos os mecanismos descritos conferem à PA a capacidade de se manter no organismo diabético tornando a infecção uma característica do diabetes. Os indivíduos diabéticos descontrolados apresentam uma menor eficiência do sistema imunológico e uma menor resposta a infecções. Como consequência, a infecção do pé diabético é uma complicação frequente e grave nestes pacientes (ZAINÉ *et al.*, 2014; SERRA *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2019).

2.6. Pectina – Uma fibra alimentar

A pectina, caracterizada pela primeira vez em 1824, por Braconnot, é um composto proveniente de frutas e vegetais, responsável pela formação de um gel (KERTESZ, 1952). Compõe a parede celular dos vegetais, é caracterizada por um conjunto de polissacarídeos heterogêneos ramificados, com esqueleto péctico, composto principalmente de polímeros de ácido galacturônico, raminose, arabinose e galactose, unidos entre si por ligações glicosídicas em α (1-4). Sua estrutura é variável, pois sua composição é estabelecida por sua fonte, localização, fatores ambientais, armazenamento e processamento (CANTERI *et al.*, 2012; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018; DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019).

Em 1930 iniciou-se a produção comercial da pectina a partir do bagaço de maçã, que até então era descartado pela produção de suco. Até os dias atuais, a maior parte da sua produção é associada às indústrias de produção de suco em larga escala (WILLATS *et al.*, 2006). Há uma crescente tendência em buscar alternativas que promovam a reciclagem de resíduos, que antes eram considerados subprodutos, obtendo o aproveitamento máximo dos componentes. No geral, o processo de produção compreende a extração da pectina do vegetal de origem em meio aquoso ácido, purificação desse líquido e isolamento da pectina por precipitação (CANTERI *et al.*, 2012). As principais aplicações da pectina são como agentes gelificante, espessante, estabilizador e emulsionante. Assim, é amplamente utilizada para produção de compotas, geleias, sumos de frutas, doces, sobremesas de frutas, bebidas e produtos de padaria (WILLATS *et al.*, 2006; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018).

A pectina é classificada como uma fibra solúvel, que apresenta dispersão coloidal quando em solução. Esta propriedade é responsável por efeitos fisiológicos gastrointestinais benéficos, como retardo do esvaziamento gastrointestinal, redução da absorção de glicose e aumento da massa fecal (JENKINS *et al.*, 1980; SCHWARTZ *et al.*, 1988). Durante sua

passagem pelo intestino grosso é fermentada por bactérias intestinais (LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018). A fermentação dos oligossacarídeos pécticos resulta principalmente na formação de butirato e ainda é capaz de aumentar as *Bifidobactérias* e *Eubacterium rectale* (MANDERSON *et al.*, 2005). O butirato é a fonte preferencial de energia dos colonócitos e é considerado um fator protetor e nutriente chave para a atividade metabólica e de crescimento dos colonócitos (PRYDE *et al.*, 2002; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018). O butirato está associado a indução de macrófagos do tipo M2 e redução de citocinas pró-inflamatórias no soro, promovendo migração celular e efeito protetor no modelo experimental de doença inflamatória intestinal em camundongos (JI *et al.*, 2016).

A pectina conta com diversas ações biológicas, dentre as quais, atividades anticâncer (*In vitro*), sendo capaz de afetar a interação entre células cancerosas e proteínas da matriz extracelular (PRADO *et al.*, 2017). É utilizada de forma tópica, como hidrocoloide, no tratamento de feridas, para liberação lenta de drogas e proteção contra bactérias (MIR *et al.*, 2018; VALLE *et al.*, 2020). Em camundongos, suprime a inflamação de doenças alérgicas das vias aéreas, com alteração da composição bacteriana intestinal, aumentando *Bacteroides*, *Actinobacterias*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e diminuindo *Firmicutes* e *Proteobacteria* (ZHANG *et al.*, 2016) e ainda, atividades imunorregulatória, antiinflamatória, hipoglicêmica, antibacteriana, antioxidante e citoprotetora (POPOV; OVODOV, 2013; MINZANOVA *et al.*, 2018; TORKOVA *et al.*, 2018).

Sua ingestão resulta na produção de gases, como o dióxido de carbono, metano e hidrogênio; produção de ácidos graxos de cadeia curta, dentre os quais, ácido acético, butírico, propiônico e ainda promove um pH favorável, modificando o ambiente do intestino. Estas modificações propiciam o crescimento de populações benéficas, inibem o crescimento de bactérias patogênicas e alguns produtos podem ter efeitos antagônicos em outras espécies (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018). A modulação dietética da microbiota gastrointestinal, quando é realizada através da administração de fibras alimentares, resulta em consequências metabólicas diferentes das observadas em experimentos baseados em cultura única, com uso de substratos isolados (HOLSCHER *et al.*, 2017). Os efeitos da pectina incluem o fortalecimento da camada de muco e o aumento da integridade epitelial (BEAUKEMA *et al.*, 2020).

Os mecanismos envolvidos na ação dos ácidos graxos de cadeia curta, em consequência da ingestão das fibras alimentares ainda não é totalmente esclarecido, mas tem mobilizado

investigações. Sabe-se que, além de serem importantes fontes de energia, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) podem modular funções celulares, inibindo a atividade da histona desacetilase, afetando a transcrição de genes e ainda podem atuar como moléculas sinalizadoras, via ativação do receptor de membrana GPR43, receptor que pertence à família de receptores acoplados a proteína G, descrita por SWAZDARGO *et al.* (1997). Recentemente, foi relatado que o GPR43 regula a homeostase energética do hospedeiro no trato gastrointestinal e nos tecidos adiposos (KIMURA *et al.*, 2014).

2.7. Pectina como potencial alvo terapêutico e prebiótico emergente

Entende-se por microbioma a comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que compartilham o espaço corporal. A metagenômica é o estudo do material genético ou da variação de espécies obtidas de amostras, como solo, água ou fezes (LEY *et al.*, 2009; MANDAL *et al.*, 2015). Um grande desafio no estudo da microbiota tem sido a incapacidade de cultivar a maioria das espécies microbianas. O sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido cada vez mais utilizado para reconstrução filogenética, detecção baseada em ácido nucleico e quantificação da diversidade microbiana. Esta metodologia tem contribuído fortemente para a linha de pesquisa da metagenômica (MANDAL *et al.*, 2015).

A microbiota da pele é normalmente composta por bactérias comensais e mutualistas, que desempenham papéis importantes na maturação e na homeostase da imunidade cutânea (SANFORD; GALLO, 2013). Vírus, fungos e bactérias cobrem a superfície da pele, formando comunidades em determinadas regiões. A microbiota da pele metaboliza proteínas, lipídeos e produz moléculas bioativas, como ácidos graxos livres, peptídeos antimicrobianos (PAMs), modulinas e antibióticos, sendo capaz de modular a expressão de interleucina 1a (IL-1a), componentes do sistema do complemento e células imunológicas (SCALES; HUFFNAGLE, 2013; XU; HSIA, 2018).

Os produtos do hospedeiro e as células imunológicas interagem com a microbiota. As bactérias comensais "educam" o sistema imune cutâneo. A microbiota residente da pele realiza exclusão competitiva e promove uma rede de interações, pelas quais as bactérias se ajudam e ajustam o comportamento umas das outras (SCALES; HUFFNAGLE, 2013; CHEN *et al.*, 2017). Após o processo de injúria tecidual, as bactérias do hospedeiro e as bactérias do meio envolvem a pele, estimulam a produção de proteínas antimicrobianas e moléculas inflamatórias.

A recolonização é realizada por bactérias das camadas mais profundas da pele adjacente, que interagem em colaboração para o fechamento da ferida (ZEEUWEN *et al.*, 2012). Bactérias comensais e sistema imunológico formam uma relação simbiótica e a dieta do hospedeiro é de extrema importância, uma vez que influencia a diversidade bacteriana (LEY *et al.*, 2009).

A qualidade da microbiota intestinal é crucial para o bom funcionamento do sistema imunológico, já uma microbiota desequilibrada predispõe a patologias (HAND *et al.*, 2016; FRIEDRICH *et al.*, 2017). Microbiota de intestino, pulmão, pele e demais tecidos promovem uma regulação local. Patologias como alergias, doenças auto-imunes e inflamatórias sugerem uma falha no controle da resposta imune mal direcionada e não sintonizada com a microbiota local (FRIEDRICH *et al.*, 2017). Foi demonstrado que a microbiota intestinal influencia o reparo de feridas do epitélio gastrointestinal por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células epiteliais (SWANSON *et al.*, 2011). Os AGCC, subprodutos da fermentação das fibras alimentares, possuem efeito anti-inflamatório no epitélio colônico e também nas células imunes (POUL *et al.*, 2003)

MASLOWSKI *et al.* (2009) reforçam a relação entre dieta, metabolismo bacteriano gastrointestinal e resposta imune ao demonstrarem as interações existentes entre os AGCC e o receptor GPR43 influenciando na resposta inflamatória. Os camundongos livres de germes apresentaram redução na inflamação e menor dano tecidual em modelos experimentais de colite, artrite e asma. Esta proteção se deu pela ligação do receptor GPR43, já que em camundongos Gpr43^{-/-} não foi observado efeito benéfico com o acetato e os animais ainda mostraram inflamação exacerbada (MASLOWSKI *et al.*, 2009).

“Pode-se esperar que quaisquer agentes que afetem a microbiota gastrointestinal e a produção de AGCC influenciem nas respostas imunes e inflamatórias”

(MASLOWSKI *et al.*, 2009)

A pectina é um potencial prebiótico, pelo seu potencial em modular o sistema imune e a microbiota, mas tais efeitos ainda estão sendo elucidados. O termo “prebiótico” foi definido em 1995 e sofreu modificações ao longo do tempo, sendo definido atualmente como *“ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas, na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde”* (GIBSON *et al.*, 2010; BINDELS *et al.*, 2015; HUTKINS *et al.*, 2016; CHUNG *et al.*, 2017). Os prebióticos são

utilizados para tratamento de doenças inflamatórias de pele, dermatites e alergias (LOLOU; PANAYIOTIDIS, 2019; PELUCCHI *et al.*, 2012) e ainda possuem ação protetora em doenças inflamatórias intestinais, no sistema nervoso, no sistema imunológico e cardiovascular (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019).

A colonização bacteriana ocorre em todas as feridas, agudas e crônicas, mas é necessário compreender a correlação entre as comunidades microbianas nas feridas e o desenvolvimento do reparo (SCALES; HUFFNAGLE, 2013). Há uma diferença significativa na diversidade microbiana de feridas em diabéticos, com relação aos não diabéticos (XU; HSIA, 2018). A caracterização da microbiota de feridas humanas pode permitir uma melhor compreensão de seu papel na cicatrização de feridas (XU; HSIA, 2018).

É evidente que a microbiota da pele tem um papel fundamental na resposta inflamatória. Dentro deste contexto há estratégias com grande potencial para tratar feridas infectadas que não cicatrizam (SCALES; HUFFNAGLE, 2013; JOHNSON *et al.*, 2018). A produção de metabólicos, como os AGCC, são frequentemente prejudicadas em indivíduos com diabetes, obesidade, distúrbios autoimunes e câncer. Acredita-se que moduladores da microbiota, como a pectina, possuem potencial para realizar a manutenção e restauração de uma microbiota cutânea saudável, beneficiando a cicatrização de feridas crônicas (NAGPAL *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

Uma em cada duas pessoas que vivem com diabetes não possuem conhecimento do seu diagnóstico. Quase meio bilhão de pessoas vivem com diabetes *mellitus* (DM) em todo o mundo e estimativas indicam um aumento de 25% até o ano de 2030 e de 51% até o ano de 2045 (SAEEDI *et al.*, 2019).

A ferida diabética crônica é uma complicação multifatorial, na qual o organismo é incapaz de orquestrar um processo de reparo tecidual de forma adequada e eficiente (BLAKYTNY; JUDE, 2006). O pé diabético é uma das complicações crônicas mais comuns da doença, atinge 15% dos diabéticos e pode culminar em perda de mobilidade, amputação, isolamento social e depressão (BADESCU *et al.*, 2016; OROSCO *et al.*, 2019).

A colonização bacteriana é uma característica das feridas diabéticas. A *P. aeruginosa* está entre os tipos mais comuns de bactérias que colonizam tais feridas, promovendo infecção oportunista, exacerbando o processo inflamatório e perpetuando a cicatrização, podendo causar amputações (SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010; GIANINO *et al.*, 2018).

Existem vários tratamentos experimentais para as feridas crônicas, como tratamento com fatores de crescimento, células-tronco, substitutos de pele, terapia com pressão negativa, dentre outros. Porém, muitos desses tratamentos têm se mostrado apenas moderadamente eficazes e nem todos são acessíveis. Além disso, indivíduos diabéticos possuem prejuízos na produção de metabólitos, como os AGCC. A administração de moduladores da microbiota, como os prebióticos e probióticos, possui potencial para a manutenção e restauração de uma microbiota cutânea saudável, e possivelmente, para a cicatrização de feridas crônicas (XU *et al.*, 2018; XU; HSIA, 2018; NAGPAL *et al.*, 2018). Assim, se faz evidente a necessidade de investigações que elucidem a ação das fibras solúveis de modulação da microbiota e do sistema imunológico, através de metabólitos produzidos na fermentação bacteriana e tais efeitos na cicatrização de feridas cutâneas. Fundamentados nesse conhecimento, espera-se a ampliação e a potencialização dos cuidados e tratamentos existentes, juntamente a formulação de terapias coadjuvantes para o tratamento de feridas crônicas (JONES *et al.*, 2018).

A composição da microbiota de uma ferida impacta diretamente no seu potencial de cura. O sistema imunológico, a microbiota intestinal e a microbiota sistêmica são influenciadas de forma positiva pelo uso de alimentos capazes de realizar sua modulação (GUÉNICHE *et al.*,

2000; PELUCCHI *et al.*, 2012). O microbioma cutâneo é essencial na manutenção da função protetora da barreira epitelial, na regulação do sistema imunológico e na proteção contra microorganismos patogênicos invasores. JOHNSON *et al* (2018) elaborou a hipótese de que o microbioma tem potencial de influenciar na cicatrização de feridas e representa um recurso que merece mais destaque.

Destaca-se neste trabalho a fibra solúvel pectina, a qual apresenta potencial prebiótico. A pectina é benéfica à saúde intestinal; estimula a formação de ácidos graxos de cadeia curta através da sua fermentação, que aumenta a atividade metabólica de colonócitos; promoção do crescimento de bactérias benéficas; papel modulador do sistema imunológico; ação antibacteriana; ação antioxidante e citoprotetora (PRYDE *et al.*, 2002; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018; MINZANOVA *et al.*, 2018).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou pioneiramente a importância da microbiota para a cicatrização de feridas cutâneas utilizando animais isentos de germes (CANESSO *et al.*, 2014) e tem contribuído para elucidar os efeitos de moduladores da microbiota e seus derivados sobre a cicatrização de feridas (CANESSO *et al.*, 2023; MOREIRA *et al.*, 2021; CASTRO *et al.*, 2020).

Em trabalho recente, demonstrou-se que uma dieta enriquecida com fibras solúveis, dentre as quais, a pectina, foi capaz de acelerar o processo de cicatrização tecidual em camundongos saudáveis (CANESSO *et al.*, 2013). Em outro estudo, observou-se que a citocina IL-18 é importante para os efeitos da pectina na cicatrização das feridas (CASSINI-VIEIRA, 2018). Em continuidade, a hipótese aventada no presente estudo é que a dieta enriquecida com a fibra solúvel pectina é capaz de modular a microbiota local (intestinal) e remota (da pele), conferindo benefícios à cicatrização de feridas cutâneas crônicas, tais como a ferida diabética, infectada ou não com *P. aeruginosa*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com a fibra solúvel pectina na cicatrização de feridas cutâneas excisionais infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* em modelo murino de diabetes induzida por streptozotocina

4.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar o perfil metabólico e nutricional dos animais;
- II. Avaliar o perfil temporal de fechamento das feridas, epitelização, inflamação, formação de tecido de granulação e angiogênese;
- III. Avaliar a presença da infecção por *P. aeruginosa* nas feridas ao longo do período experimental;
- IV. Avaliar, *in vitro*, os efeitos da microbiota aeróbica coletada da pele sobre a viabilidade da bactéria *P. aeruginosa*;
- V. Identificar e quantificar a diversidade bacteriana da microbiota intestinal e cutânea.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Modelo experimental

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com idade de 12 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Microbiologia \ ICB \ UFMG, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água. Os experimentos tiveram início após aprovação de protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número 325/2019.

5.2. Grupos e delineamento experimental

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos, sendo: 1) Grupo saudável e 2) Grupo com diabetes (DM) tipo I (induzida por estreptozotocina – item 5.3). Após duas semanas da última administração do agente diabetogênico e consecutiva confirmação do diabetes pela glicosúria e pelo teste de tolerância intraperitoneal (item 5.5), os animais foram subdivididos conforme as dietas experimentais, contendo ou não pectina em sua composição. Após duas semanas recebendo as dietas experimentais, os animais foram submetidos à cirurgia de confecção das feridas cutâneas e foram subdivididos conforme a presença ou não de infecção pela bactéria *P. aeruginosa* (com o uso de cobertura oclusiva), totalizando 6 grupos:

1. Grupo saudável, com dieta controle (SC);
2. Grupo saudável, com dieta contendo pectina (SP);
3. Grupo diabético, com dieta controle (DC);
4. Grupo diabético, com dieta contendo pectina (DP);
5. Grupo diabético, infectado e com dieta controle (DIC);
6. Grupo diabético, infectado e com dieta contendo pectina (DIP).

Os grupos contaram com dois tempos de eutanásia, de 7 e 14 dias, para coleta de material biológico, totalizando 12 grupos experimentais.

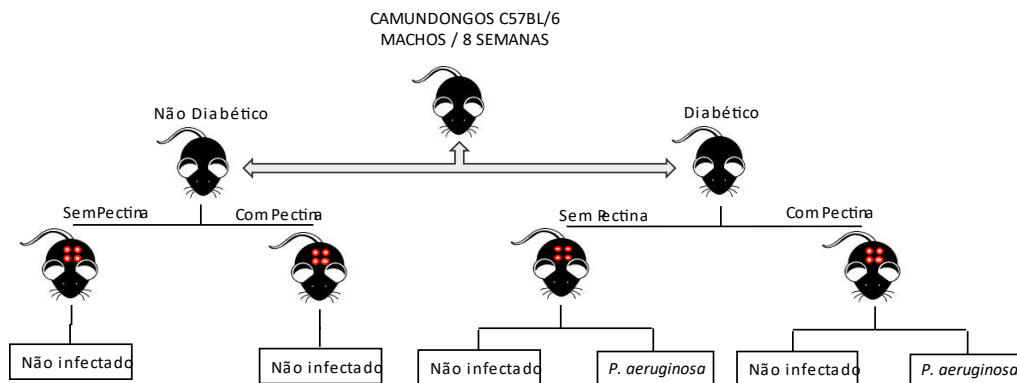


Figura 2: Delineamento experimental.

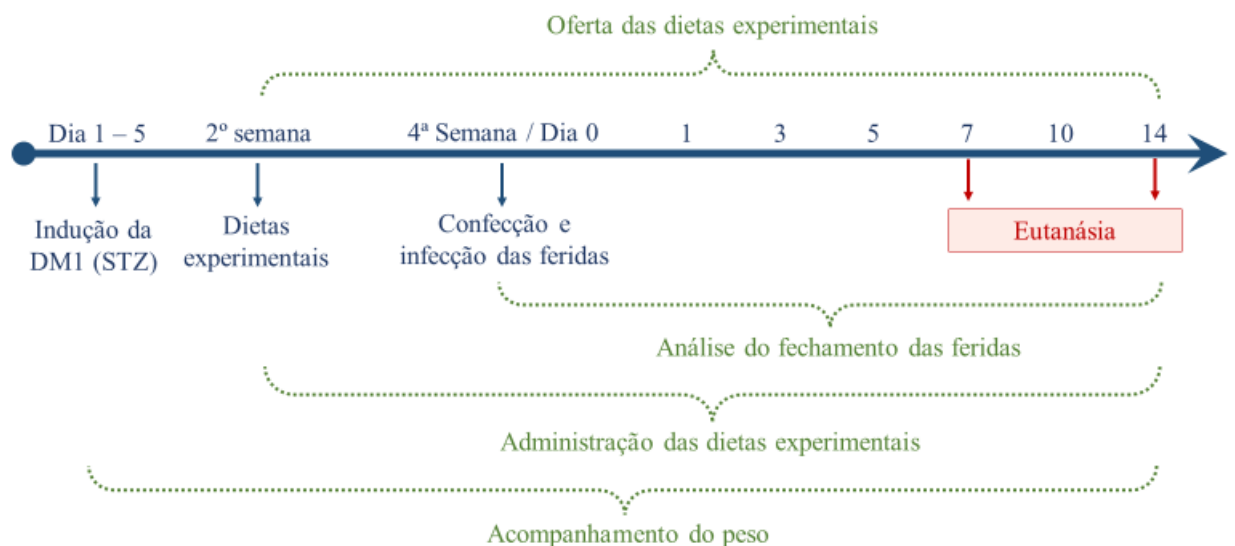


Figura 3: Linha do tempo experimental.

5.3. Indução do Diabetes *mellitus*

A indução do diabetes foi realizada pela administração de estreptozotocina (STZ), conforme protocolo estabelecido por EMANUELLI *et al.* (2002).

Com 12 semanas de idade os animais dos grupos diabéticos receberam doses de estreptozotocina por cinco dias consecutivos, na dose de 40mg/kg, via intraperitoneal. Os animais não diabéticos (grupos saudáveis) receberam injeções, via intraperitoneal, com o mesmo volume de tampão citrato (pH 4,5). EMANUELLI *et al.* (2002) iniciaram a indução no 2º mês de vida (8 semanas), porém, a indução nesta idade acarretou em maior mortalidade.

Optou-se assim por realizar uma adaptação do protocolo, iniciando a indução na 12ª semana de vida, que resultou em melhores resultados.

5.4. Teste de glicosúria e teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG)

Após 10 dias da última administração (5º dia) do agente diabetogênico, foi realizado o teste de glicosúria, que consistiu na coleta de uma gota de urina de cada animal, por micção espontânea, e aplicação desta em uma tira de fitas reagentes (Alamar Tecno Científica). Em presença positiva de glicose na urina, a tira altera sua coloração original em uma escala de cores. Os animais cujas fitas indicaram a concentração igual ou maior a 2000 mg de glicose por dL de urina foram considerados diabéticos e permaneceram no estudo, enquanto os demais foram descartados.

Após 12 dias da última administração do agente diabetogênico e dois dias após o teste de glicosúria, foi realizado o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG), para o qual os animais foram submetidos previamente a 12 horas de jejum. Após, foi injetada uma solução de 25% de glicose, preparada em salina 0,9% estéril, aplicada na dose de 2g de glicose/kg, via intraperitoneal (i.p.). Com o auxílio de um glicosímetro a glicemia foi verificada nos intervalos de 0 (basal, anterior à administração de glicose), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração i.p. da glicose, utilizando-se sangue da cauda. Os resultados foram expressos em mg de glicose por dL de sangue.

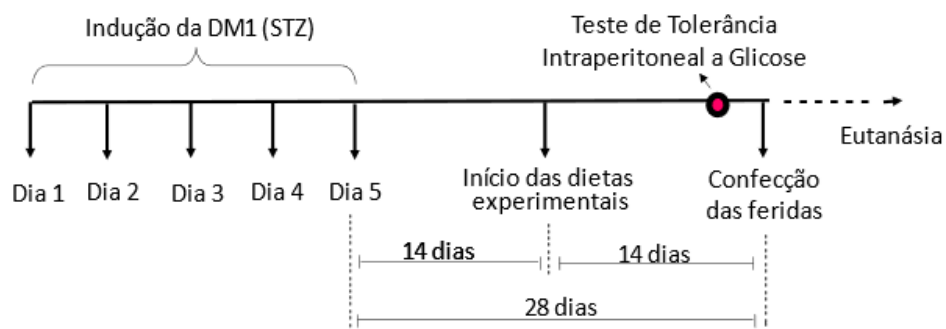


Figura 4: Ilustração do protocolo de indução e confirmação do diabetes mellitus tipo 1, induzido por estreptozotocina (STZ).

5.5. Dietas experimentais

Os animais do grupo controle receberam a dieta AIN93. Os animais tratados receberam a mesma dieta, porém modificada, contendo 15% da fibra solúvel pectina em sua composição. Ambas as dietas foram preparadas conforme protocolo do Laboratório de Angiogênese e Células-tronco (LANCET) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, da UFMG (VIEIRA, 2018).

As dietas foram compostas por ingredientes específicos para roedores da Rosther®, que foram pesados, misturados com as mãos e peneirados 3 vezes. Após, foram adicionadas pequenas quantidades de água, até a obtenção de uma massa homogênea. As rações foram reservadas em sacos fechados, identificados e refrigeradas a -4°C até o momento do uso. A quantidade de maltodextrina e amido de milho da dieta enriquecida com pectina foi ajustada em função da adição de pectina, para obtenção de 1kg final de ração. Dieta e água foram oferecidas aos animais *ad libitum*, com exceção do jejum de 12 horas para a realização do TTIG. As dietas experimentais foram fornecidas no 14º dia após o último dia de aplicação do agente diabetogênico até o último dia experimental (eutanásia).

COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS (g) PARA CADA 1000g DE DIETA		
INGREDIENTES	CONTROLE	TRATADO
Pectina	0,00	150,00
BHT	0,008	0,008
Bitartarato de colina	2,50	2,50
Cistina	1,80	1,80
Metionina	1,80	1,80
Mix de vitaminas *	10,0	10,0
Mix de minerais **	35,00	35,00
Celulose	50,00	50,00
Óleo de soja	40,00	40,00
Sacarose	100,00	100,00
Maltodextrina	155,00	55,00
Caseína	140,00	140,00
Amido de milho	465,692	415,692

Tabela 1: Descrição das dietas experimentais.

* Mistura de vitaminas: Ácido Fólico, Ácido Nicotínico, Biotina, Pantotenato de Cálcio, Piridoxina, Riboflavina, Tiamina, Vitamina A, Vitamina B12, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina K1.

** Mistura de minerais: Magnésio, Manganês, Molibdênio, Níquel, Potássio, Selênio, Silício, Boro, Cálcio, Cloro, Cobre, Cromo, Enxofre e Ferro.

5.6. Confeção das feridas

Após 4 semanas do último dia de indução da DM e decorridas duas semanas do início das dietas experimentais, os animais foram submetidos ao procedimento de confecção das feridas excisionais. Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg), administrados via intraperitoneal. Após a sedação, os animais foram submetidos a tricotomia da região dorsal e assepsia com álcool hidratado 70° INPM. Em seguida, serão confeccionadas 4 feridas cutâneas circulares na região dorsal, com o auxílio de um *punch* cirúrgico de 5 mm de diâmetro. Após o procedimento, cada animal foi colocado em uma manta aquecida, foram observados até o despertar e após, foram alocados em gaiolas individuais, para proteção das feridas (CANESSO, 2014).

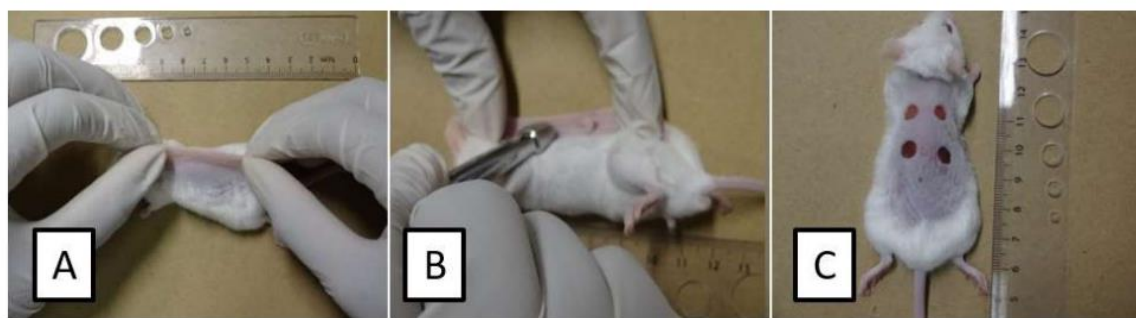


Figura 5: Modelo de quatro feridas excisionais por animal (Camundongo swiss na foto) (MOREIRA *et al.*, 2015).

5.7. Padronização do modelo de ferida infectada

Adotou-se como referências os modelos de infecção de ZHAO *et al.* (2010), HUNT *et al.* (2017-1) e HUNT *et al.* (2017-2). Contudo, existem vários modelos de feridas infectadas, que divergem em alguns detalhes, que são importantes, mas variáveis, conforme a necessidade de cada estudo. Segundo TATARA *et al.* (2015), antes de escolher e utilizar um modelo, deve-se considerar vários fatores, dentre os quais, a espécie do patógeno, a forma de inoculação, a concentração do inóculo, o uso de cobertura, o uso de tala, além de definir como será a monitorização e validação da infecção proposta.

Diferentemente dos modelos referenciados, nosso modelo de feridas conta com quatro feridas excisionais em cada animal, quadruplicando a carga bacteriana inicialmente proposta nestes estudos, além de outras divergências, como o modelo animal, a dieta e o modelo de diabetes. Dado o exposto, foi indispensável a realização de alguns testes para adaptações dos modelos existentes, adequando-os às condições e necessidades do grupo de pesquisa.

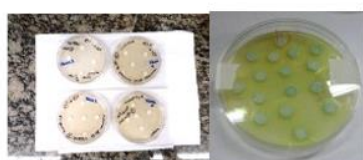
Após extensa busca na literatura e estudo piloto, optou-se em trabalhar com a *P. aeruginosa*, por ser uma das principais bactéria envolvidas na cronicidade das feridas diabéticas (SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010). A carga bacteriana suportada pelos animais, capaz de manter a infecção durante o período de cicatrização, causando prejuízos e caracterizando o modelo de ferida crônica proposto neste estudo, foi determinado através de um estudo experimental piloto, como a carga de 10^5 UFC/mL por ferida. O inóculo foi concentrado no volume de 10µL, volume determinado no projeto piloto por ser capaz de umedecer toda a área da ferida, sem transbordar para seu entorno (TATARA *et al.*, 2015).

Foi realizada uma avaliação clínica dos animais, para verificar sepse durante o delineamento experimental. Esta análise se deu pelo acompanhamento, em conjunto, pela cultura do macerado do tecido hepático (Item 5.16); pela quantificação de leucócitos no sangue periférico (Item 5.12) e pela avaliação dos sinais clínicos de sepse, como prostração, mudança de postura, mudança nos hábitos de higiene e perda de peso. Estas verificações ocorreram nos tempos de 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a confecção e infecção das feridas.

Optou-se pela utilização do modelo de indução por infecção pontual das feridas, inoculando a bactéria cultivada diretamente nas mesmas, com o auxílio de pipeta. Este modelo é menos agressivo, em comparação ao modelo de transferência de biofilme por filtro, adotado e detalhado por Zhao *et al.*, 2010. Adotou-se o uso de cobertura oclusiva transparente, por sua permanência facilitar a instalação da infecção e diminuir as chances de contaminação no ambiente (ZHAO *et al.*, 2010), ademais, observou-se no estudo piloto que a mesma infecção, porém, sem a cobertura, apresentava outro perfil. A infecção sem cobertura oclusiva não conferiu atraso no fechamento das feridas e as mesmas contaram com um aspecto semelhante às feridas dos animais saudáveis.

Optou-se pela não utilização da tala, que possui o objetivo de impedir a contratura das feridas. Em roedores, a cicatrização se dá por contratura, enquanto em humanos ocorre por reepitelização e deposição de novo tecido. Por isto, modelos específicos desenvolveram formas de inibir a contratura, através da utilização da tala, que é fixada por sutura nas bordas da ferida. No entanto, como a contratura da ferida é retardada em roedores durante a infecção, a necessidade de imobilização em modelos infectados não é clara, além de ser mais uma intervenção que confere estresse aos animais (ROBSON *et al.*, 1994).

Padronização	Escolha da bactéria (PA25853 ATCC®)
	Carga bacteriana (10^5) e volume por ferida (10µL)
	Presença ou não de filtro/disco
	Presença ou não de cobertura oclusiva (curativo)



Placas com meio BHI contendo filtros umedecidos com 10µl de *Pseudomonas aeruginosa* contendo diferentes concentrações da bactéria e diferentes tempos de crescimento.



Ferida infectada sem filtro ou cobertura oclusiva (A); somente com cobertura (B); com filtro e cobertura oclusiva (C).

Figura 6: Aspectos pontuados para estabelecimento de um modelo de ferida infectada.

5.8. Preparo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e infecção das feridas

A bactéria (PA2583 ATCC®) foi adquirida com o professor Flaviano dos Santos Martins, do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, do Departamento de Microbiologia / ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais. O cultivo da bactéria se deu em meio de cultura BHI - Brain Heart Infusion, em condição de aerobiose. Seu crescimento se deu em estufa microbiológica, em temperatura de 37°C, por 24 horas. Seu isolamento foi realizado em ágar seletivo Mac Conkey e Ceftrimide. A contagem bacteriana foi determinada por diluição seriada, plaqueamento, crescimento em estufa e determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Alíquotas foram preparadas em criotubos estéreis, com capacidade de 2 mL, contendo 800 µL do caldo de *P. aeruginosa* com $3,4 \times 10^9$ UFC/mL e 200 µL de glicerol 80% estéril. As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C e foram utilizadas ao longo do estudo.

No dia anterior à infecção, foi realizado o crescimento da *P. aeruginosa* em meio BHI, em estufa microbiológica de 37°C, por 24h, propiciando o crescimento de 10^9 bactérias/ml. No dia seguinte, dia da infecção, o recipiente contendo a bactéria (10^9 bactérias/ml) no meio BHI foi centrifugado por 10 minutos, à 9.500rpm e 4°C. Logo em seguida, o sobrenadante foi desprezado e a bactéria foi ressuspensa em mesmo volume de PBS. Em seguida, foi realizada diluição seriada e a amostra de interesse foi mantida em gelo até sua utilização.

Imediatamente após a confecção, cada ferida recebeu 10µl de solução PBS contendo 10^5 bactérias. Os grupos não infectados receberam 10µl de PBS em cada ferida. Os grupos saudáveis (SC, SP) e diabéticos (DC, DP) não receberam cobertura oclusiva após a infecção. Os grupos diabéticos infectados (DIC, DIP) receberam uma cobertura oclusiva (Filme curativo 3M®) imediatamente após a infecção, que foi reforçada ao longo dos dias, permanecendo até o dia da eutanásia.

5.9. Peso corporal, ingestão alimentar e análise de sobrevivência

Os animais tiveram peso, ingestão e mortalidade acompanhadas ao longo de todo o período experimental. O peso foi planilhado na frequência de três vezes por semana, do início da indução do diabetes (1º dia de aplicação da STZ) até o 14º dia após a confecção das feridas. Os resultados foram expressos em média de ingestão semanal por grupo (g).

Para o cálculo da ingestão, o peso da ração ofertada e da sobra foram planilhados semanalmente. Com estes dados, posteriormente, foi realizada a subtração da sobra pela

quantidade de ração ofertada, resultando na ingestão (g). Os dados foram expressos em média semanal por grupo (g). A mortalidade de cada animal foi registrada ao longo do estudo e foi posteriormente planilhada conforme método de Kaplan-Meier, para análise de sobrevivência.

5.10. Análise da cinética de fechamento das feridas

Com o auxílio de um paquímetro digital, cada ferida foi medida no sentido horizontal e vertical, nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias, a partir do dia de confecção das feridas. As medidas permitiram a mensuração da área das feridas. Para tal, as medidas foram planilhadas e inseridas na fórmula para determinação da área da elipse: $[1 - (\text{área da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$. Através da fórmula avaliou-se o fechamento médio das quatro feridas de cada animal, na sequência, foi realizada uma média, resultando no fechamento de cada animal e após, a porcentagem média do grupo. Os resultados foram expressos em porcentagem de fechamento médio por grupo e foram relativos ao tamanho original da ferida.

5.11. Eutanásia e coleta das feridas

A eutanásia foi realizada nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção das feridas. Neste procedimento, os animais receberam dose letal da mistura de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg), via intraperitoneal. Logo após, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, seguida de deslocamento cervical. Os animais foram dissecados para remoção de feridas, que ocorreu com o auxílio de um *punch* de biópsia de 8 mm de diâmetro.

5.12. Perfil total de leucócitos circulantes

A contagem de leucócitos totais foi realizada na câmara de Neubauer, um método manual e tradicional que permite estimar o número de células por milímetro de suspensão. Para esta determinação, foi realizada a coleta de 5µL de sangue da cauda e diluído em 45µL de solução de turk (ácido acético 2% com azul de metileno) para a lise das hemácias. Após homogeneização, 10µL desta solução foram utilizados para a contagem manual do total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico (Olympus Philippines) na objetiva de 40 vezes. A contagem foi realizada nos 4 quadrantes. A média da contagem dos quadrantes da câmara foi multiplicada pelo fator de diluição. Para obtenção do número de

células por ml, é necessário corrigir o valor obtido em $0,1 \text{ mm}^3$, multiplicando-o por 10, resultando nos valores finais, expressos em número de células/mL. A análise foi realizada nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a confecção das feridas.

5.13. Dosagem de proteínas totais, albumina e creatinina

As concentrações séricas de proteínas totais, albumina e creatinina foram determinadas por dosagens séricas, utilizando kits comerciais Bioclin®. Após coleta de sangue por punção cardíaca no momento da eutanásia, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 3.000 RPM, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após, o soro foi separado com auxílio de pipeta e o plasma foi transferido para outro tubo, que foi armazenado a -20°C , até o momento da dosagem.

Para dosagem das proteínas séricas foi utilizada a metodologia do Biureto, um teste colorimétrico, no qual as ligações peptídicas das proteínas reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em 545 nm.

Para dosagem da albumina utilizou-se um método colorimétrico, no qual, em presença de albumina, o verde de bromocresol forma um complexo corado, que exhibe um espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em 630nm.

A dosagem de creatinina foi baseada no método Jaffé com modificações, no qual a creatinina reage com ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em 510 nm.

5.14. Análise de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL

As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total e HDL foram determinadas utilizando kits comerciais Bioclin®. A análise foi realizada no tempo de 14 dias após a confecção das feridas. Para esta análise foram utilizadas amostras de soro, que foram obtidas no dia da eutanásia e congeladas a -20°C até o momento da dosagem. Para a dosagem dos triglicérides foi utilizado o método colorimétrico denominado Trinder, no qual H_2O_2 , 4-aminoantipirina e o-clorofenol, na presença da peroxidase originam um composto de cor cereja,

cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicérides. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em 500 nm.

A dosagem do colesterol total foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico COD-PAP, que envolve ação das enzimas lipoproteína lipase, colesterol oxidase e peroxidase, que originam um cromógeno cereja, cuja absorbância é lida em 500 nm. A dosagem do colesterol HDL foi realizada pelo método enzimático Trinder e a absorbância foi lida em 500nm. O valor do colesterol LDL e VLDL foram calculados pelas fórmulas de Friedewald, onde $[VLDL = \text{triglicérides} / 5]$ e $[LDL = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + VLDL)]$.

5.15. Avaliação da carga bacteriana das feridas

Após a eutanásia, as feridas foram maceradas com PBS estéril, na proporção grama/volume de 1:100. Em seguida, o macerado foi centrifugado e o tecido desprezado. O sobrenadante passou por diluições seriadas em PBS estéril, na proporção de 1:1000. Após, 100µL destas soluções em diferentes concentrações sofreram semeadura em placas de cultura contendo meio Mc Conkey estéril, meio seletivo para o crescimento de bactérias gram negativas. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica, em temperatura de 37°C, por 24 horas. Após incubação, foi realizada a contagem do número de colônias (UFC) por grama de pele infectada. A carga bacteriana foi realizada com pele coletada no tempo basal (dia de confecção da ferida) e feridas coletadas nos momentos de eutanásia, nos tempos de 7 e 14 dias. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média representando o número de UFC/g de tecido.

5.16. Plaqueamento de tecido hepático

Para verificar sepse nos animais, o tecido do fígado foi pesado e macerado com PBS na proporção grama/volume de 1:100. O macerado foi centrifugado e o pellet desprezado. O sobrenadante passou por diluições seriadas em PBS estéril, na proporção de 1:1000. Após, 100µL destas soluções com diferentes concentrações sofreram semeadura em placas de cultura contendo meio Mc Conkey estéril, meio seletivo para o crescimento de bactérias gram negativas. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica, em temperatura de 37°C, por 24 horas. Após incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g).

5.17. Técnica de halo inibição

Para avaliar a microbiota das feridas, após administração da dieta rica em fibras solúveis, na viabilidade da bactéria patogênica, foi realizada a técnica qualitativa *In vitro* de disco difusão, utilizando a pele basal e a ferida coletada na eutanásia, nos tempos de 7 e 14 dia após a confecção das feridas.

Para o teste, a bactéria *P. aeruginosa* foi cultivada e plaqueada em diferentes concentrações, em papel filtro circular, dispostos em placas de ágar contendo meio de cultura BHI. Cada disco recebeu 10µl do sobrenadante da pele macerada. Para obtenção deste sobrenadante, após a eutanásia, as peles e feridas foram removidas e maceradas em PBS estéril, na proporção grama/volume de 1:100. Em seguida, o macerado foi centrifugado e o tecido desprezado. As placas semeadas com a *P. aeruginosa*, contendo os discos de papel impregnados com as bactérias da pele foram incubadas em estufa por 24 horas, a 37°C. Após a incubação, as placas foram analisadas quanto a presença e o diâmetro (mm) de halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco. A existência dos halos é uma análise qualitativa relacionada a sensibilidade da bactéria às bactérias presentes no macerado de pele e à velocidade de crescimento destas no ágar.

5.18. Análise histológica

Após a eutanásia, a pele basal e as feridas coletadas no 7º e 14º dia após a confecção, foram direcionadas para a confecção das lâminas histológicas. Imediatamente após a coleta, os tecidos foram preservados em solução de criosubstituição (80% de metanol e 20% de DMSO), mantida sob temperatura de -20°C. Na sequência, os tecidos passaram por processamento para desidratação, diafanização e banho em paraplast. Após, foram confeccionados blocos de paraplast, que foram cortados no micrótomo (OLYMPUS, Alemanha), gerando cortes na espessura de 5µm, que foram fixados em lâminas. Na sequência, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômico de Gomori (TG). Em seguida, utilizando microscópio óptico, foi realizada análise do infiltrado inflamatório, de espessura da crosta, do tecido de granulação e de epitelização de cada tecido. As observações foram pontuadas e quantificadas, conforme a metodologia adotada por ESTEVÃO *et al.* (2019). A contagem dos capilares foi realizada nas lâminas coradas com Tricômico de Gomori.

5.19. Contagem de capilares

As lâminas coradas com Tricômico de Gomori foram fotografadas para a contagem de vasos sanguíneos. Foi realizada inicialmente a definição do número mínimo de campos para as análises, através do estudo da variação da instabilidade dos valores médios. Nas lâminas representativas do grupo controle foram obtidos 50 campos, dos quais foi realizada a contagem de vasos. Por meio de sorteio, as contagens foram agrupadas em números de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 campos. Observando a estabilidade do gráfico gerado, constatou-se a necessidade de captura de 15 campos de cada animal, de cada grupo, para realizar a análise. As lâminas foram fotografadas em microscópio Zeiss Primo Star®, no Laboratório de Nutrição Experimental, do grupo Imunometabolismo, concedido pela professora Dr^a Adaliene Versiani Matos Ferreira. A contagem foi planilhada e analisada no programa Graph Pad Prism 5.0. Os resultados foram expressos em média do número de capilares/campo.

5.20. Processamento de material e isolamento da enzima para dosagem de NAG e MPO

Na eutanásia as feridas foram removidas, com o auxílio de um *punch* circular de 8mm e foram estocados a -20° C até o dia da homogeneização do tecido. O tecido foi pesado e homogeneizado utilizando-se homogeneizador de tecidos e tampão de extração de citocinas (contendo coquetel de inibição de enzimas – Sigma; PBS, NaCl, EDTA, BSA e Twen 20), na proporção de 1,0 mL de solução (4°C) para cada 100 mg de tecido. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -20°C para futuros ensaios.

Adicionou-se Buffer 1 ao precipitado remanescente (1,0 mL / 100 mg de tecido), as amostras foram homogeneizadas no vórtex e foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado NaCl (0,2% p/v em água destilada – 1,5 mL/100mg – solução a 4°C) ao precipitado remanescente. O material foi homogeneizado no vórtex por 30 segundos e em seguida, foi adicionado NaCl (1,6%) e glicose (5% p/v em água destilada) (1,5 mL / 100mg – solução a 4°C). As amostras foram homogeneizadas rapidamente em vórtex e após, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

5.21. Ensaio enzimático para avaliação da atividade NAG nas feridas (macrófagos)

A dosagem de NAG é uma evidência indireta que permite a quantificação do acúmulo de macrófagos nas feridas, pela mensuração da atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).

Após o processamento do material, descrito no item 5.20, as amostras foram homogeneizadas em vórtex com solução salina 0,9% / Triton x-100 0,1% v/v (1,0 mL solução a 4°C / 100 mg de tecido). Após, o material foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em -20°C para utilização posterior. Foi adicionado 100 μ L das amostras diluídas em tampão citrato / fosfato a uma placa de 96 poços. Foi adicionado aos poços 100 μ L do substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C, por 10 minutos. Logo após, foi adicionado 100 μ L de tampão glicina 0,2 M e foi realizada a leitura em O.D. 400 nm. Os resultados foram expressos em Unidade Relativa por OD.

5.22. Ensaio enzimático para avaliação da atividade de MPO nas feridas (neutrófilos)

A avaliação do conteúdo de neutrófilos foi realizada pela mensuração da atividade da mieloperoxidase (MPO), presente no interior dos neutrófilos, conforme descrito por CASSINI-VIEIRA *et al.* (2015).

Após o processamento do material, descrito no item 5.20, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado Buffer 2 (1,0 mL / 100 mg de tecido – temperatura ambiente) ao precipitado. As amostras foram homogeneizadas rapidamente no vórtex e foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi retirado e congelado a -20°C, para utilização posterior. Em seguida, as amostras diluídas em Buffer 2 foram adicionadas em poços de placa de 96 poços. Foi adicionado 25 μ L do substrato 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) e a placa foi incubada a 37°C, por 5 minutos. Foi adicionado 100 μ L de H₂O₂ (0,002%) e a placa foi incubada novamente nas mesmas condições e tempo. Foi adicionado 100 μ L de H₂SO₄ (1M) e realizada a leitura em O.D. 450nm. Os resultados foram expressos em Unidade Relativa por OD.

5. 23 Metagenômica

5.23.1. Coleta de amostras

Para a análise metagenômica foram utilizadas amostras de fezes, pele basal e feridas. As amostras fecais foram obtidas das caixas de alocação dos animais, com o auxílio de uma pinça. As coletas das amostras de fezes foram realizadas em três tempos distintos:

- 1º momento: No primeiro dia de administração das dietas experimentais. Assim, a microbiota correspondente a este período não possui influência da alimentação acrescida com pectina. Neste momento experimental, os animais contavam com duas semanas de indução do diabetes (contar a partir do último dia de aplicação do agente diabetogênico);
- 2º momento: Dia de confecção das feridas excisionais. Neste momento, os animais contavam com duas semanas de dietas experimentais e quatro semanas de indução do diabetes;
- 3º momento: Dia da eutanásia, no 14º dia após a confecção das feridas. Os animais contavam, neste momento, com quatro semanas de dietas experimentais e seis semanas da indução do diabetes.

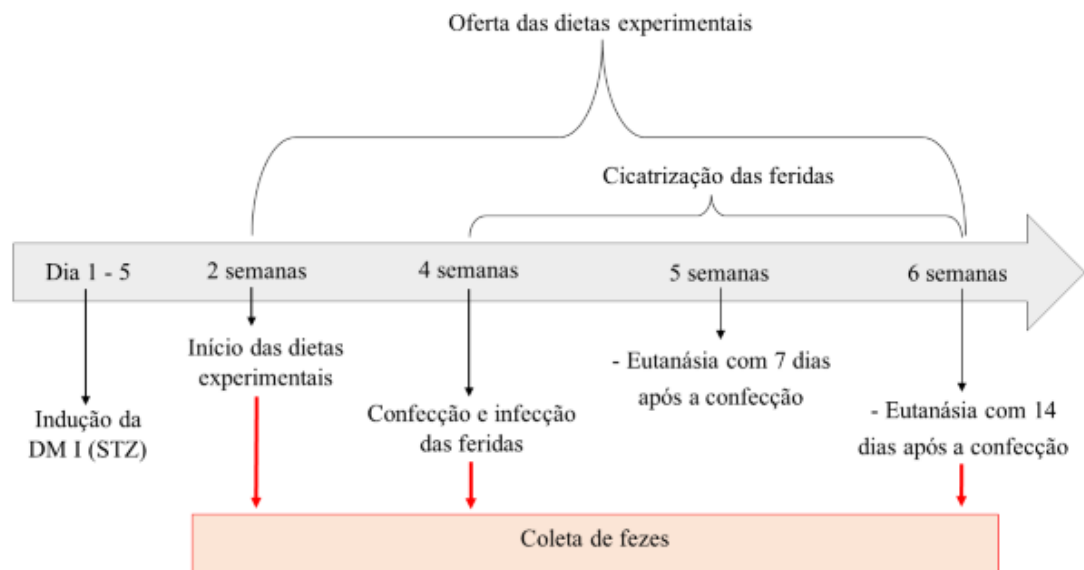


Figura 7: Representação dos momentos de coleta de amostras de fezes para análise metagenômica.

As amostras de pele e ferida foram coletadas em dois momentos distintos:

- 1º momento: A pele basal foi coletada no dia de confecção das feridas, com o auxílio de um *punch* de 5mm;
- As feridas foram coletadas após 14 dias da confecção das feridas, no momento de eutanásia, utilizando-se um *punch* de 8mm.

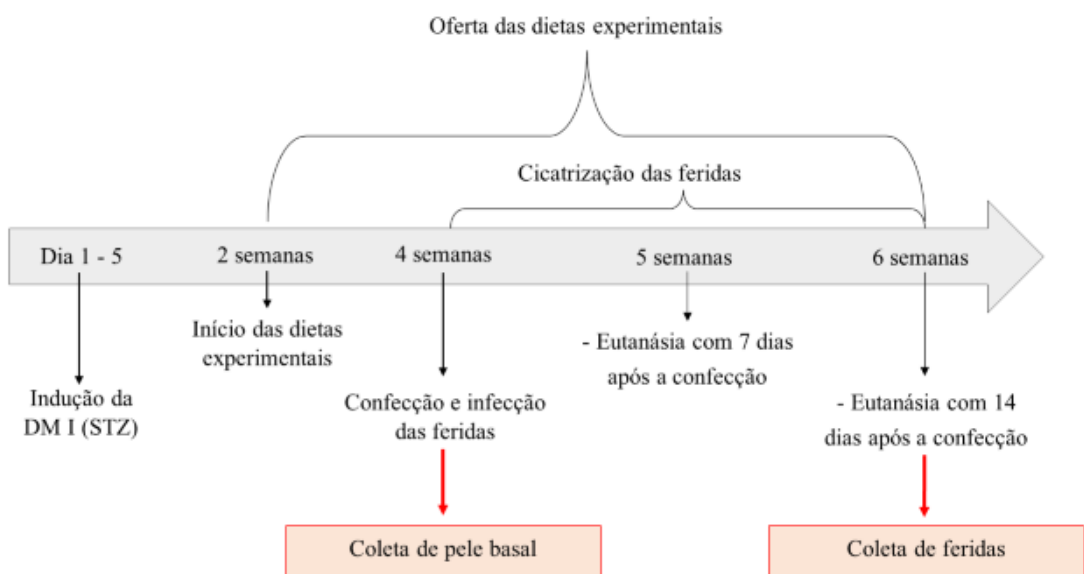


Figura 8: Representação dos momentos de coleta de amostras de pele basal e feridas para análise metagenômica.

5.23.2. Extração de DNA de fezes e pele para metagenômica

As amostras foram armazenadas em -20°C. No momento da extração, foram retiradas e submetidas a homogeneização em precellys, com tampão de lise. Após, foram incubadas em banho maria aquecido, com agitação manual em intervalos definidos, seguido de centrifugação. Adicionou-se ao precipitado RNase, as amostras foram incubadas, resfriadas na sequência e depois centrifugadas. Adicionou-se isopropanol às amostras, que foram incubadas no gelo, centrifugadas e tiveram o sobrenadante aspirado. O pellet foi lavado com etanol, centrifugado e após, o etanol foi removido por aspiração. Após secagem, o pellet foi ressuspensionado com água estéril e armazenado para etapa subsequente.

5.23.3. Isolamento e sequenciamento de DNA

O DNA total foi isolado de 100 mg de amostras, seguindo o protocolo QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). A preparação das bibliotecas foi realizada seguindo TruSeq Library Prep Kit (Illumina, EUA) para sequenciamento de amplicons bacterianos, utilizando oligonucleotídeos 341F e 806R, específicos para a região V3/V4 do rRNA 16S (CAPORASO *et al.*, 2012). As bibliotecas foram ajustadas para uma concentração final de 17,5 pM e foram sequenciadas no sistema MiSeq (Illumina, EUA). Execuções de 500 ciclos em pares foram realizadas usando o kit de sequenciamento V3x600 (Illumina, EUA) com 100.000 leituras de cobertura por amostra.

5.23.4. Análises de bioinformática e taxonomia

A filtragem de qualidade de arquivos fastq, incluindo a remoção de leituras truncadas e de baixa qualidade (pontuação Phred < 20) foi realizada usando Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014). Em seguida, as leituras pareadas para frente e para trás foram mescladas em contigs, e as sequências foram submetidas à remoção de singleton e filtragem de quimera usando Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009). Depois disso, as sequências pré-processadas foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) (97% de identidade) e atribuídas taxonomicamente usando QIIME (CAPORASO *et al.*, 2010) exigindo um limite de similaridade de sequência de 97% em relação ao banco de dados SILVA (QUAST *et al.*, 2013).

5.23.5. Análise ecológica

A diversidade foi estimada usando o índice de Shannon (H') ($H' = -\sum n_i/n \ln (n_i/n)$), onde n_i é o número de indivíduos no táxon (i) e n é o número total de indivíduos, que é um índice de heterogeneidade, influenciado pela riqueza e uniformidade de OTU. Para esta análise, foi utilizado o pacote Vegan disponível para R Studio. A análise de PCA para investigar a dissimilaridade entre os grupos e a abundância relativa de OTU foi estimada no STAMP (PARKS *et al.*, 2014).

5.24. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Após teste de normalidade Shapiro Wilk, verificou-se dados com distribuição normal e não normal. Os dados que continham as variáveis tempo e dieta foram analisados por two-way ANOVA e pós teste Turkey. Para os demais foi realizado teste One-way e pós-teste Turkey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Diferenças entre os grupos saudável controle *versus* saudável tratado; diabético controle *versus* diabético tratado e diabético infectado controle *versus* diabético infectado tratado, são indicadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle *versus* diabético controle e diabético controle *versus* diabético infectado controle, são indicadas por cerquilhas (#).

A normalidade da distribuição dos dados da OTU foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A diferença entre os valores médios nas comparações de múltiplos grupos foi estimada pelo teste H de Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn. Foi usado Bootstrap para comparação entre duas amostras. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Confirmação do diabetes

O teste de intolerância intraperitoneal à glicose foi realizado após 12 dias do último dia de aplicação do agente diabetogênico e dois dias antes da confecção das feridas. A análise teve como objetivo validar o modelo experimental de diabetes utilizado (Figura 9). O teste contou somente com quatro grupos, visto que foi realizado anteriormente ao momento de confecção e infecção das feridas.

A análise revelou que, anteriormente à aplicação da solução de glicose, no tempo basal, a glicemia dos grupos que receberam a streptozotocina (STZ) (DC e DP) já era estatisticamente superior à glicemia dos grupos que receberam a solução veículo (SC e SP) e houve diferença estatística entre os grupos de animais saudáveis e diabéticos (SC e DC) em todos os tempos avaliados. Após a aplicação da solução de glicose, a glicemia de todos os grupos sofreu uma elevação, como gradual redução após 30 minutos da aplicação. Mesmo com redução, os animais que sofreram aplicação da STZ (DC e DP) mantiveram níveis superiores de glicemia.

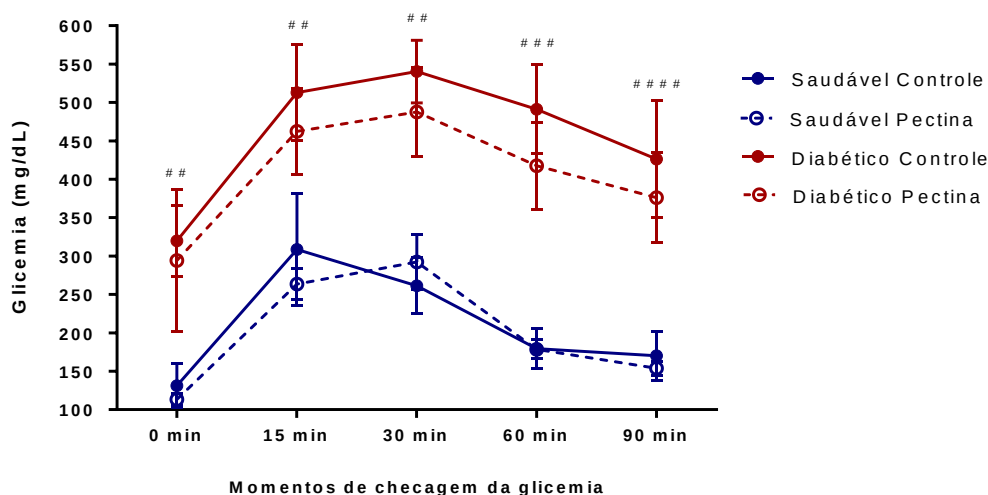
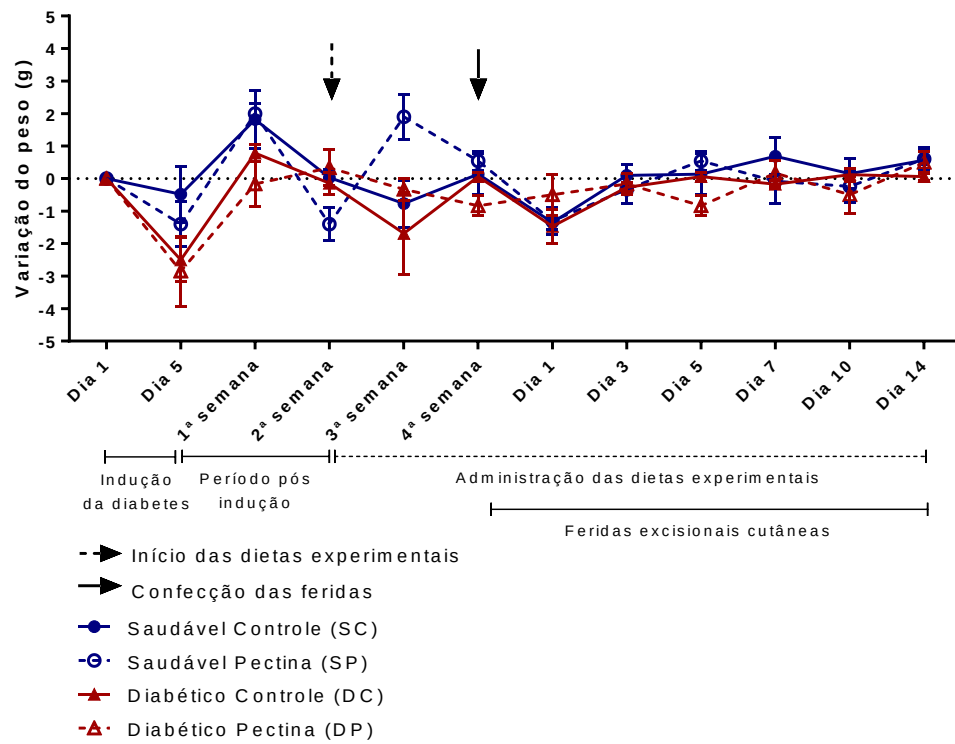


Figura 9: Valores glicêmicos do teste de tolerância intraperitoneal à glicose. Análise realizada após duas semanas da última aplicação do agente diabetogênico e dois dias antes das confecções e infecções das feridas. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 8-16$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$.

6.2. Peso ponderal

Para verificar variações ponderais, os animais foram pesados ao longo de todo o delineamento experimental, do 1º dia de indução do diabetes até o 14º dia após a confecção das feridas (Figura 10). A análise da variação média de peso dos grupos evidenciou que durante a aplicação do veículo e do agente diabetogênico todos os grupos tiveram redução do peso, com posterior recuperação, após uma semana sem a manipulação dos animais. Não houve variação significativa de peso comparando os grupos saudáveis e diabéticos (Figura 10A) ou entre os diabéticos e diabéticos infectados (Gráfico 10B).

A



B

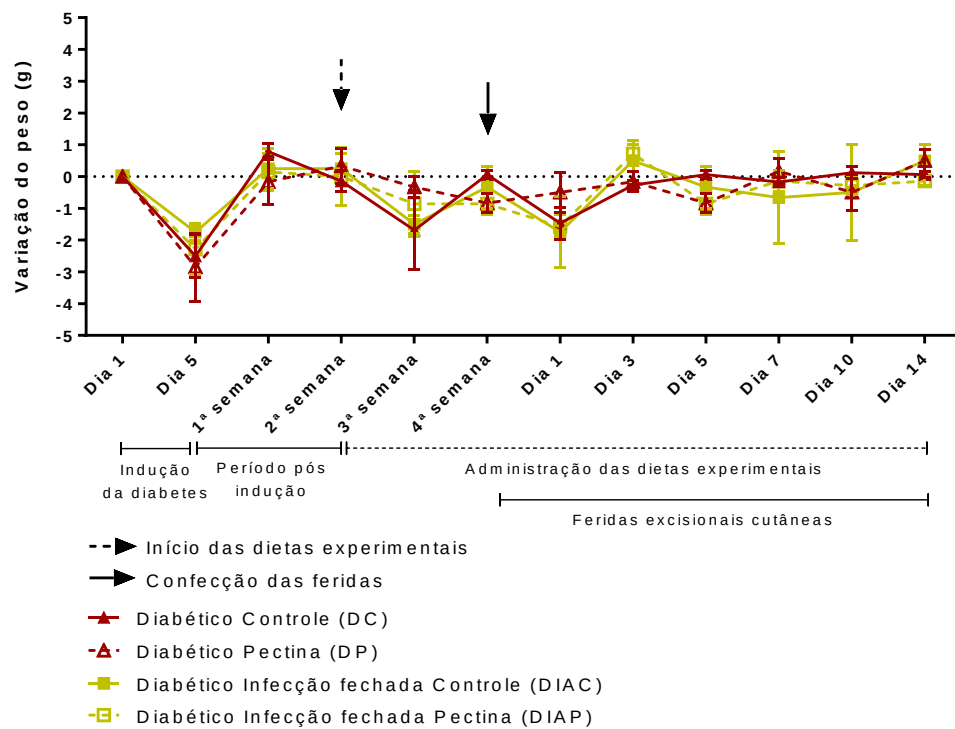
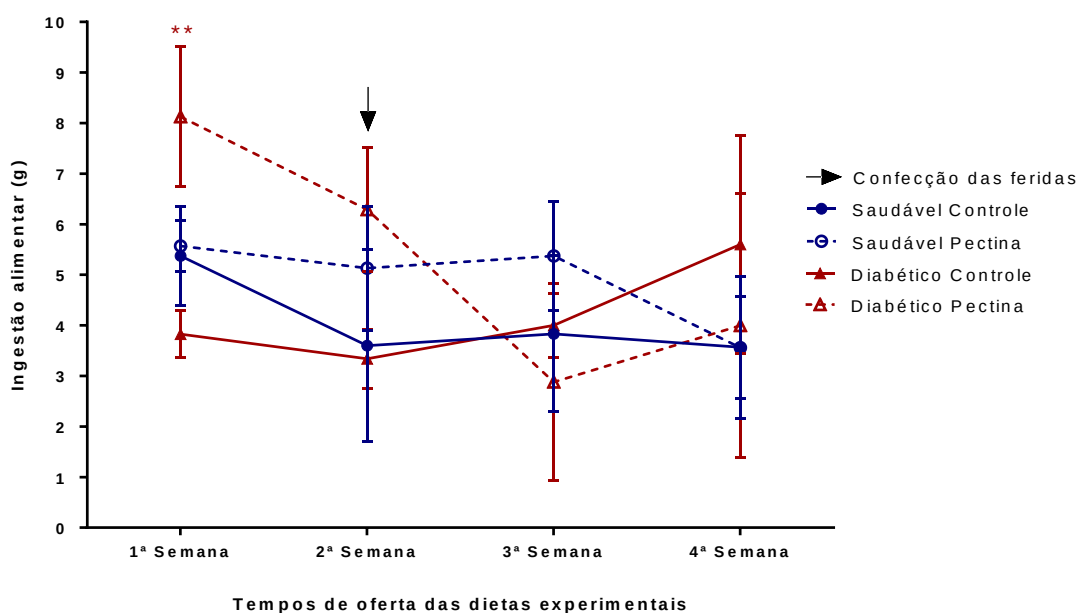


Figura 10: Variações no peso ponderal médio dos grupos experimentais (g) ao longo do delineamento, grupos saudáveis *versus* diabéticos (A); diabéticos *versus* diabéticos com infecção (B). Os dados de peso foram coletados do 1ª dia de indução da diabetes até o 14º dia após a confecção das feridas e foram expressos como média $\pm$ EPM, n= 6-12 animais/grupo.

6.3. Ingestão alimentar

A ingestão média dos animais (Figura 11) foi acompanhada desde o início do fornecimento das dietas, até o 14º dia após a confecção das feridas. Analisou-se a diferença de ingestão entre os grupos saudáveis e diabéticos (Figura 11A) e entre os grupos diabéticos e diabéticos infectados (Figura 11B). Verificou-se que entre o grupo diabético tratado com pectina apresentou ingestão significativamente maior do que seu controle, na 1ª semana de dieta experimental. Verificou-se ainda que o grupo diabético infectado apresentou maior ingestão na 3ª semana, em comparação ao grupo diabético controle (Figura 11B).

A



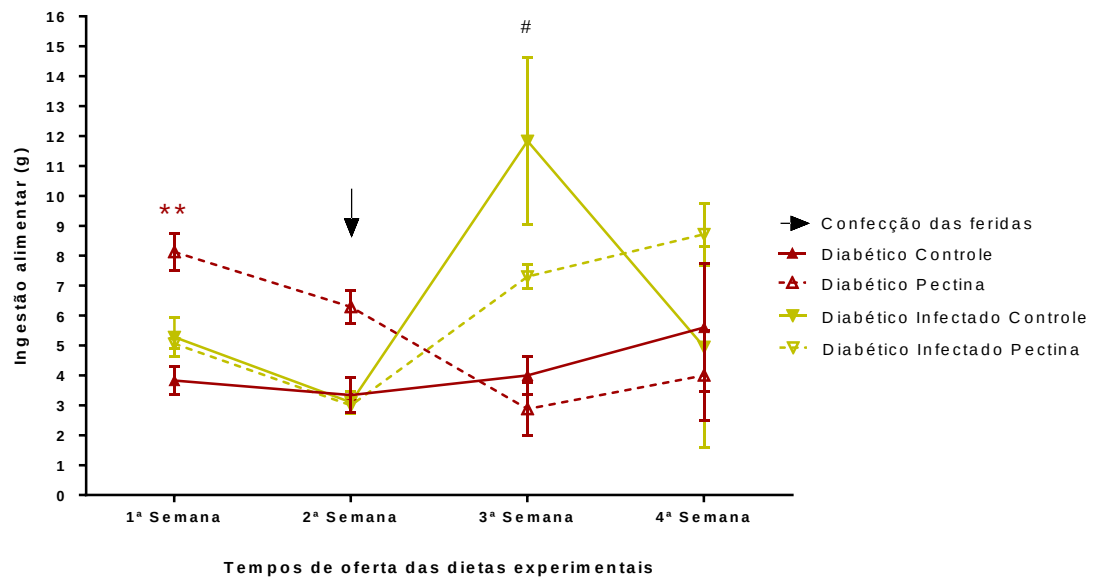
B

Figura 11: Média de ingestão semanal dos grupos experimentais, grupos saudáveis *versus* diabéticos (A); diabéticos *versus* diabéticos com infecção (B). Dados coletados do início do fornecimento das dietas até o 14º dia após a confecção das feridas e expressos como média $\pm$ EPM, $n=4-8$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); são representadas por cerquilhas (#); # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6.4. Análise de sobrevivência

Verificamos que os grupos saudáveis (SC e SP) contaram com 100% de sobrevivência. Todos os demais grupos apresentaram queda progressiva na taxa de sobrevivência após a confecção das feridas. O grupo diabético que recebeu pectina apresentou mortalidade significativamente menor, com relação ao seu controle. O grupo saudável controle, que contou com 100% de sobrevivência, apresentou diferença significativa com relação aos grupos diabético controle e diabético infectado controle.

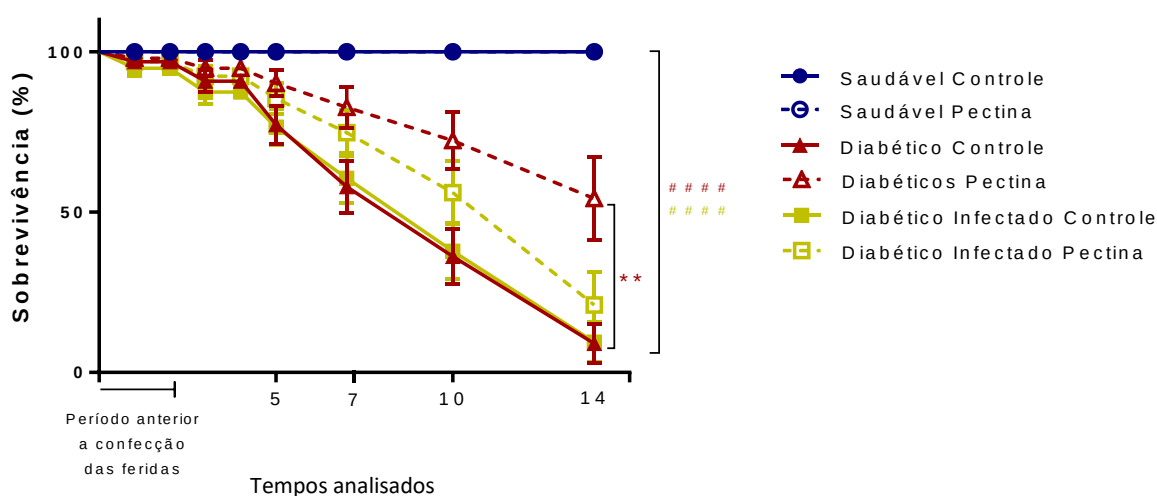


Figura 12: Análise de sobrevivência dos animais ao longo do período experimental. A mortalidade de cada animal foi pontuada ao longo de todo o período experimental. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 8$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); são representadas por cerquilhas (#); ** $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$.

6.5 Análise do fechamento das feridas

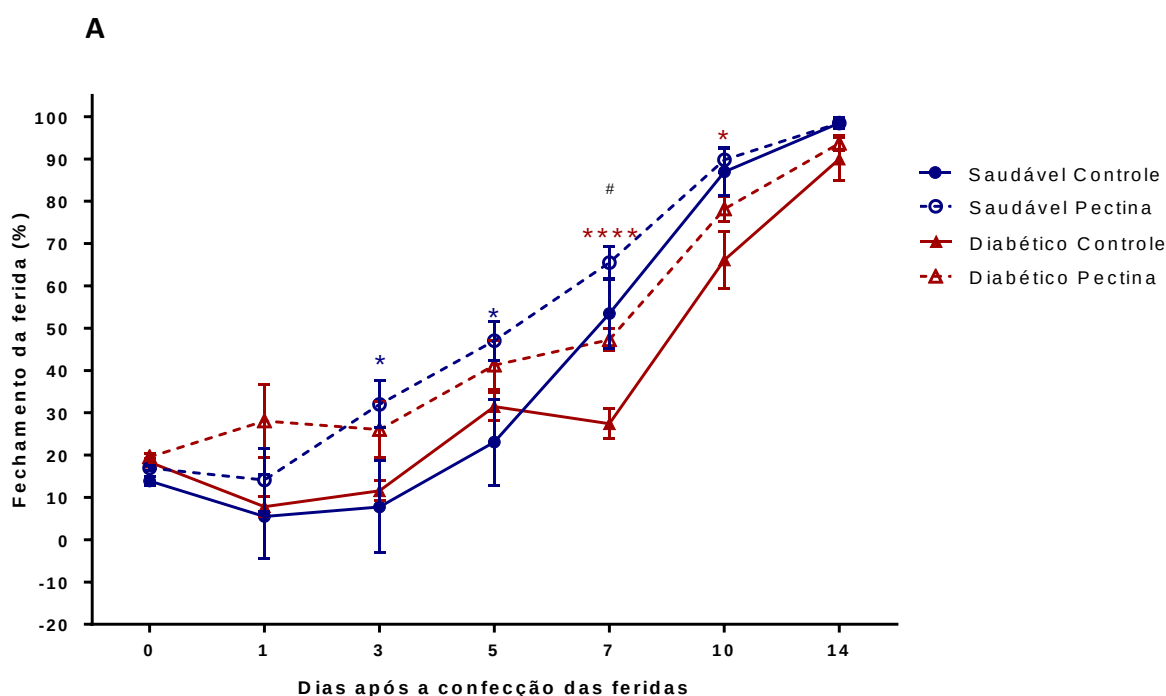
O estudo da cicatrização ocorreu pela análise da cinética de fechamento das feridas, resultado expresso em porcentagem de fechamento (Figura 13). A análise ocorreu nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a confecção das feridas. Verificou-se que no 3º e 5º dia após a confecção das feridas, o grupo saudável tratado com pectina apresentou um fechamento mais significativo, em relação ao seu controle, o grupo saudável controle (Figura 13A).

No contexto diabético, o grupo tratado com pectina apresentou um aumento significativo no fechamento, no 7º dia após a confecção das feridas, com relação ao seu grupo controle (Figura 13A, 13B). No contexto da ferida diabética e infectada, a pectina auxiliou

positivamente o fechamento das feridas no 14º dia, em contraste com o seu controle, o grupo diabético infectado controle, cujas feridas se encontravam abertas no 14º dia (Figura 13B) e ainda se apresentaram maiores do que as feridas originais.

Quanto às comparações referentes aos diferentes modelos, observou-se diferenças entre o grupo saudável controle e o diabético controle, no 7º dia pós feridas (Figura 13A) e entre o grupo diabético controle e diabético infectado controle, no 1º e 14º dia (Figura 13B).

Na análise macroscópica das feridas (Figura 13C), observou-se que as feridas do grupo diabético pectina (DP) apresentaram cicatrizes menos evidentes no 14º dia, em comparação com o grupo diabético controle (DC), no qual os animais ainda apresentavam cicatrizes mais fragilizadas e visíveis. No grupo diabético com infecção, tanto no controle quanto no tratado com pectina (DIC e DIP), observou-se presença de eritema e exsudato abundante, espesso e de cor amarelada. As feridas de ambos os grupos, foram aumentando ao longo dos dias, até o 7º dia, contudo, observou-se que do 10º ao 14º dia, as feridas do grupo diabético infectado pectina (DIP) conseguiram progredir na cicatrização e realizaram o fechamento, apesar da infecção. De forma oposta, as feridas do grupo diabético infectado controle (DIC) continuaram aumentando, e no 14º dia estavam, em média, maiores do que seu tamanho original. As feridas do grupo diabético infectado pectina (DIP) apresentaram menor presença de exsudato, comparado ao seu controle, o que pode ser visualizado nas fotos representativas dos dias 3 e 5 (Figura 13C).



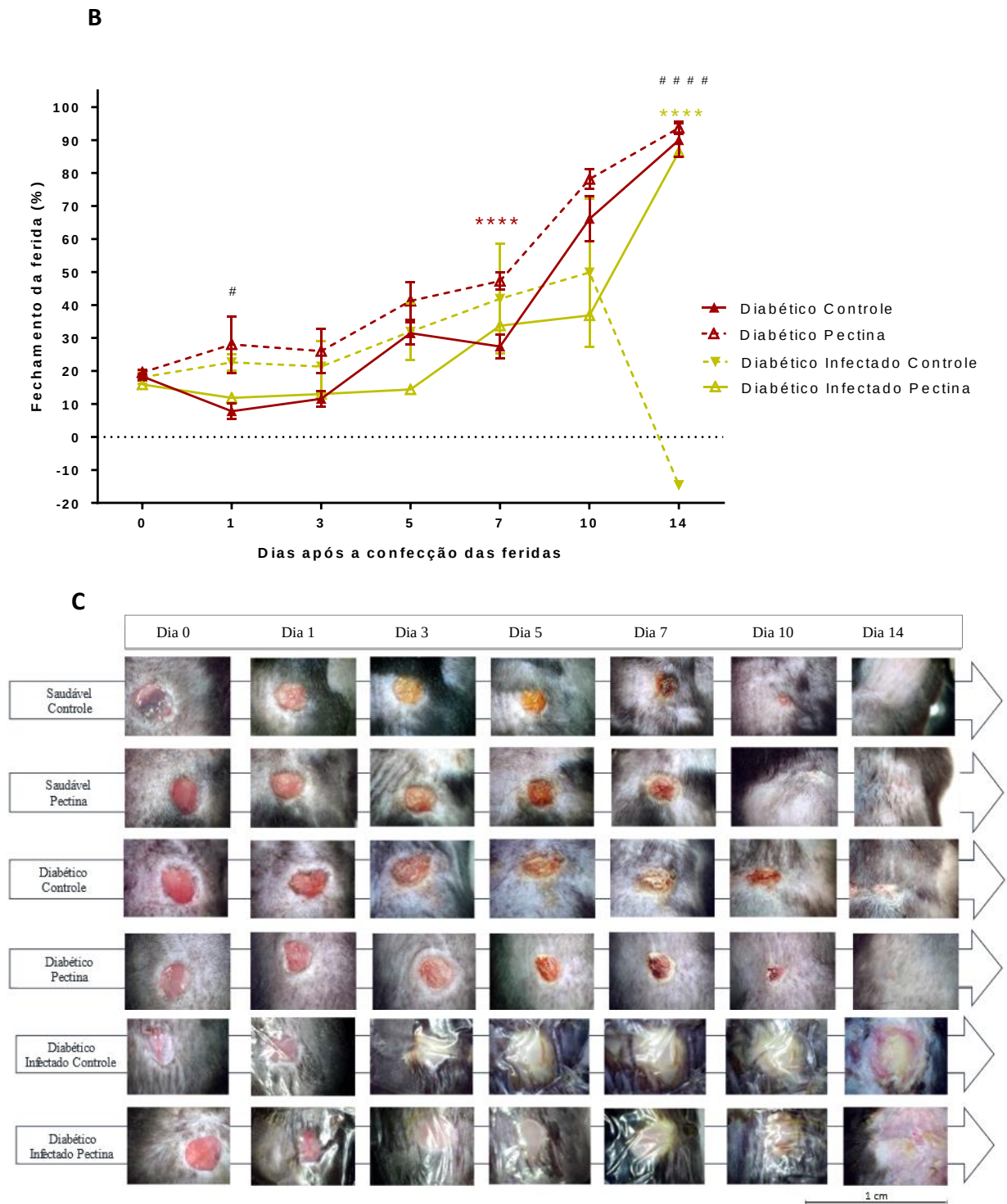


Figura 13: Cinética de fechamento das feridas, grupos saudáveis *versus* diabéticos (A); diabéticos *versus* diabéticos com infecção (B) e imagens macroscópicas e representativas do perfil temporal de fechamento das feridas de cada grupo (C). As medidas e imagens foram obtidas nos tempos 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a confecção das feridas. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 2-11$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); são representadas por cerquilhas (#); * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; # $p < 0.05$; #### $p < 0.0001$.

6.6. Análise do plaqueamento e teste de halo dispersão

A quantificação de *P. aeruginosa* nas amostras se deu através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) após plaqueamento e incubação do macerado das feridas. A análise foi realizada com as feridas coletadas no 7º e no 14º dia após a confecção das feridas (Figura 14). No 7º dia não se observou diferença significativa na contagem de *P. aeruginosa* entre os grupos. Contudo, no 14º dia observa-se que os grupos infectados possuem igualmente uma contagem de *P. aeruginosa* significativamente superior aos grupos saudáveis e diabéticos sem infecção. A análise evidencia que não houve diferença na contagem entre o grupo diabético infectado tratado com pectina e o seu controle, o grupo diabético infectado controle. Ambos possuem a mesma carga bacteriana em ambos os tempos analisados.

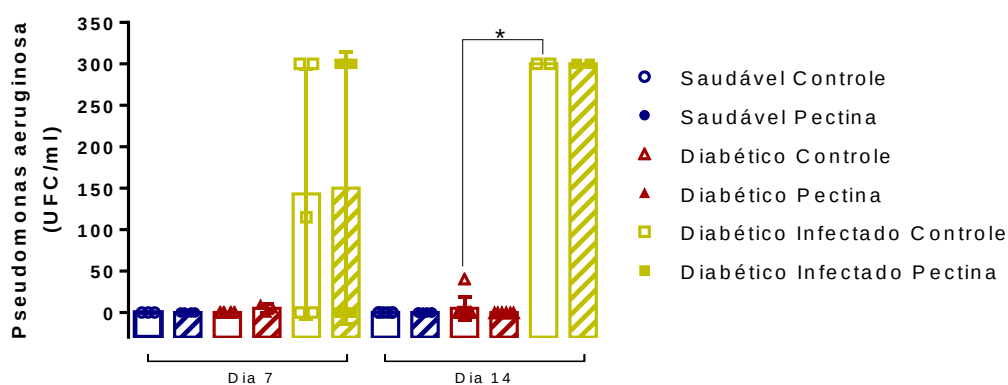


Figura 14: Quantificação de *P. aeruginosa* nas feridas, realizado através de plaqueamento do macerado das feridas. Análise realizada com as feridas obtidas no 7º e 14º dia após a confecção das feridas. Dados expressos como média $\pm$ EPM, n= 3-8 animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*); *p < 0.05.

6.7. Análise histológica das feridas

6.7.1. Infiltrado inflamatório das feridas

As análises histológicas foram realizadas com as feridas coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção das feridas. Verificou-se que o grupo diabético infectado e tratado com pectina apresentou maior infiltrado inflamatório no 7º dia (Figura 15).

A análise do 7º *versus* o 14º dia evidencia que, com exceção do diabético infectado controle, todos os demais grupos tiveram uma redução do infiltrado inflamatório.

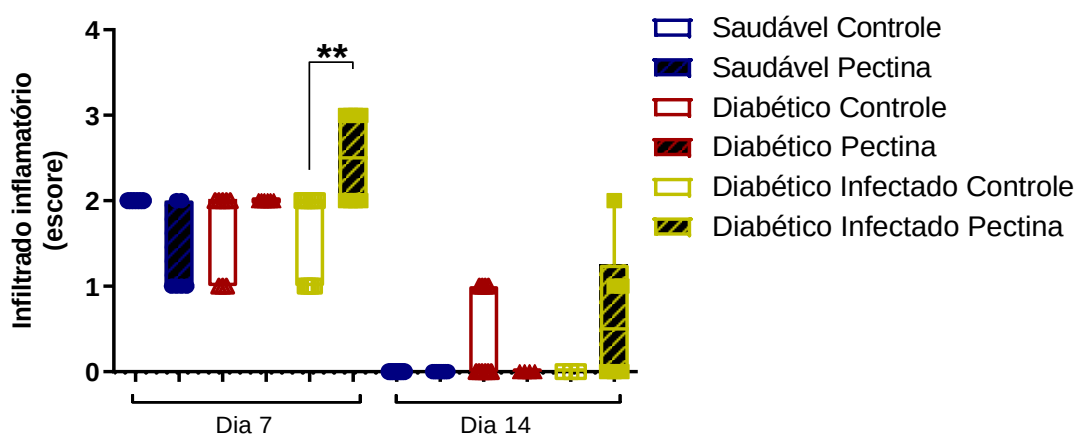


Figura 15: Avaliação qualitativa de infiltrado inflamatório por escore histológico. As feridas foram coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como mediana e amplitude total da pontuação do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Mann-Whitney entre tratamentos (dieta controle *versus* dieta pectina) e representada por asterisco (*) ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações de múltiplas de Dunn entre modelos (saudável *versus* diabético *versus* diabético infectado) e representada por cerquilha (#) quando presentes, n= 2-10 animais/grupo ** p < 0.005.

6.7.2. Espessura da crosta

A análise da espessura da crosta (Figura 16) evidenciou que, no 14º dia, o grupo diabético com dieta controle apresentou a espessura da crosta significativamente superior ao do grupo saudável controle.

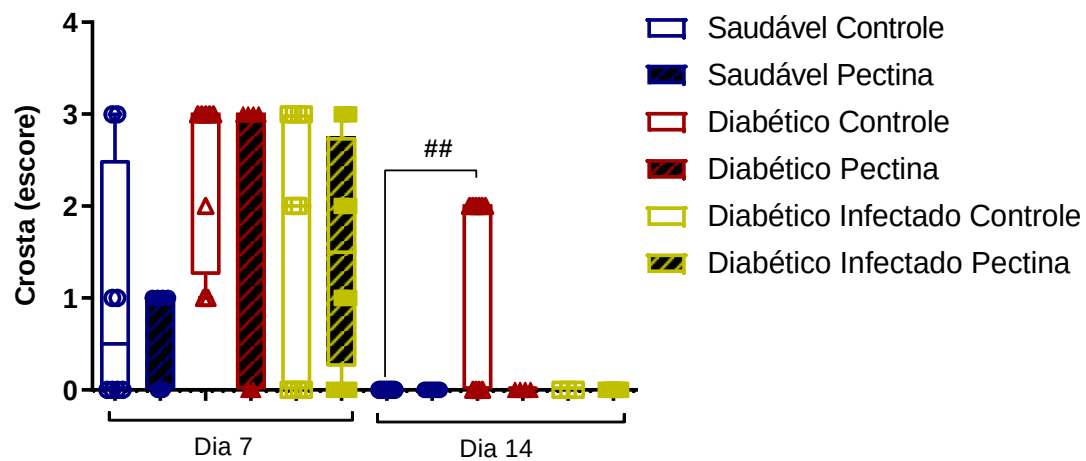


Figura 16: Avaliação qualitativa da formação da crosta nas feridas por escore histológico. As feridas foram coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como mediana e amplitude total da pontuação do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Mann-Whitney entre tratamentos (dieta controle *versus* dieta pectina) e representada por asterisco (*) ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações de múltiplas de Dunn entre modelos (saudável *versus* diabético *versus* diabético infectado) e representada por cerquilha (#) quando presentes, ##p <0.001.

6.7.3. Tecido de granulação

No 7º dia, foi evidenciado que a pectina reduziu o tecido de granulação (Figura 17) do grupo saudável, quando comparado ao seu controle. No 14º dia, o grupo diabético tratado com pectina reduziu o tecido de granulação, quando comparado ao seu controle. O grupo diabético controle, apresentou maior tecido de granulação, com relação ao grupo saudável controle e ao grupo diabético infectado controle, no 14º dia.

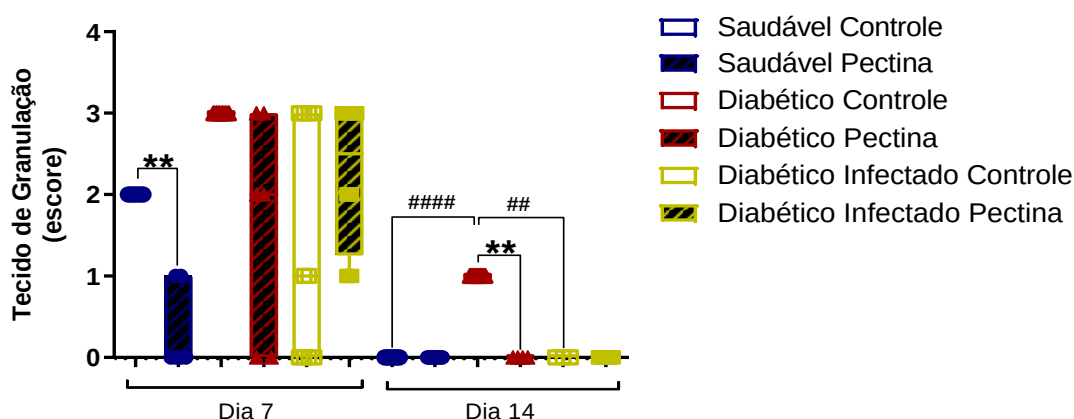


Figura 17: Avaliação qualitativa do tecido de granulação das feridas por escore histológico. As feridas foram coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como mediana e amplitude total da pontuação do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Mann-Whitney entre tratamentos (dieta controle *versus* dieta pectina) e representada por asterisco (*) ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações de múltiplas de Dunn entre modelos (saudável *versus* diabético *versus* diabético infectado) e representada por cerquilha (#) quando presentes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

6.7.4. Epitelização

A análise da epitelização (Figura 18) evidenciou que, no tempo de 14 dias, a epitelização dos grupos saudáveis foi similar. No grupo diabético, com e sem infecção, no 14º dia, observou-se que o tratamento com pectina promoveu uma maior epitelização das feridas. Verificou-se que o grupo diabético controle apresentou menor epitelização, comparado ao grupo saudável controle. De forma similar, o grupo diabético infectado controle apresentou menor epitelização do que o grupo diabético controle. Evidenciamos que todos os grupos, com exceção do diabético infectado controle, apresentaram um aumento na epitelização, do 7º para o 14º dia.

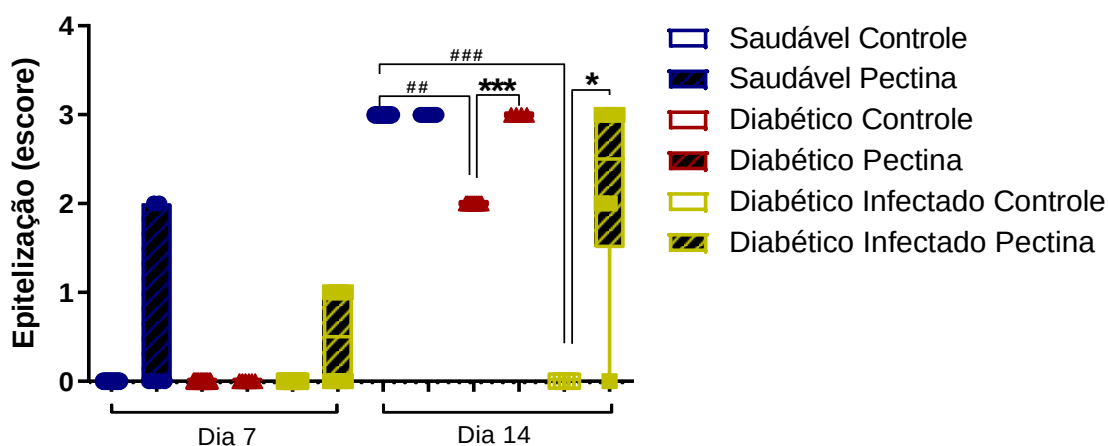


Figura 18: Avaliação qualitativa de infiltrado inflamatório por escore histológico. As feridas foram coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como mediana e amplitude total da pontuação do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Mann-Whitney entre tratamentos (dieta controle *versus* dieta pectina) e representada por asterisco (*) ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações de múltiplas de Dunn entre modelos (saudável *versus* diabético *versus* diabético infectado) e representada por cerquilha (#) quando presentes; *p < 0.05; ***p < 0.001; ###p < 0.001; ####p < 0.0001.

6.7.5. Escore total

A análise do escore total (Figura 19) leva em consideração a média dos demais escores e seu valor evidencia a gravidade do processo de cicatrização. Assim, quanto maior o escore total, maior é a gravidade e comprometimento do processo cicatricial. Verificou-se que o grupo saudável e tratado com pectina obteve o menor escore no 7º dia, com relação ao seu controle. O tratamento também proporcionou uma redução do escore do grupo diabético, no 14º dia. Verificou-se que o grupo diabético controle obteve maior escore, comparado ao grupo saudável controle, tanto no 7º quanto no 14º dia, indicando a gravidade do diabetes na cicatrização. Comparando o 7º *versus* o 14º dia, verifica-se que, com exceção do grupo diabético infectado controle, todos os demais grupos tiveram uma redução significativa do seu escore, ou seja, uma melhora dos parâmetros histológicos, inclusive o grupo diabético infectado tratado.

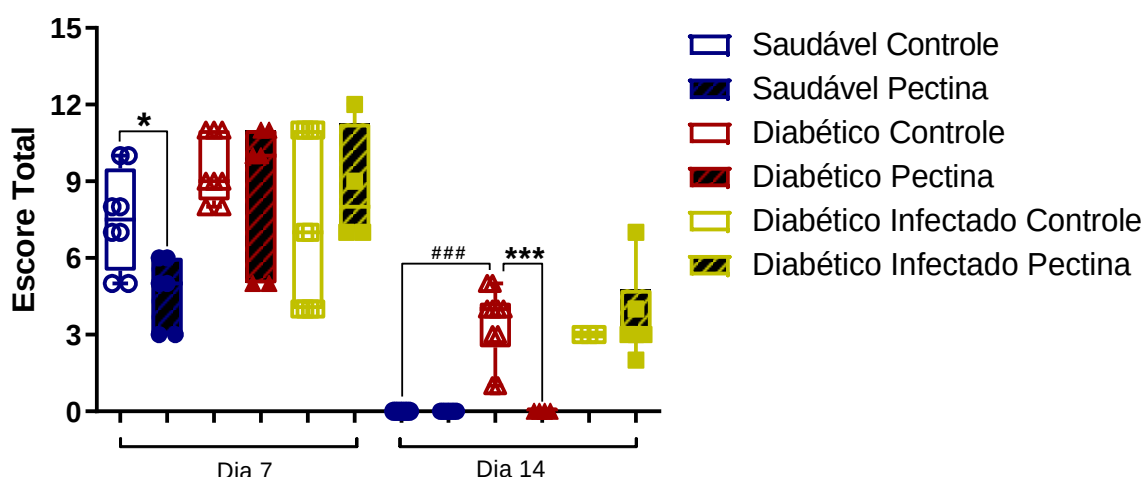


Figura 19: Soma dos escores histológicos de análise do infiltrado, formação de crosta, tecido de granulação e epitelização. Escores elevados representam maior gravidade e escores reduzidos indicam melhores parâmetros histológicos. Dados expressos como mediana e amplitude total da pontuação do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Mann-Whitney entre tratamentos (dieta controle *versus* dieta pectina) e representada por asterisco (*) ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações de múltiplas de Dunn entre modelos (saudável *versus* diabético *versus* diabético infetactado) e representada por cerquilha (#) quando presentes; *p < 0.05; #p < 0.05; ###p < 0,0001.

6.7.6. Fotomicrografias da pele basal e das feridas coletadas

As fotomicrografias ilustram a evolução da cicatrização em todos os grupos, no tempo basal (Figura 20), no 7º (Figura 21) e no 14º dia após a confecção das feridas (Figura 22). As fotos representativas dos grupos ilustram as principais observações. No tempo basal, (Figura 20) é possível observar a derme íntegra de todos os grupos, saudáveis (A e B) e diabéticos (C e D). Importante ressaltar que, neste tempo, o grupo diabético ainda não tinha sido subdividido entre diabético e diabético com infecção. Os grupos alimentados com pectina, saudável (B) e diabético (D) evidenciam maior espessura do tecido e um maior número de folículos pilosos, com relação aos controles. O grupo diabético controle (C) apresentou escassez de tecido adiposo, com relação ao saudável controle (A).

No 7º dia após a confecção das feridas (Figura 21) observa-se maior área cicatricial, com tecido de granulação (TG) (Figura 21A) e infiltrado celular (*) (Figura 21 C, E), comparado aos demais tempos. A formação de crosta (seta) (Figura 21 C, D, E) já é evidente, as feridas já se encontram em fase de epitelização, sendo esta fase mais avançada nos grupos saudáveis (Figura 21 A, B).

No 14º dia (Figura 22) observa-se a epitelização completa das feridas, com exceção do grupo diabético infectado e com dieta controle (Figura 22E). O grupo diabético controle contou com a epitelização completa, contudo, observa-se ainda a existência de crosta (seta) (Figura 22C). O grupo diabético com ferida infectada e dieta controle não foi capaz de realizar o fechamento das feridas, diferentemente do grupo tratado com pectina. Os cortes histológicos desse grupo apresentam-se com uma lacuna na região da ferida (Figura 22E), pela fragilidade do tecido, em função do abundante exsudato que caracterizou este grupo no 14º dia, o que pode ser observado na figura 22E1.

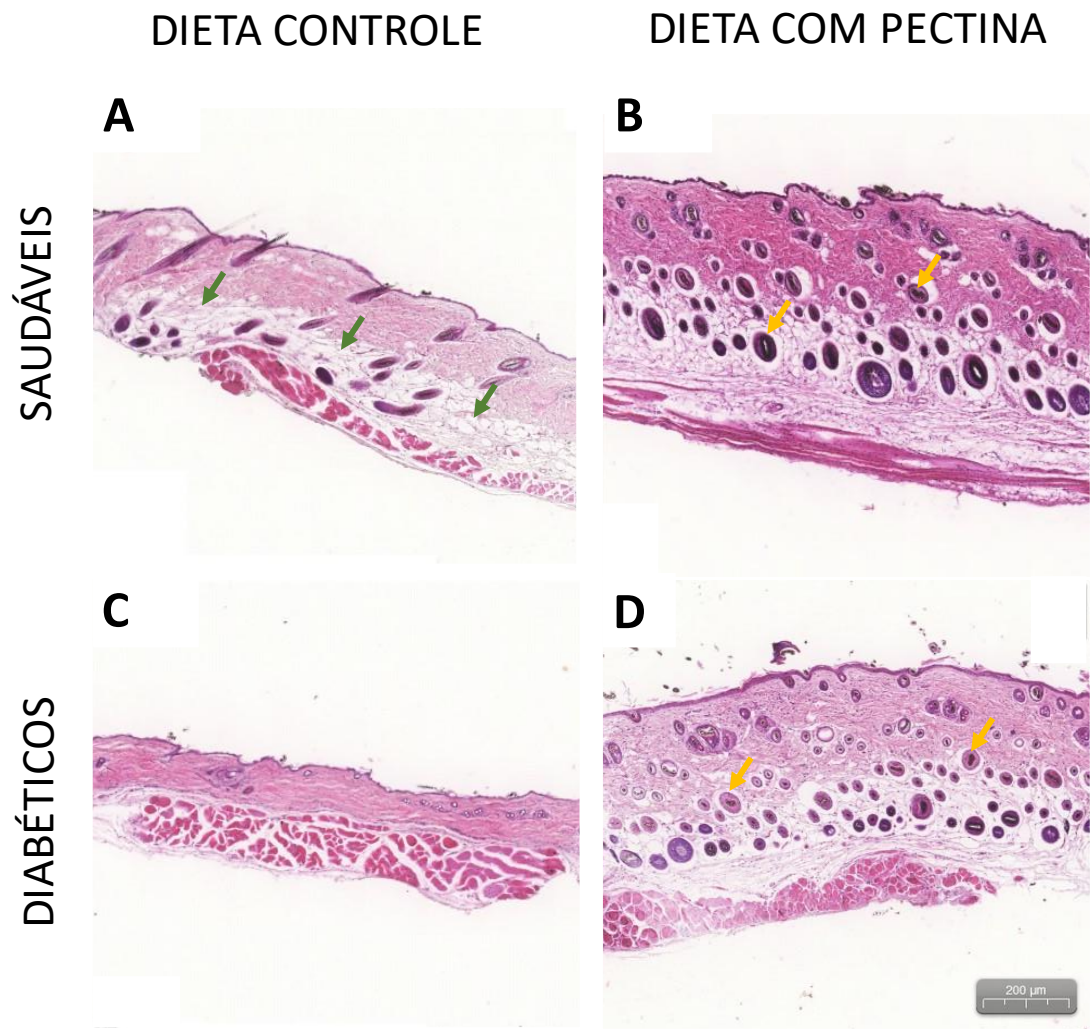


Figura 20: Fotomicrografias de cortes histológicos de 5 μ m, corados com hematoxilina e eosina, representativas dos grupos: saudável com dieta controle (A), saudável tratado com dieta rica em pectina (B), diabético com dieta controle (C) e diabético com dieta rica em pectina (D). Os tecidos foram coletados no momento de confecção das feridas, anteriormente à existência de grupos infectados. No momento da coleta, os animais possuíam duas semanas de alimentação com as dietas experimentais. Em destaque: folículo piloso (seta amarela) e tecido adiposo (seta verde). Todas as imagens possuem igualmente o aumento de 12 vezes (Pannoramic Viewer®) (escala na foto).

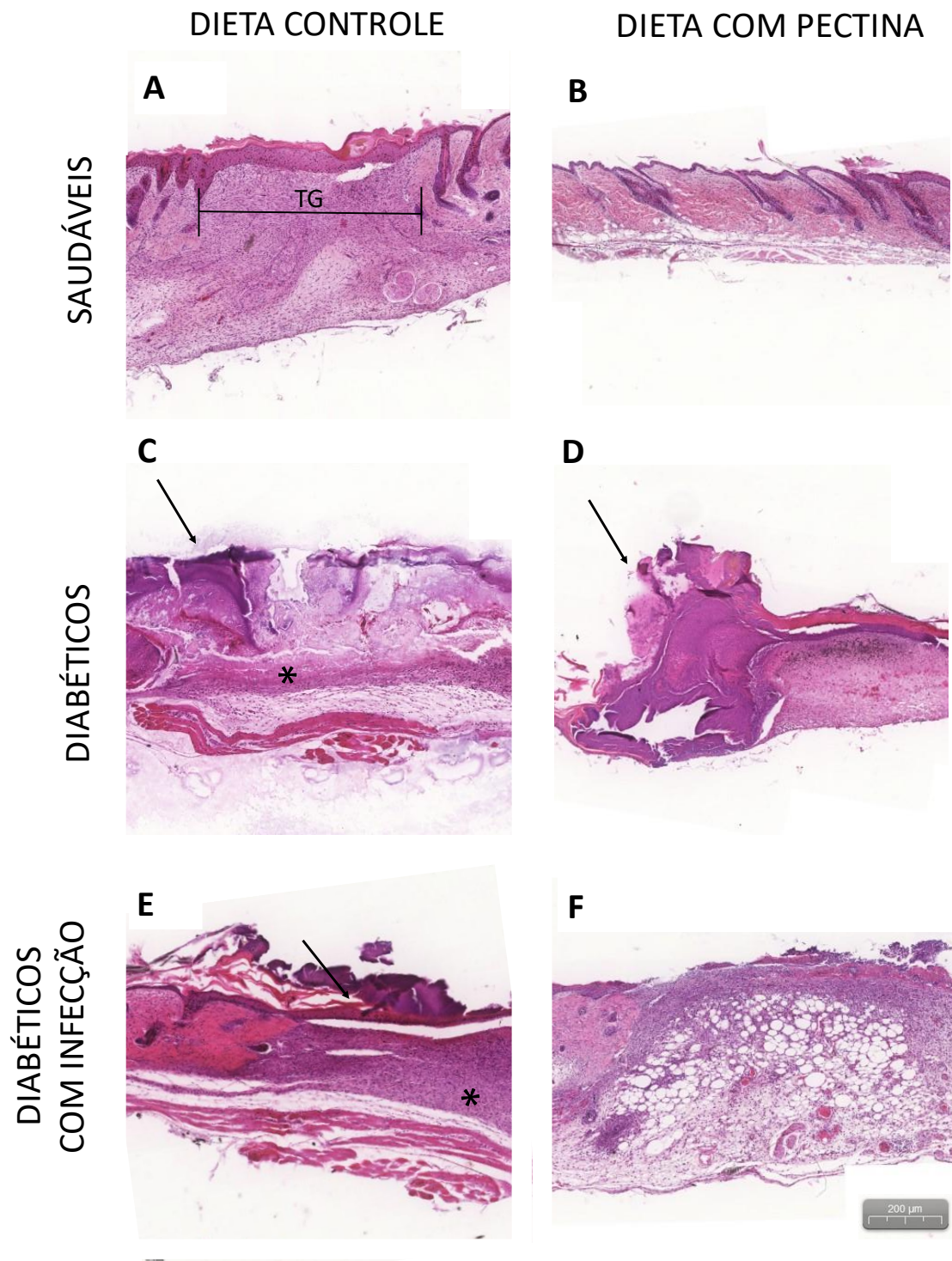


Figura 21: Fotomicrografias de cortes histológicos de 5 μ m, corados com hematoxilina e eosina, representativas dos grupos: saudável com dieta controle (A), saudável tratado com dieta rica em pectina (B), diabético com dieta controle (C), diabético com dieta rica em pectina (D), diabético infectado com dieta controle (E) e diabético infectado com dieta rica em pectina. Os tecidos foram coletados o 7º dia após a confecção das feridas. No momento da coleta, os animais possuíam três semanas de alimentação com as dietas experimentais. Todas as imagens possuem igualmente o aumento de 12 vezes (Pannoramic Viewer®) (escala na foto).

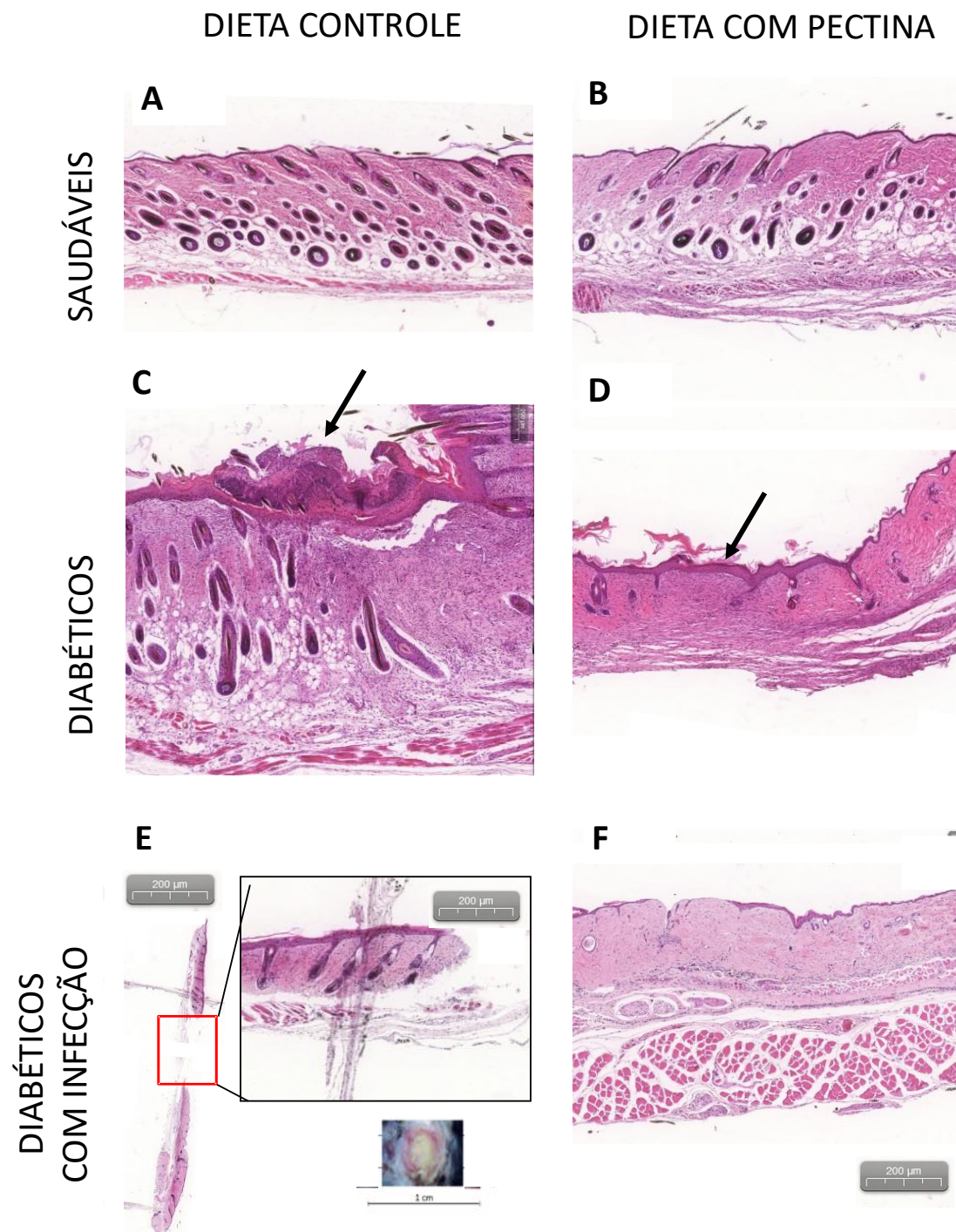


Figura 22: Fotomicrografias de cortes histológicos de 5 μ m, corados com hematoxilina e eosina, representativas dos grupos: saudável com dieta controle (A), saudável tratado com dieta rica em pectina (B), diabético com dieta controle (C), diabético com dieta rica em pectina (D), diabético infectado com dieta controle (E) e diabético infectado com dieta rica em pectina. Os tecidos foram coletados o 14º dia após a confecção das feridas. No momento da coleta, os animais possuíam quatro semanas de alimentação com as dietas experimentais. Todas as imagens possuem igualmente o aumento de 12 vezes (Pannoramic Viewer®) (escala na foto).

6.7.7. Contagem de capilares

A análise de capilares da pele basal e das feridas (Figura 23) evidenciou que, no tempo basal, no qual ocorreu a confecção das feridas, a pele do grupo alimentado com pectina já apresentava maior número de capilares, com relação aos seus controles. Este aumento foi verificado no grupo saudável, diabético e diabético com infecção. No 7º dia, a pectina proporcionou um aumento de capilares no grupo diabético com ferida infectada. No 14º dia observou-se que a pectina aumentou o número de capilares no grupo diabético, mas reduziu o número de capilares no grupo saudável.

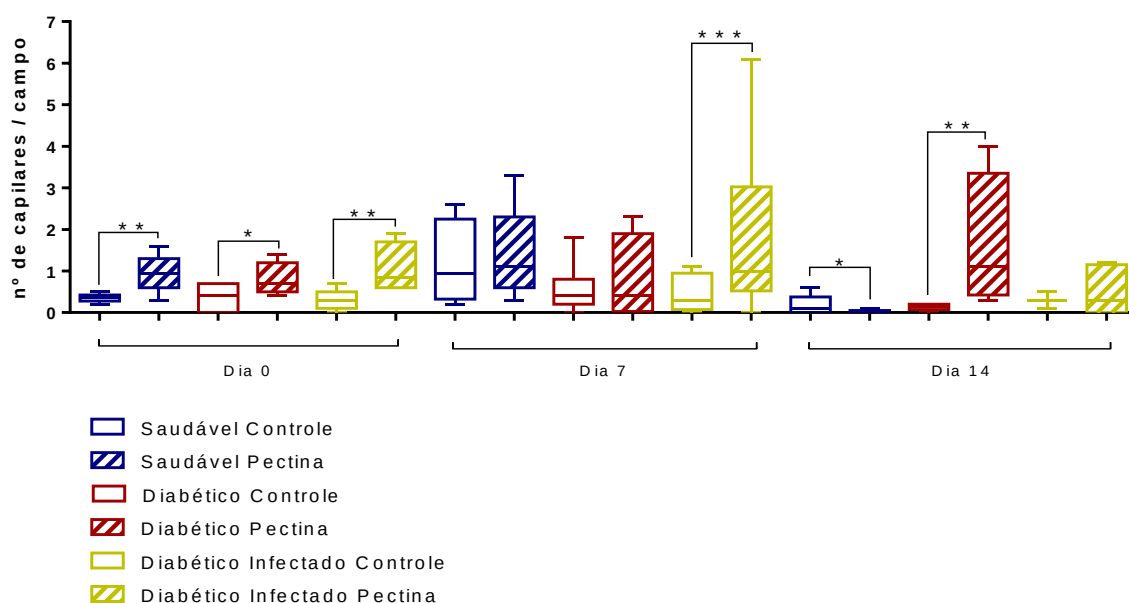


Figura 23: Contagem de capilares na pele basal e nas feridas coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção das feridas. A contagem de capilares foi realizada no laminário histológico corado com Trocômico de Masson. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n=15$ campos de cada lâmina/animal, de cada grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); são representadas por cerquilhas (#); * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; # $p < 0.05$; ### $p < 0.0001$.

6.8. Leucócitos totais circulantes

A análise de leucócitos totais (Figura 24) foi realizada nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias, após a confecção das feridas, utilizando o sangue da cauda. No 5º dia verificou-se que a pectina reduziu os leucócitos circulantes do grupo diabético infectado controle.

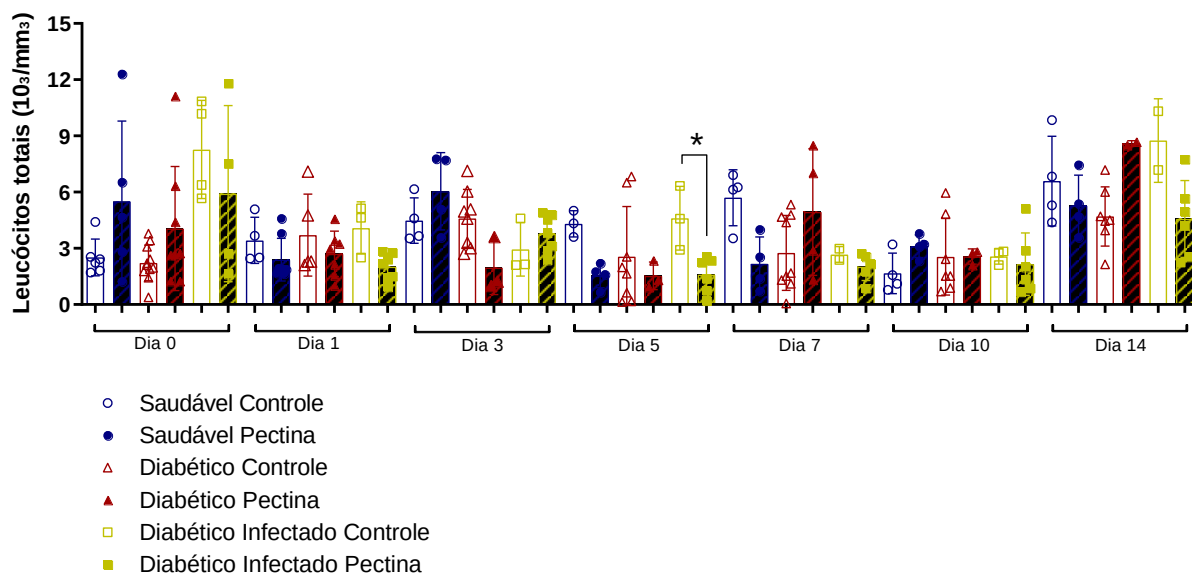


Figura 24: Perfil de leucócitos totais circulantes. Análise realizada nos tempos 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a confecção das feridas. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 2-12$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*); * $p < 0,05$.

6.9. Infiltrado de macrófagos nas feridas

A quantificação do acúmulo de macrófagos (Figura 25) nas feridas foi avaliado pela atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), presente no interior dos macrófagos. Esta análise indicou que não houve diferença significativa entre o infiltrado de macrófagos dos grupos nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção das feridas.

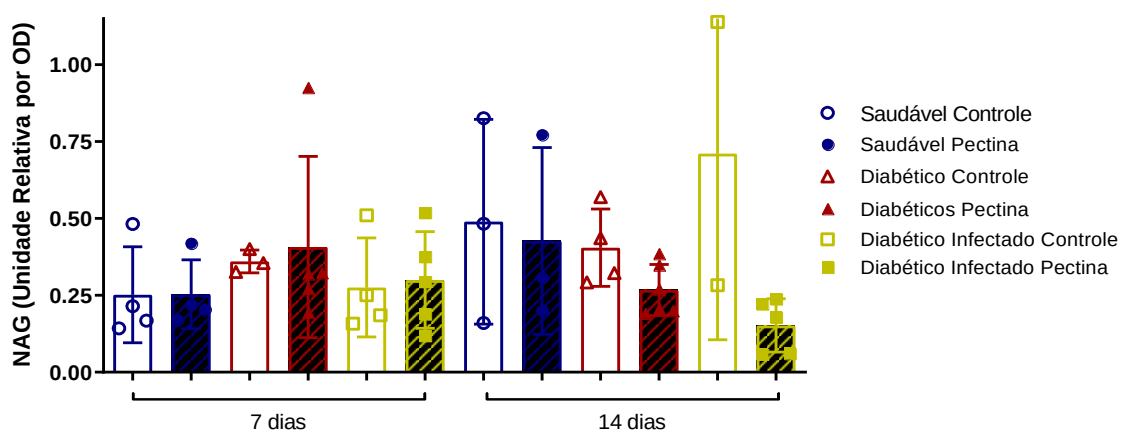


Figura 25: Quantificação de macrófagos nas feridas, nos dias 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como média $\pm$ EPM, n= 2-6 animais/grupo.

6.10. Infiltrado de neutrófilos nas feridas

A quantificação do infiltrado de neutrófilos nas feridas (Figura 26) foi mensurado pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos. O 7º dia, a pectina reduziu o infiltrado de neutrófilos do grupo saudável. Já no 14º dia, observou-se uma reversão desse parâmetro, no qual a pectina proporcionou um aumento de neutrófilos no grupo saudável.

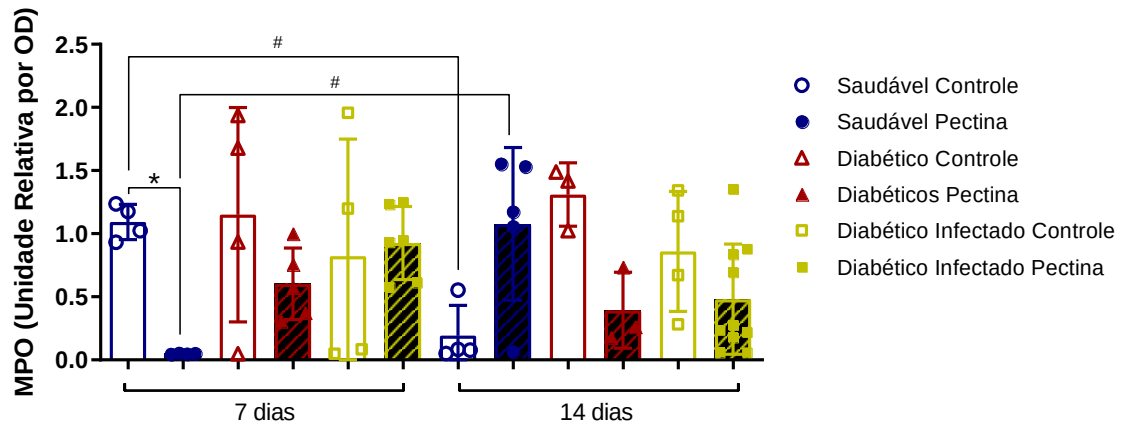
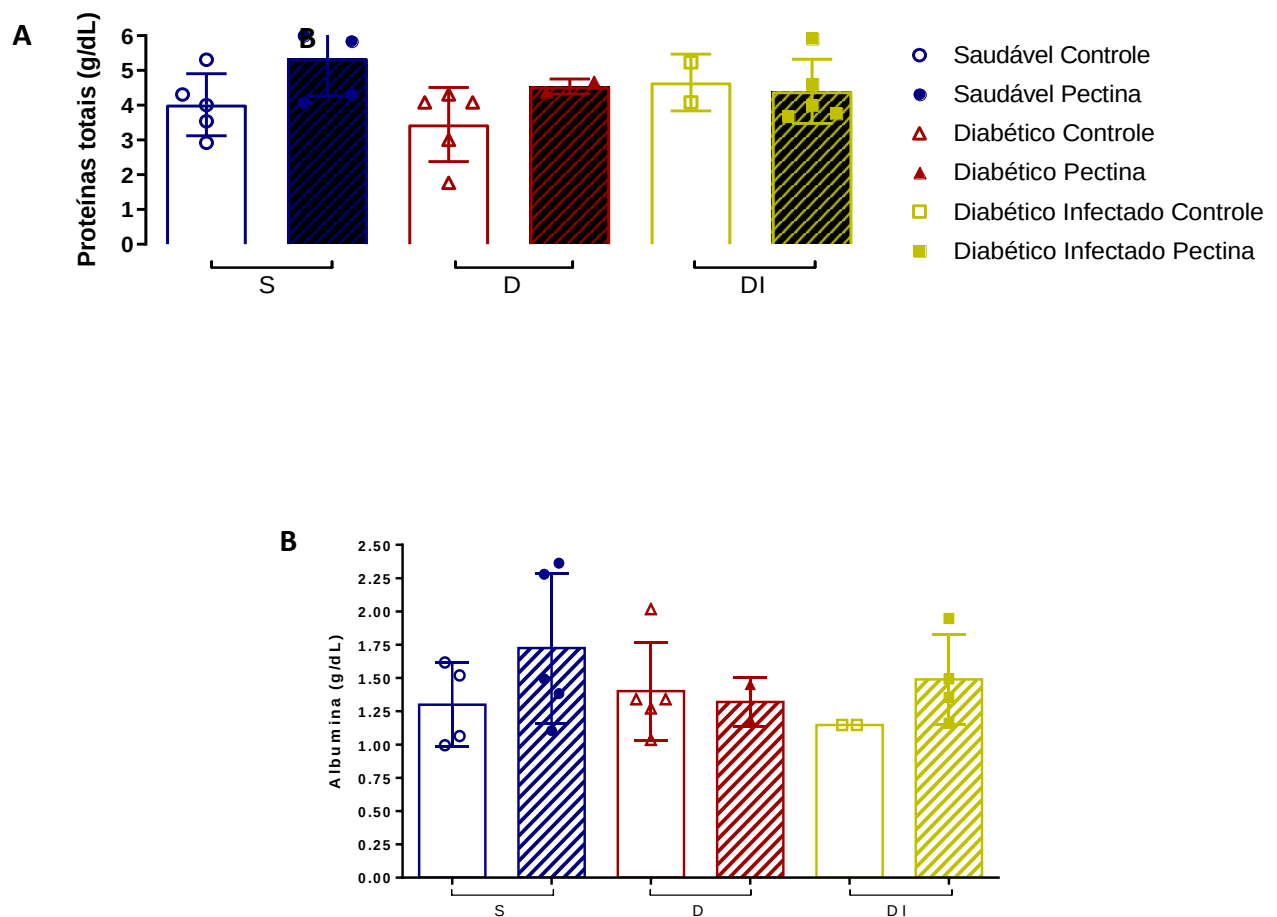


Figura 26: Quantificação de macrófagos nas feridas, nos dias 7 e 14 dias após a confecção. Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 2-6$ animais/grupo. As diferenças intra-grupos são representadas por asteriscos (*); as diferenças inter-grupos são representadas por cerquilhas (#); * $p < 0.05$; # $p < 0.05$.

6.11. Proteínas totais, albumina e creatinina

Para avaliar existência de desnutrição proteica nos animais, que pode ocorrer associada a doenças crônicas e pode prejudicar a cicatrização das feridas, realizou-se a dosagem sérica de proteínas totais (Figura 27A) e albumina (Figura 27B) dos grupos saudáveis (S), diabéticos (D) e diabéticos com infecção (DI). A creatinina também foi avaliada (Figura 27C), visando investigar possíveis danos da diabetes nas funções renais. As amostras de soro utilizadas para tais dosagens foram coletadas no 14º dia após a confecção das feridas. Nenhum dos parâmetros apresentou diferenças significativas entre os grupos.



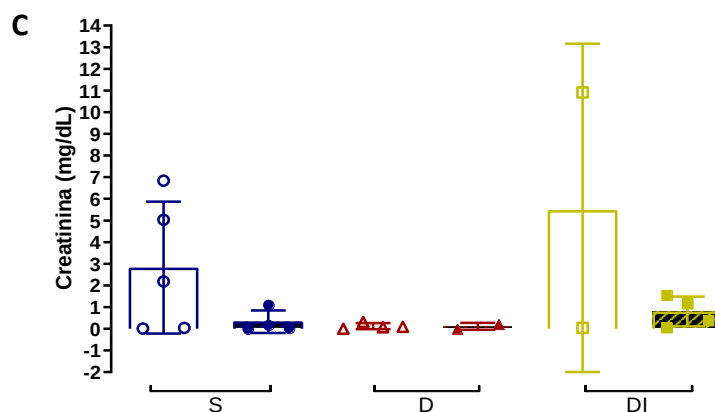
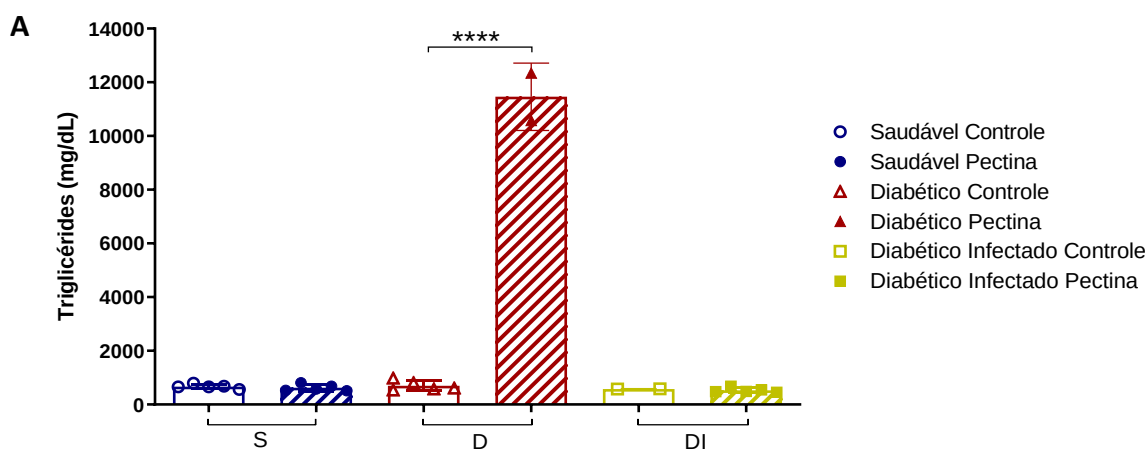


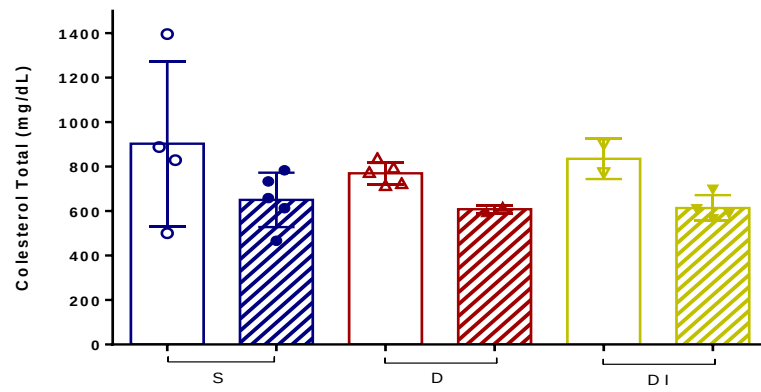
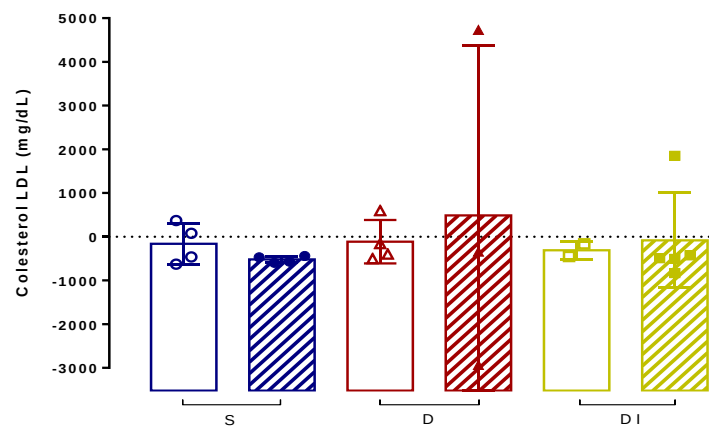
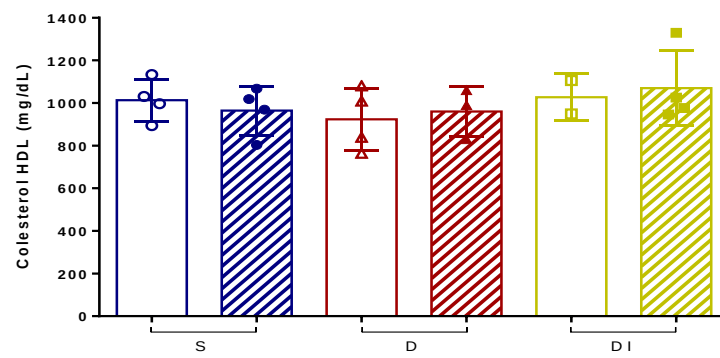
Figura 27: Dosagens de proteínas totais (A), albumina (B) e creatinina (C) dos grupos saudáveis (S), diabéticos (D) e diabéticos com infecção (DI). Análise realizada no soro coletado no 14º dia após a confecção das feridas. Dados expressos como média $\pm$ EPM, n= 2-5 animais/grupo.

6.12. Triglicérides, colesterol total, VLDV, LDL e HDL

A análise do perfil lipídico (Figura 28) dos grupos saudáveis (S), diabéticos (D) e diabéticos com infecção (DI), incluiu: dosagem de colesterol total (A); triglicérides (B); lipoproteínas de densidade muito baixa - VLDL (C); lipoproteínas de baixa densidade - LDL (D) e lipoproteínas de alta densidade - HDL (E). Os grupos saudáveis (S), diabéticos (D) e diabéticos com infecção (DI) tiveram o soro coletado no 14º dia após a confecção das feridas.

As dosagens de colesterol total (Figura 28A), HDL (Figura 28E) e LDL (Figura 28D) não apresentaram diferenças significativas. Quanto aos triglicérides e ao VLDL, o grupo diabético alimentado com pectina (DP) apresentou níveis elevados de ambos.



B**C****D**

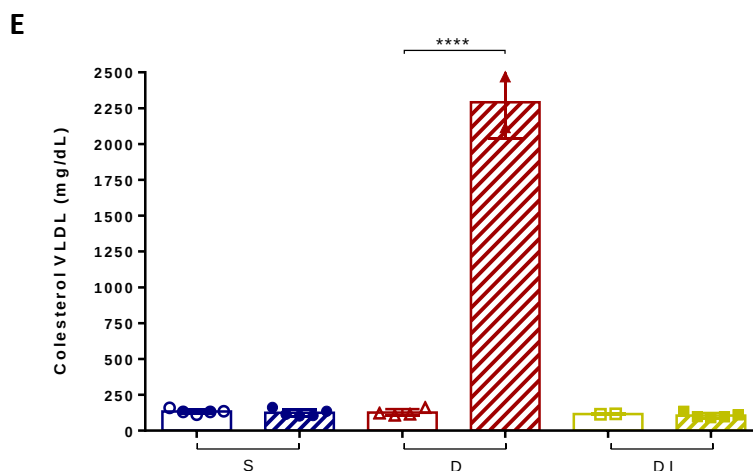


Figura 28: Perfil lipídico: colesterol total (A), triglicérides (B), HDL (C), LDL (D) e VLDL (E). Análise realizada com soro obtido no 14º no tempo de 14 dias após a confecção das feridas, com soro obtido do sangue por punção cardíaca, dos grupos saudáveis (S), diabéticos (D) e diabéticos com infecção (DI). Dados expressos como média $\pm$ EPM, $n = 2-5$ animais/grupo. As diferenças entre os grupos saudáveis (controle e tratado), diabéticos (controle e tratado) e diabético infectado (controle e tratado) são representadas por asteriscos (*). As diferenças entre os grupos saudável controle, diabético controle e diabético infectado controle são representadas por cerquilhas (#); são representadas por cerquilhas (#); **** $p < 0,0001$.

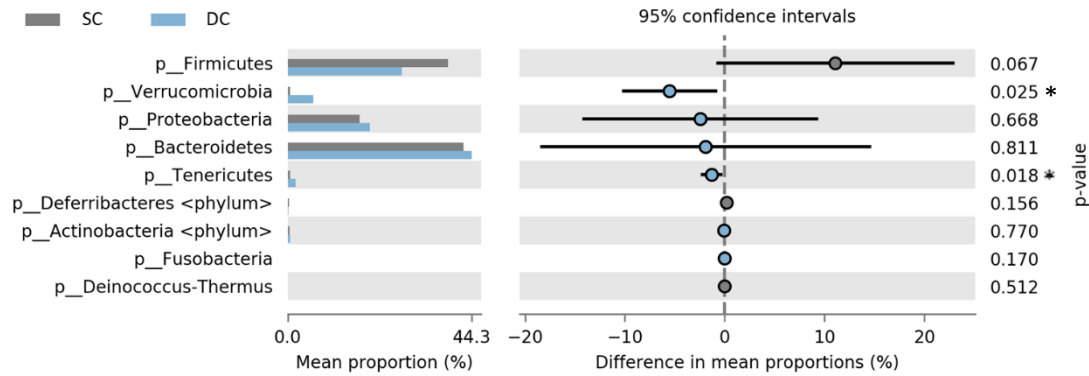
6.13. Metagenômica de fezes

6.13.1. Análise de fezes em momento anterior à administração das dietas experimentais

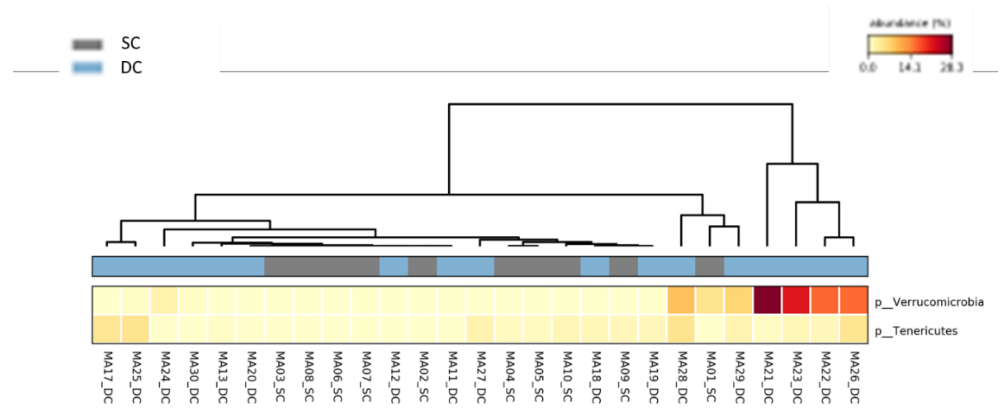
São demonstrados os gráficos referentes as análises da abundância relativa a nível de filo e de gênero; a análise da diversidade (Índice de Shannon), que considera o gênero e a diversidade das populações e a análise da dispersão, que considera os filios e a posição espacial das amostras em diferentes dimensões.

A comparação entre a microbiota fecal do grupo saudável e diabético (Figura 29), no momento que antecede a administração das dietas experimentais, evidenciou que o diabetes causou alterações na microbiota intestinal. Verificamos que o grupo diabético tratado com a dieta enriquecida com pectina possuía abundância significativamente aumentada para os filios *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, para os gêneros *Akkermansia* e *Aneroplasma* e reduzido para o gênero *Oscillospira*. A diversidade dos grupos não contou com diferenças significativas (Figura 29E), o que pode ser reforçado pelas posições das amostras no gráfico de dispersão (Figura 29F).

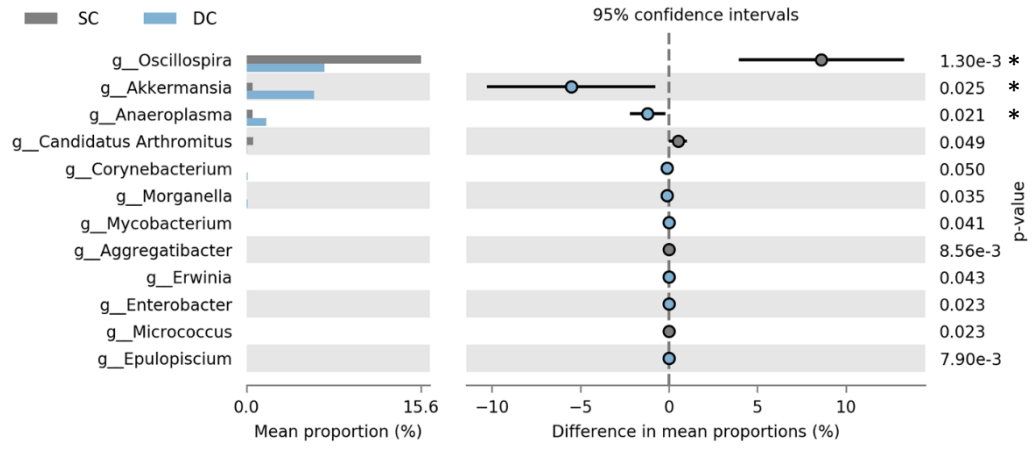
A

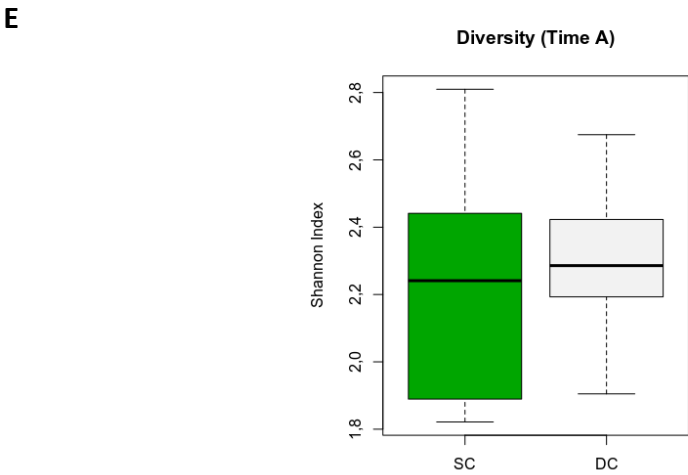
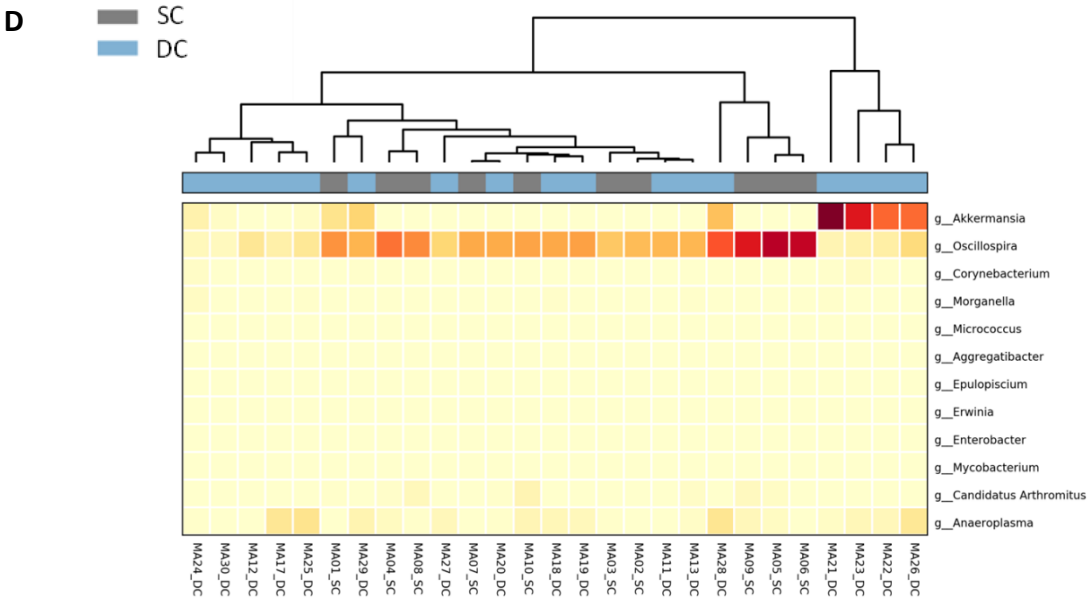


B



C





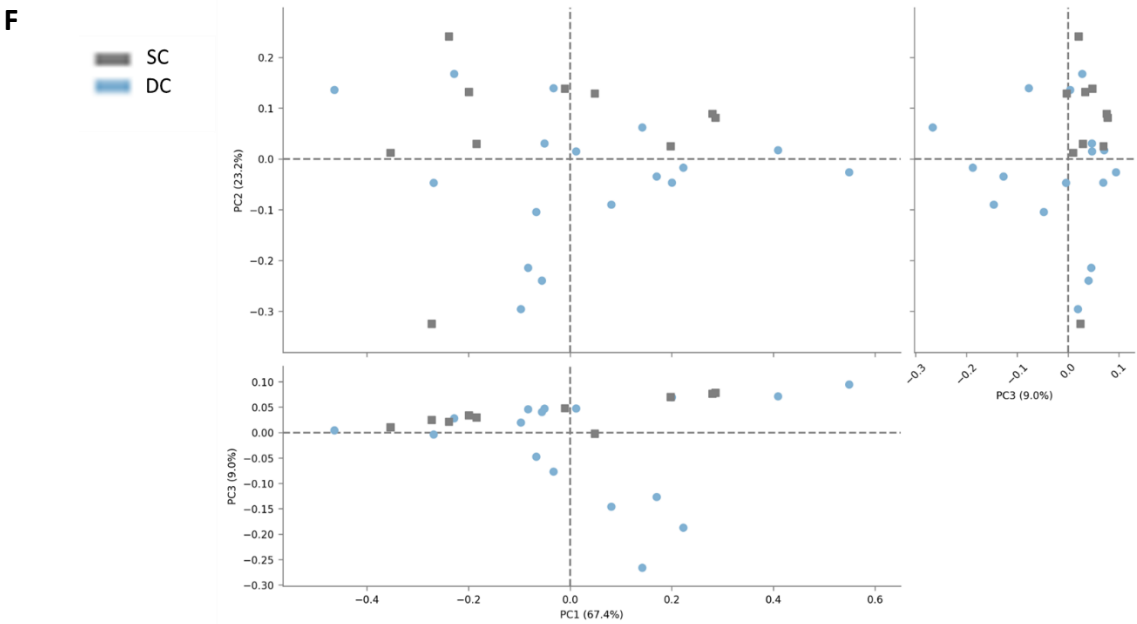
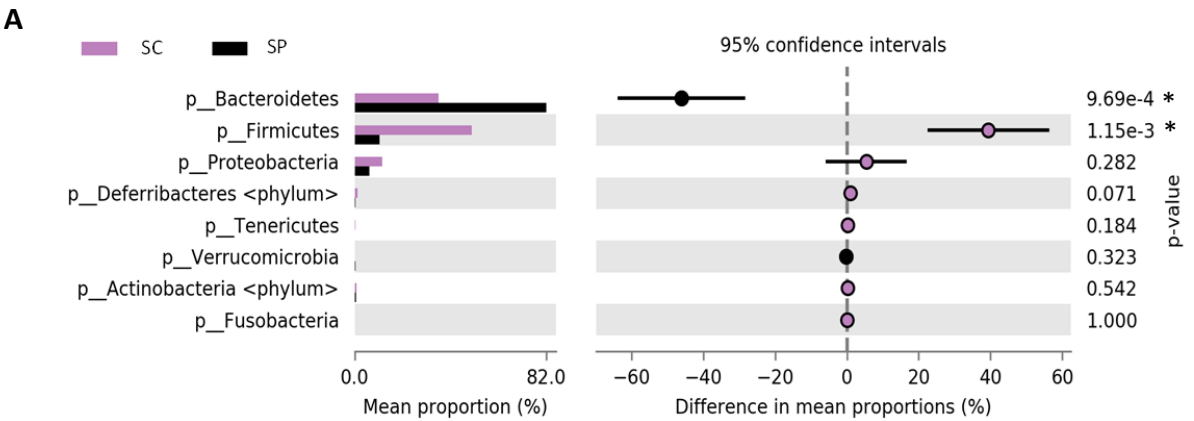
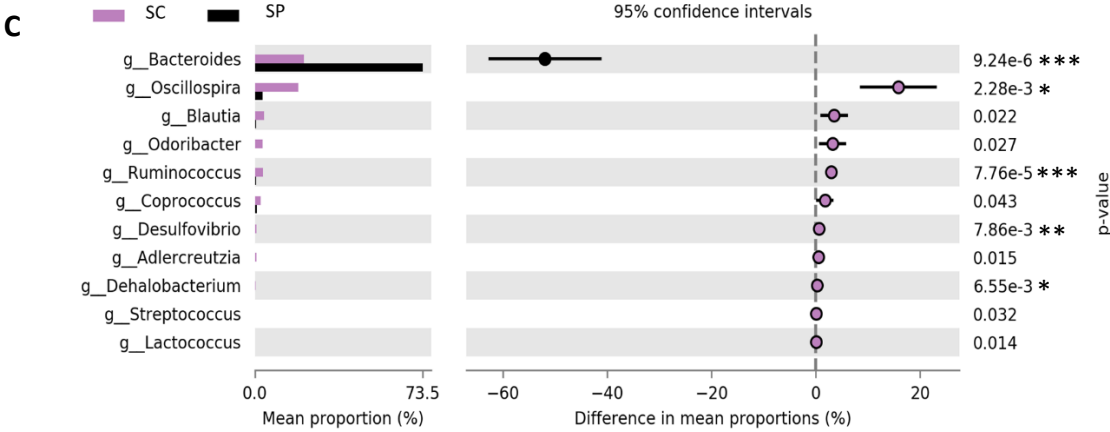
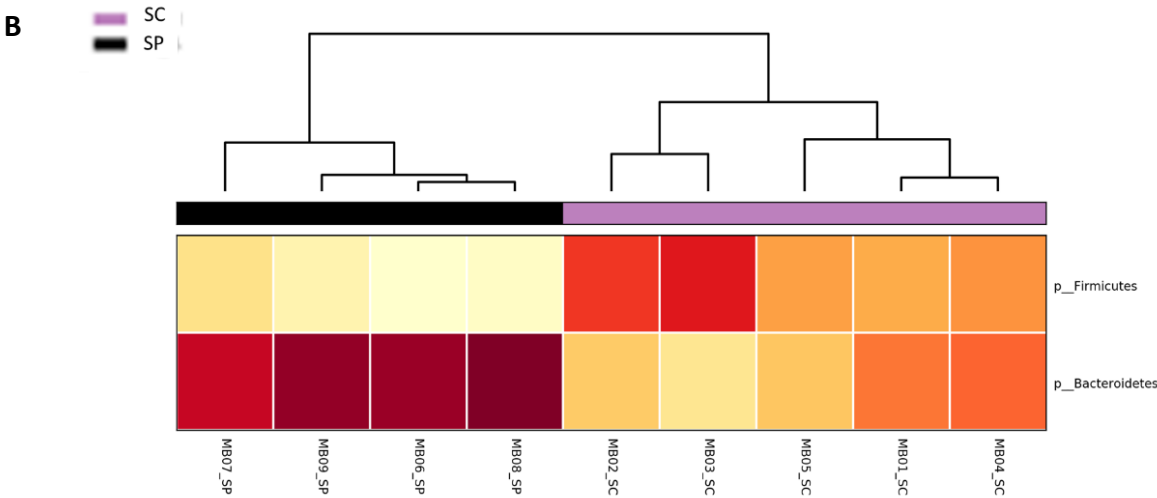


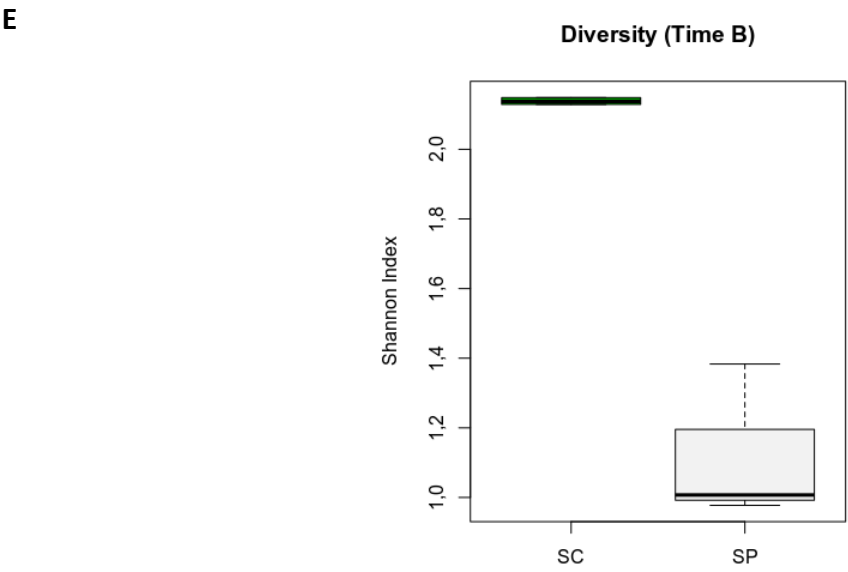
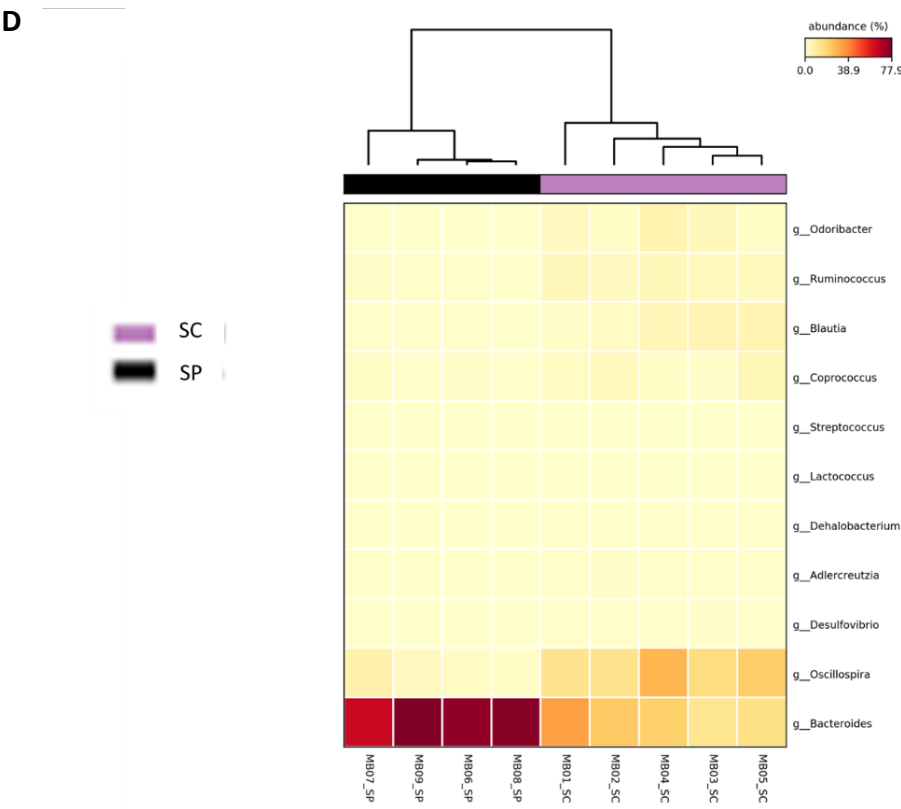
Figura 29: Análise das comunidades bacterianas das fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos saudável controle (SC) versus diabético controle (DC). As comunidades bacterianas foram apresentadas por filo (A) e gênero (C); abundância relativa por filo (B) e gênero (D); diversidade (E) e dispersão (F). As amostras de fezes foram coletadas anteriormente à administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$ e os valores de p são indicados nos gráficos.

6.13.2 Análise das fezes após duas semanas de dieta experimental

Analisando os grupos saudáveis após duas semanas de administração das dietas experimentais (Figura 30) verificou-se que a pectina proporcionou um aumento relativo na abundância do filo *Bacteroidetes*, no gênero *Bacteroides* e redução da abundância relativa do filo *Firmicutes* e dos gêneros *Oscillospira*, *g. Ruminococcus*, *g. Desulfovibrio* e *g. Dehaloacterium*.







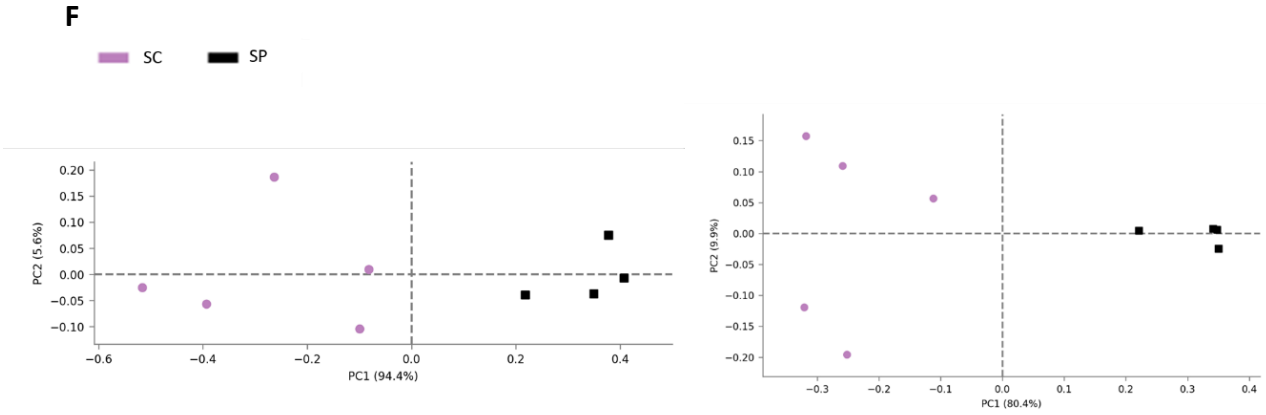
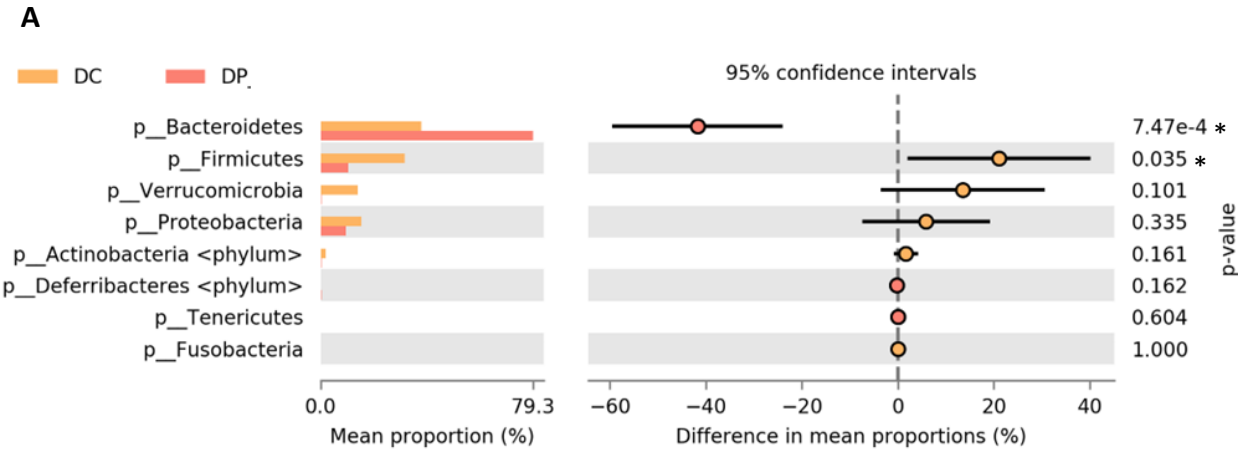
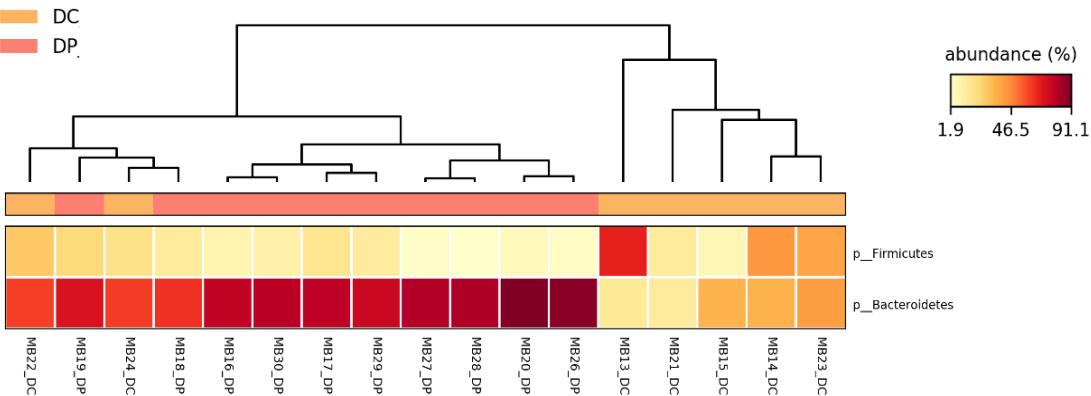


Figura 30: Análise das comunidades bacterianas das amostras de fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos saudável controle (SC) *versus* saudável pectina (SP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e gênero (C); abundância relativa por filo (B) e gênero (D); diversidade (E) e dispersão (F). Fezes coletadas após duas semanas do início da administração das dietas experimentais. Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$ e os valores de p são indicados nos gráficos.

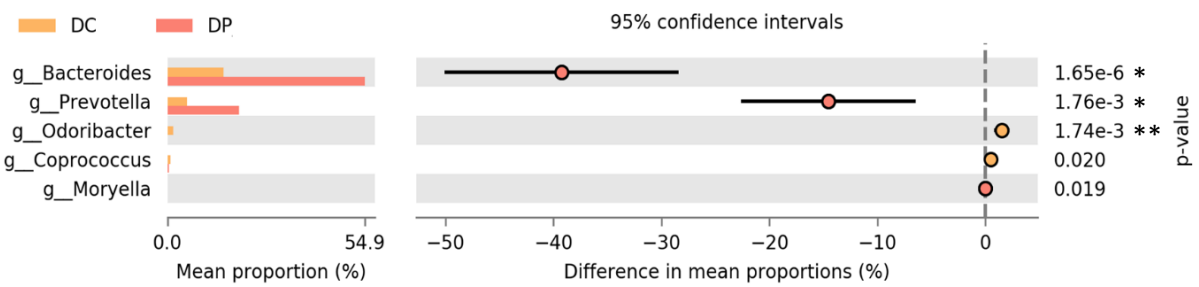
Analisando os grupos diabéticos, após duas semanas de administração das dietas experimentais (Figura 31), verificou-se que a pectina proporcionou um aumento relativo na abundância do filo *Bacteroidetes*, do gênero *Bacteroides* e *Prevotella* e redução na abundância relativa do filo *Firmicutes*.



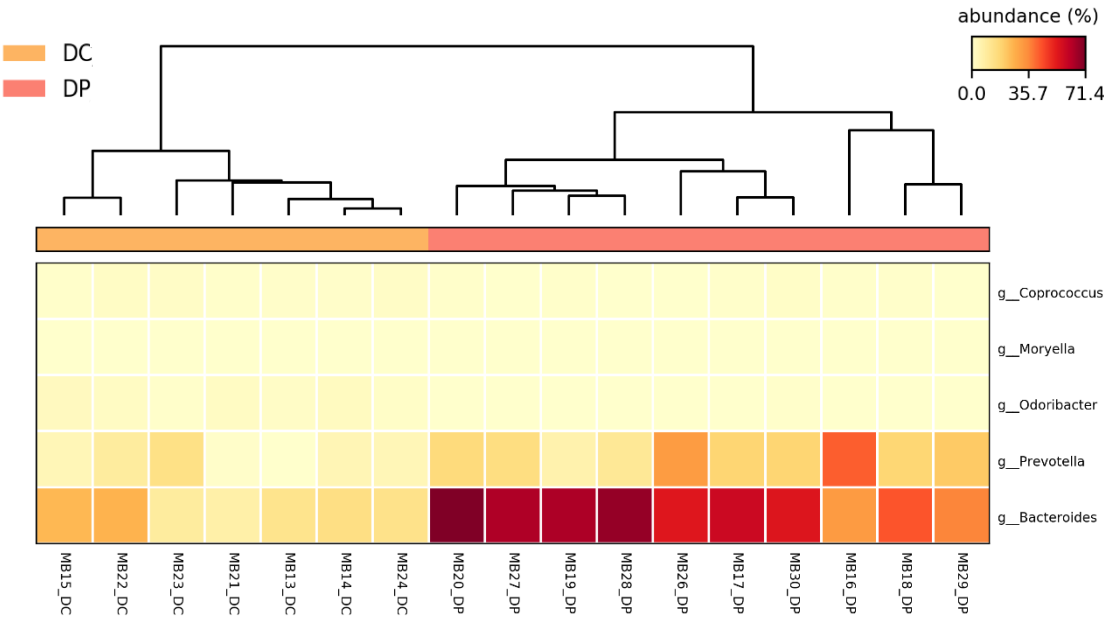
B



C



D



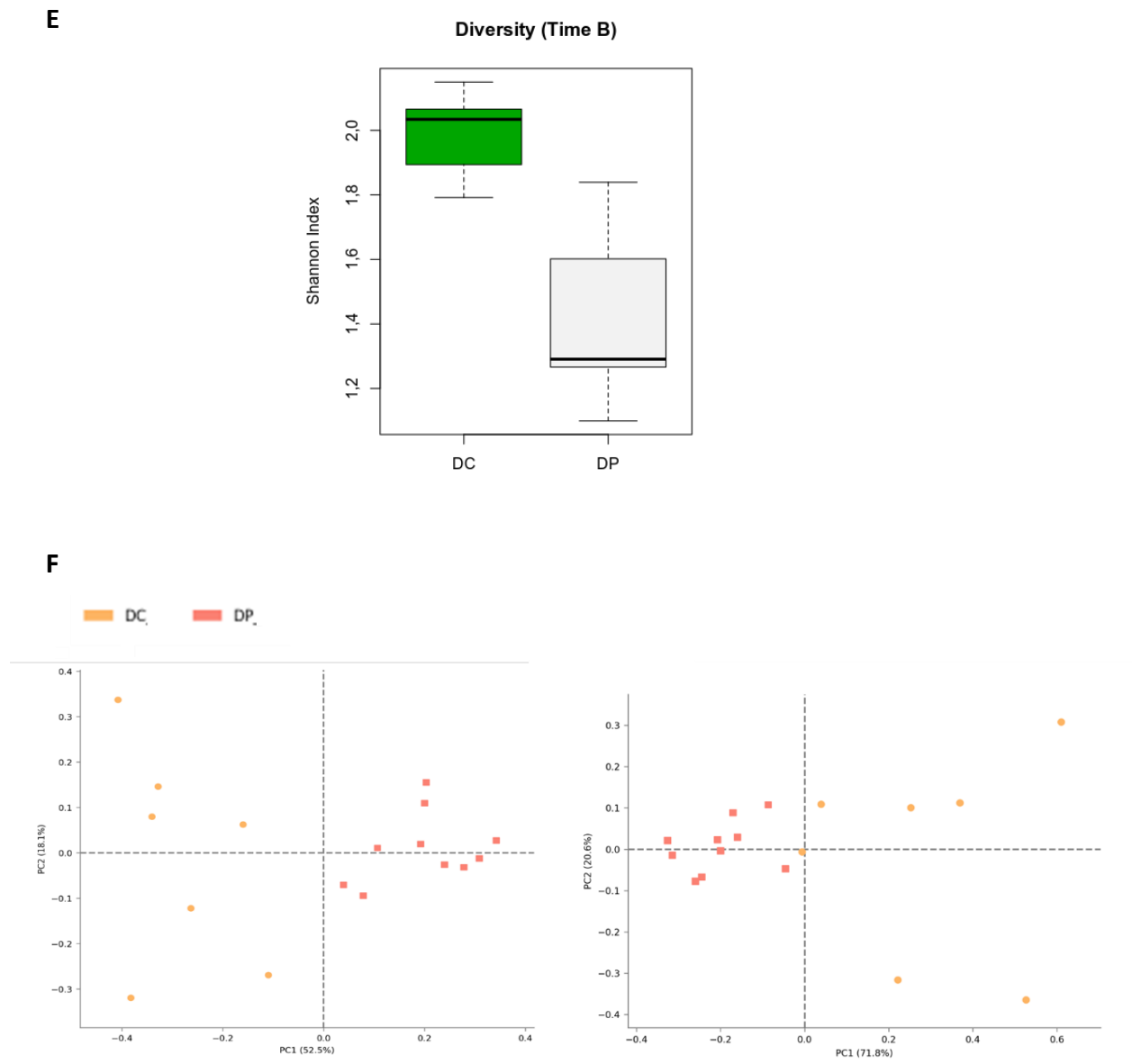
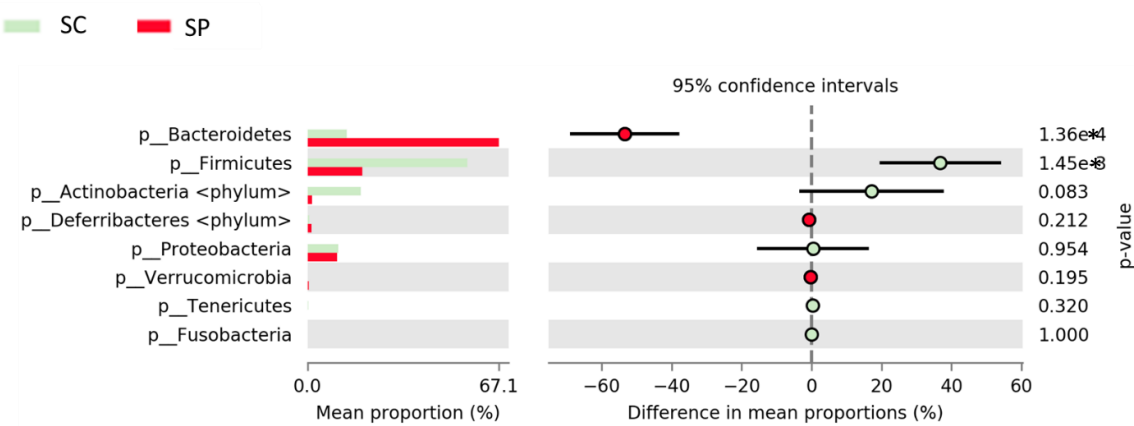


Figura 31: Análise das comunidades bacterianas das fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético controle (DC) *versus* diabético pectina (DP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e gênero (C); abundância relativa por filo (B) e gênero (D); diversidade (E) e dispersão (F). Fezes coletadas após duas semanas do início da administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$ e os valores de p são indicados nos gráficos.

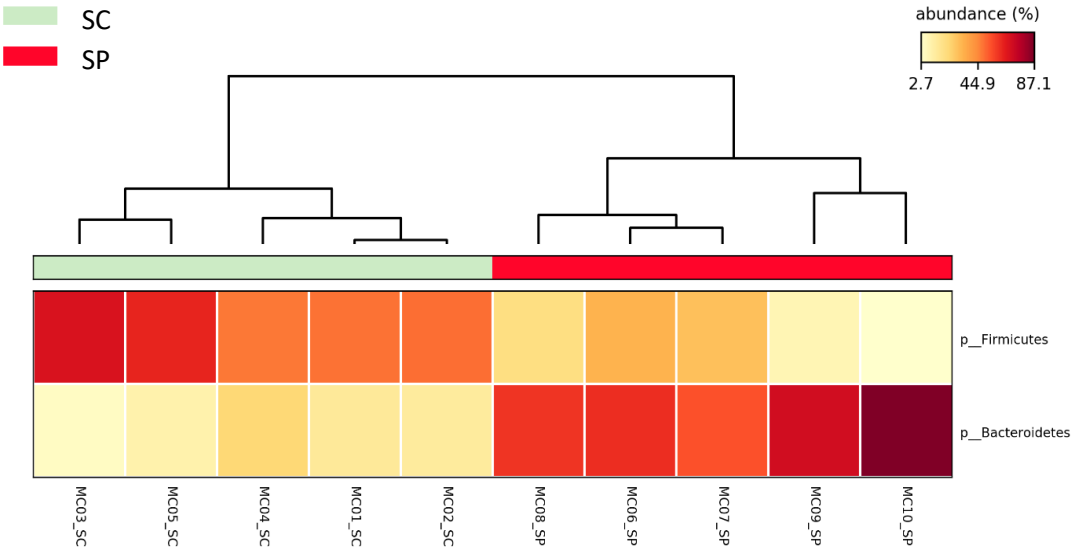
6.13.3 Análise de fezes após quatro semanas de dieta experimental

Analisando os grupos após quatro semanas de administração das dietas experimentais verificou-se que, no grupo saudável (Figura 32), a pectina proporcionou um aumento relativo na abundância de bactérias do filo *Bacteroidetes* e dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, também com redução na abundância relativa do filo *Firmicutes*.

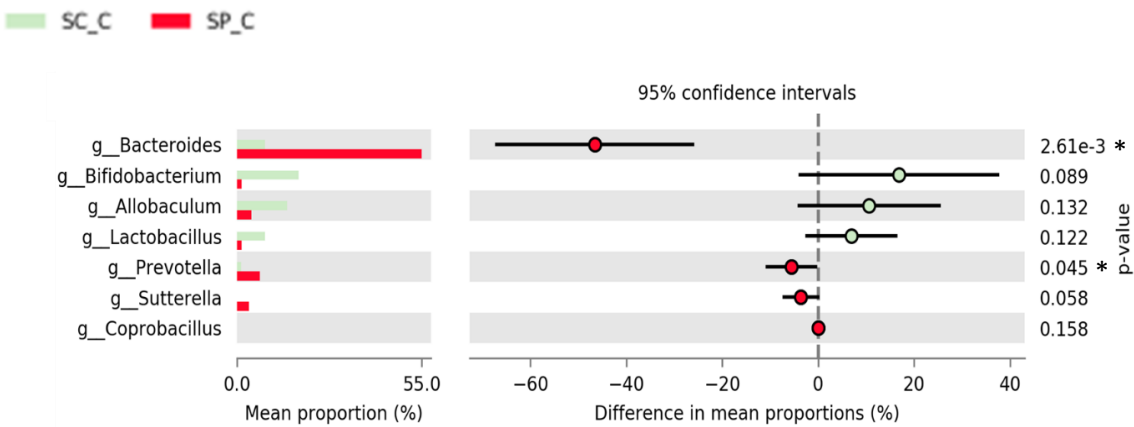
A



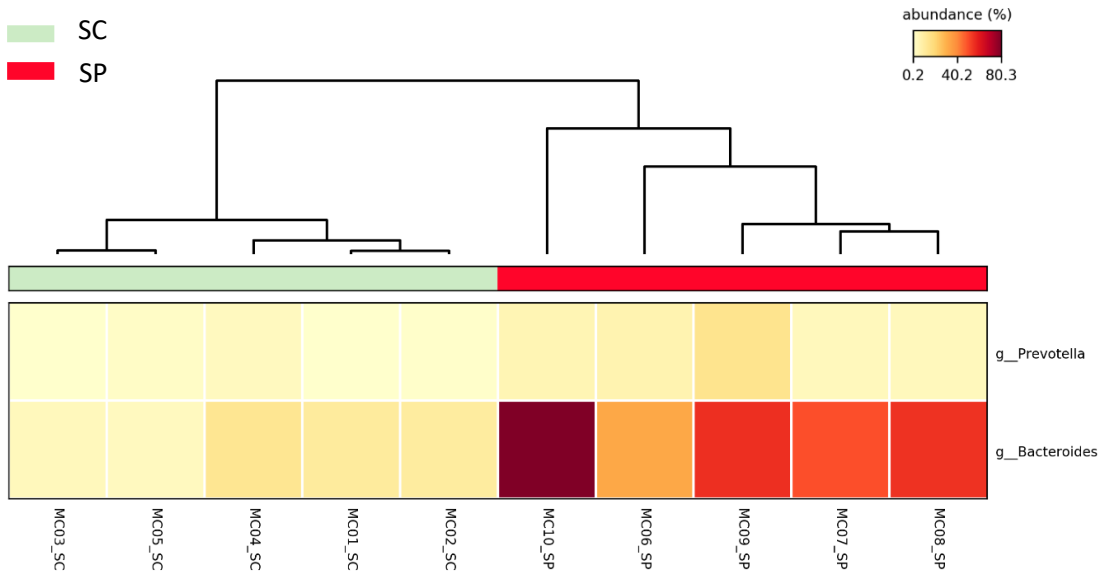
B



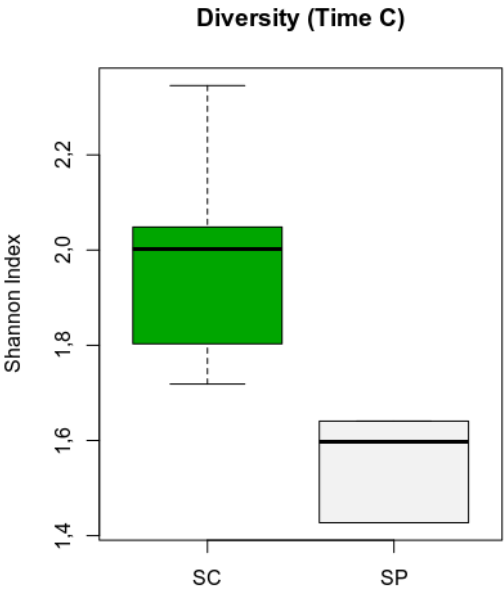
C



D



E



F

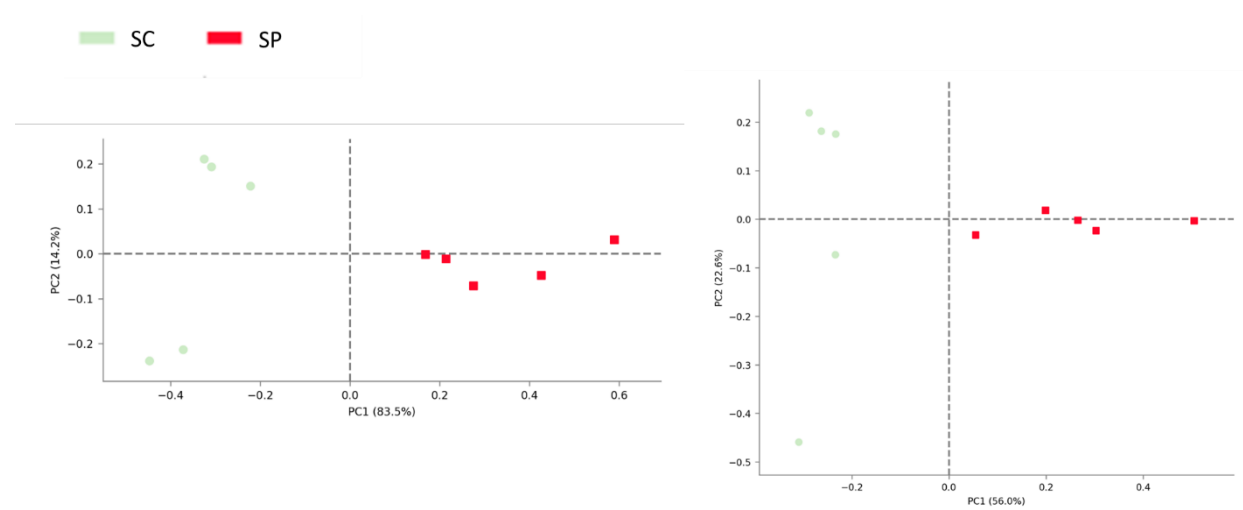
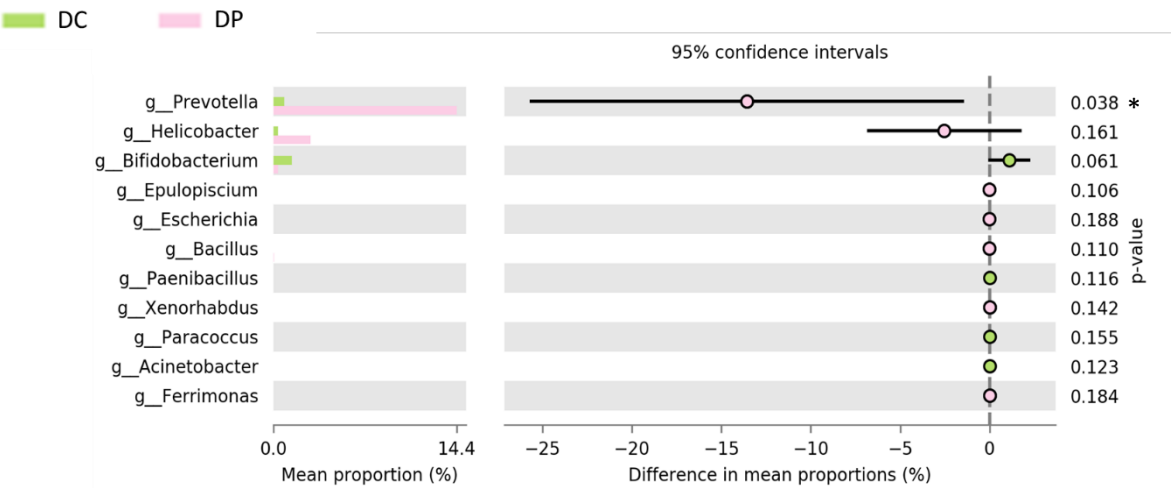


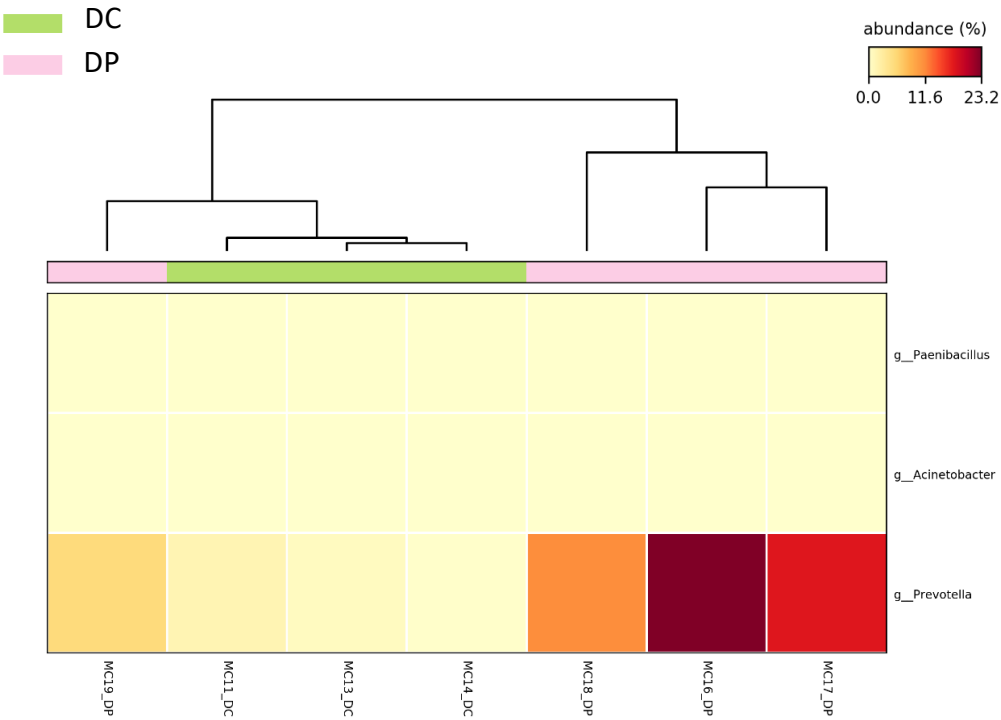
Figura 32: Análise das comunidades bacterianas das fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos saudável controle (SC) *versus* saudável pectina (SP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e gênero (C), abundância relativa por filo (B), abundância relativa por gênero (D), diversidade (E) e dispersão (F). Fezes coletadas após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$ e os valores de p são indicados nos gráficos.

Após quatro semanas de administração das dietas experimentais a pectina proporcionou ao grupo diabético um aumento relativo na abundância do gênero *Prevotella* e redução na abundância relativa do filo *Actinobactéria*.

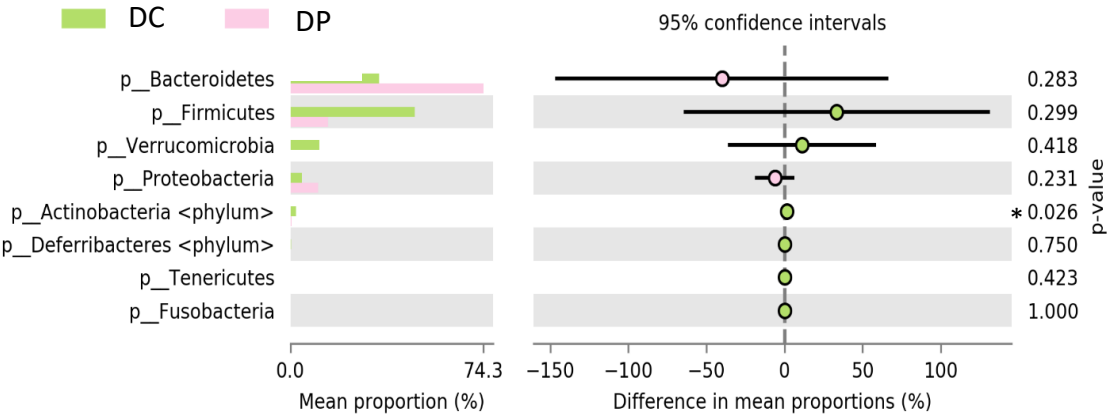
A



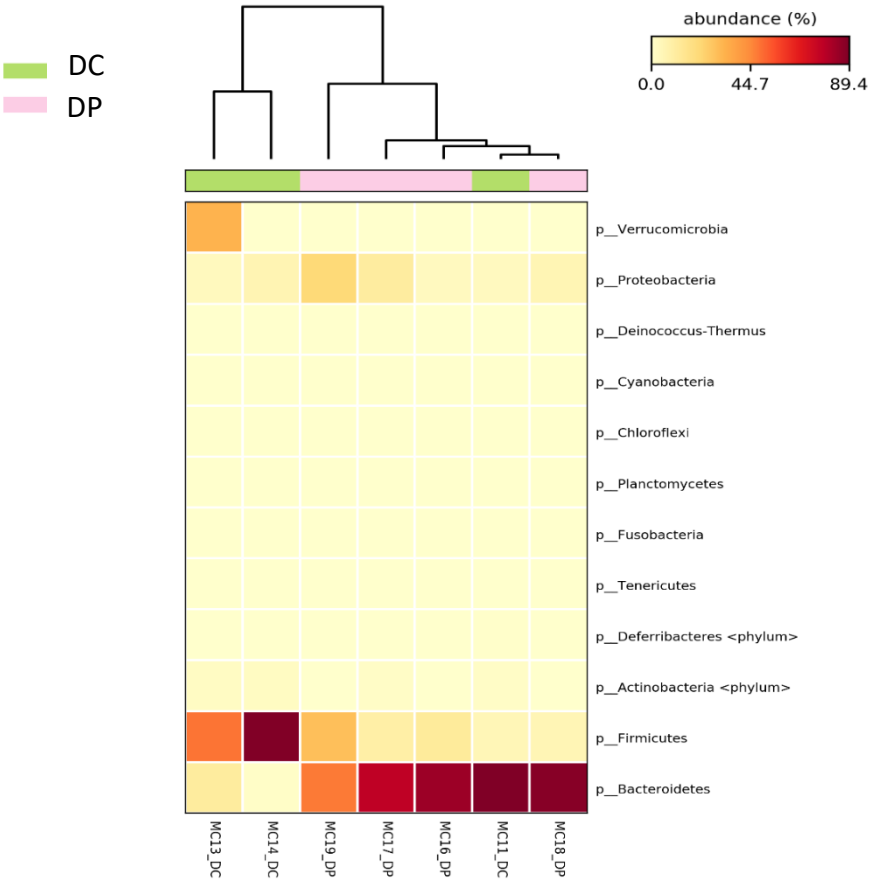
B



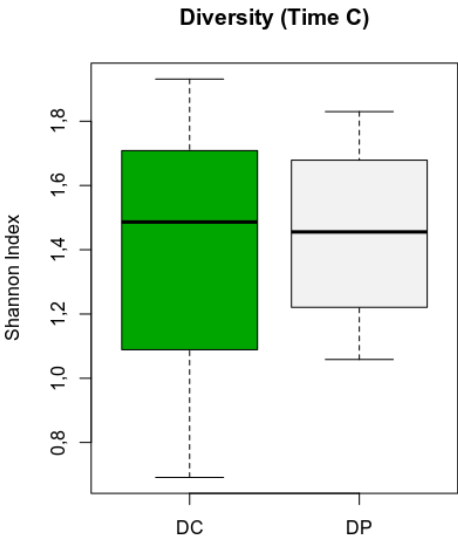
C



D



E



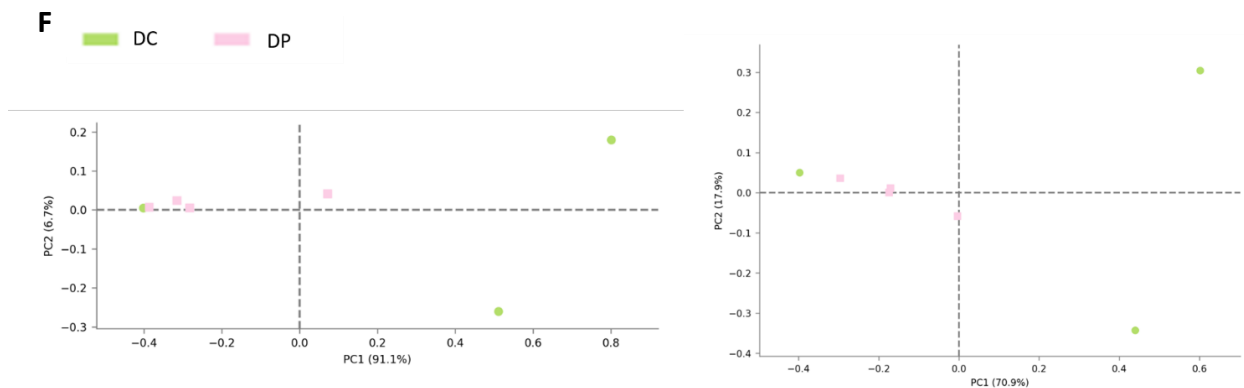


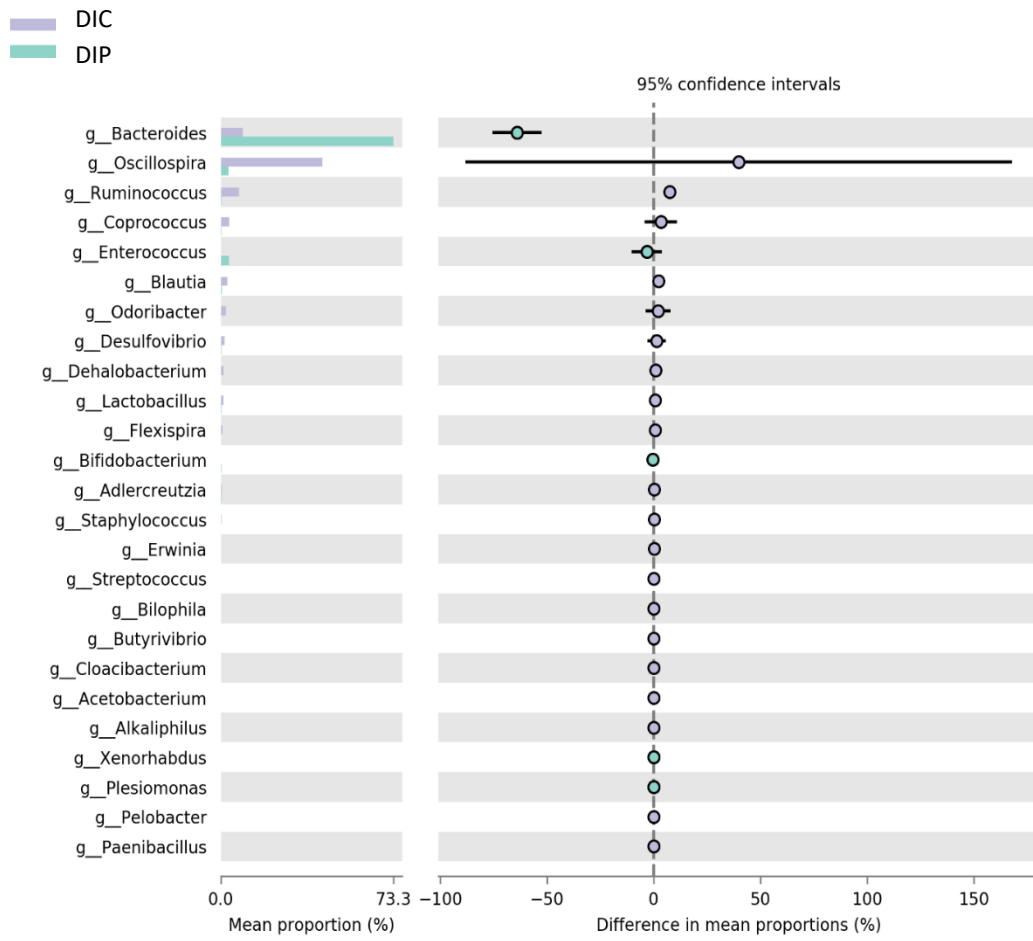
Figura 33: Análise das comunidades bacterianas das fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético controle (DC) *versus* diabético pectina (DP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e gênero (C), abundância relativa por filo (B), abundância relativa por gênero (D), diversidade (E) e dispersão (F). Fezes coletadas após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$ e os valores de p são indicados nos gráficos.

A análise do grupo diabético infectado, após quatro semanas de administração das dietas experimentais, não foi bem sucedida em função do pequeno número de amostras deste grupo, reflexo da alta mortalidade, verificada principalmente no grupo controle. Os gráficos estão representados na Figura 34, contudo, sem as informações estatísticas.

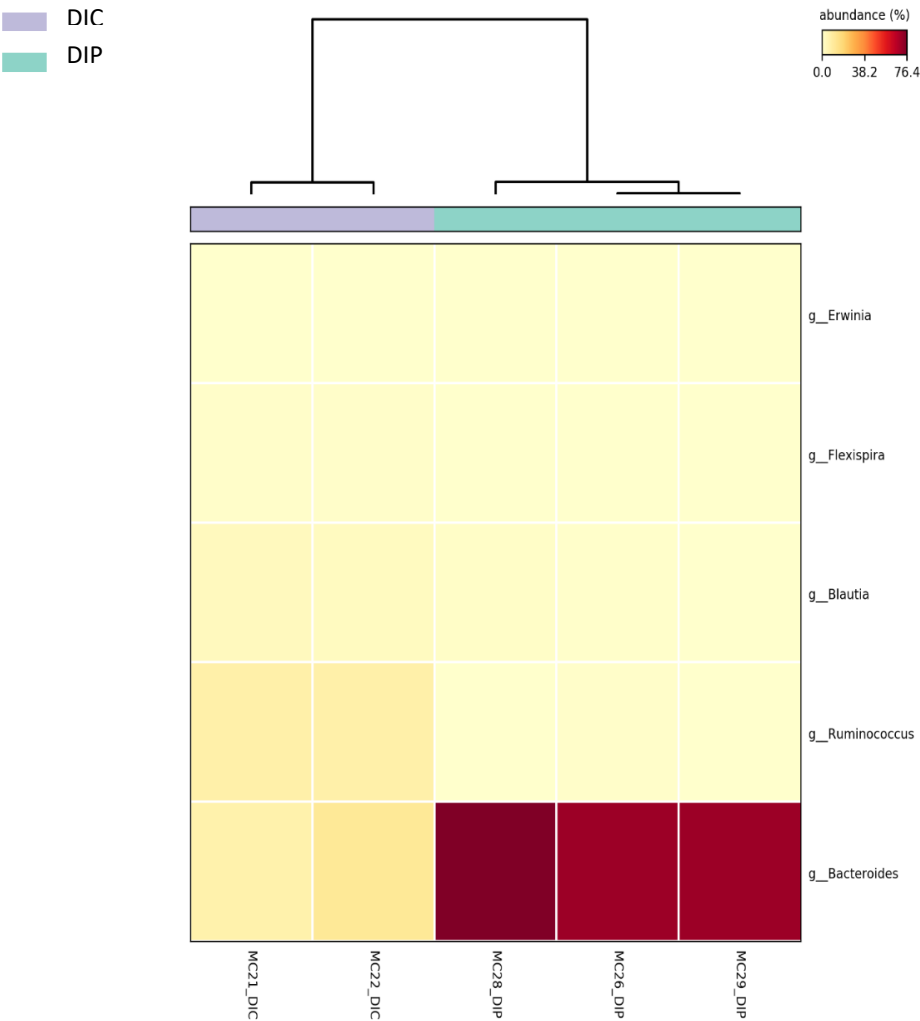
Dado o exposto, foram realizadas análises por pares, entre cada amostra do grupo diabético com infecção e dieta controle (DIC) *versus* cada amostra do grupo diabético com infecção e dieta rica em pectina (DIP) (Figura 35). Verificou-se que o grupo com dieta enriquecida com pectina apresentou, após quatro semanas de administração das dietas experimentais, maior abundância relativa de bactérias do filo *Bacteroidetes* e do gênero *Bacteroides*, enquanto o grupo controle apresentou maior abundância relativa de bactérias do filo *Firmicutes* e do gênero *Oscillospira*.

A

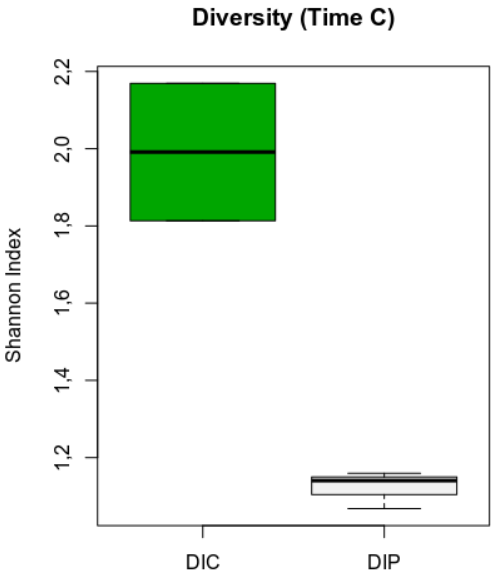
C



D



E



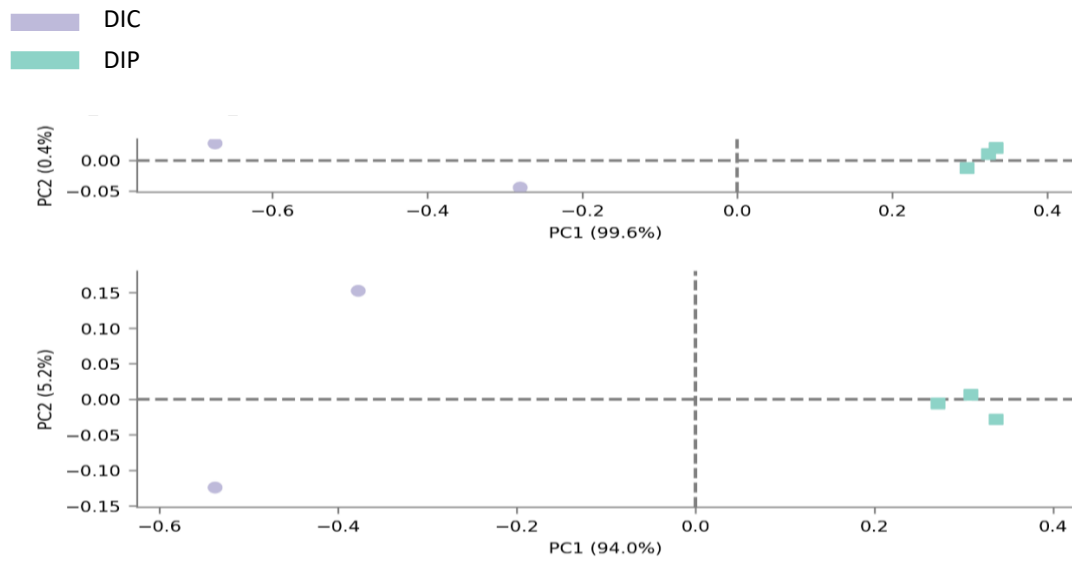
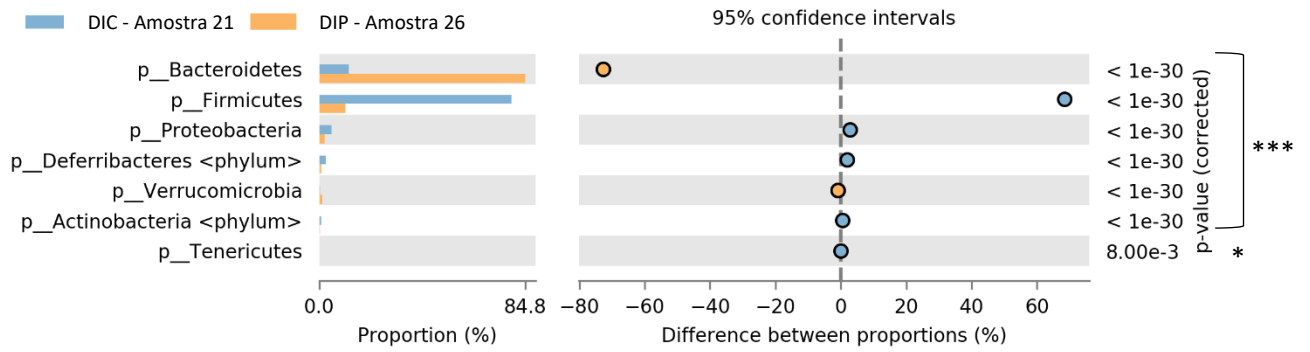
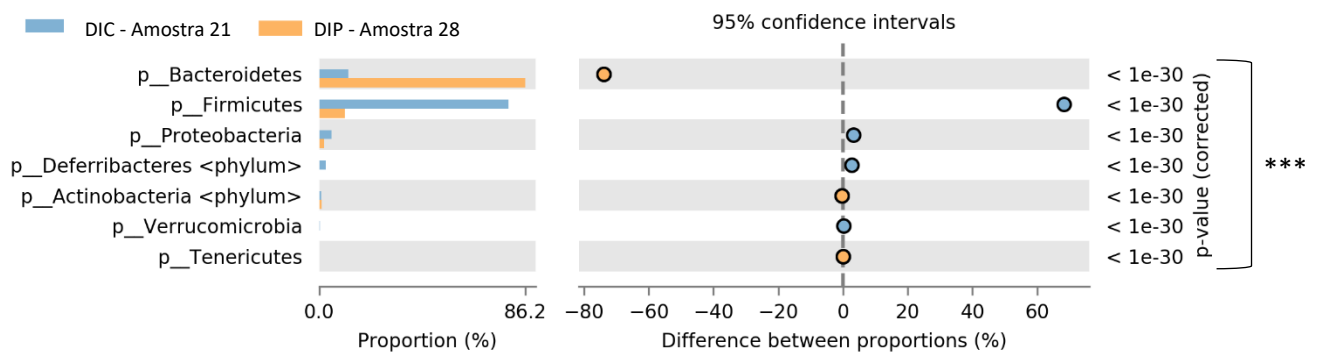
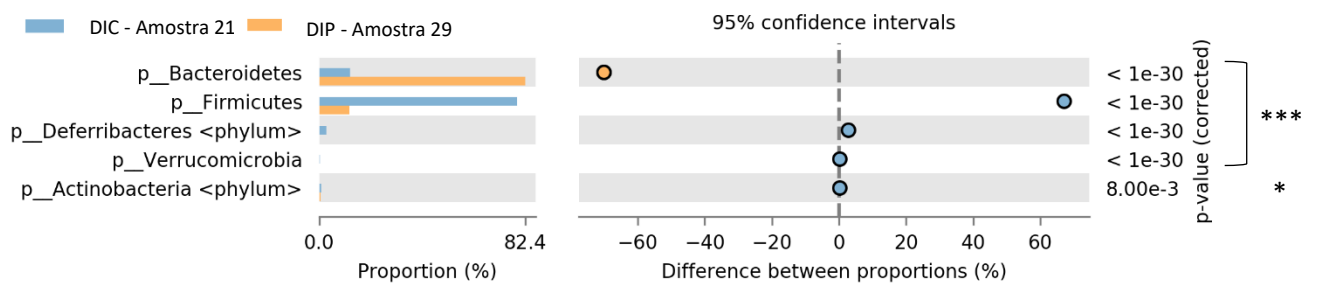
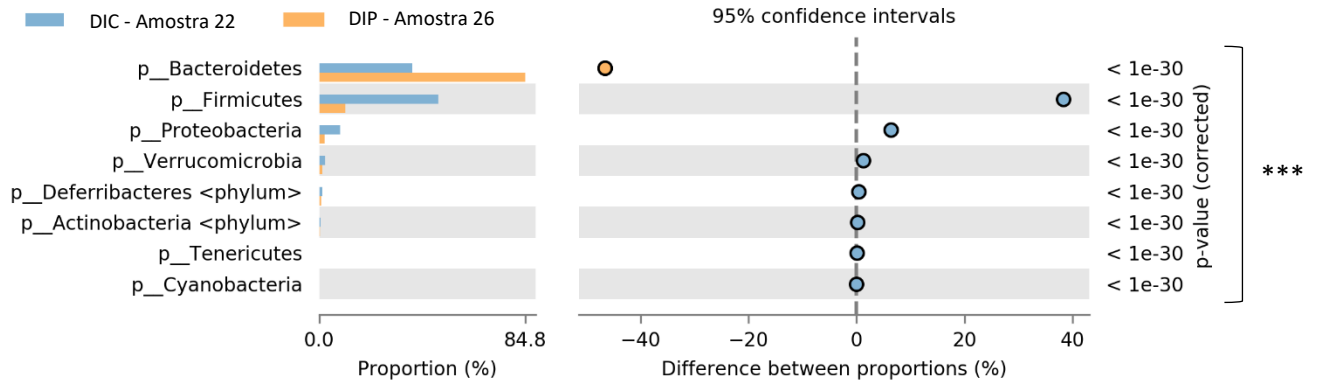
F

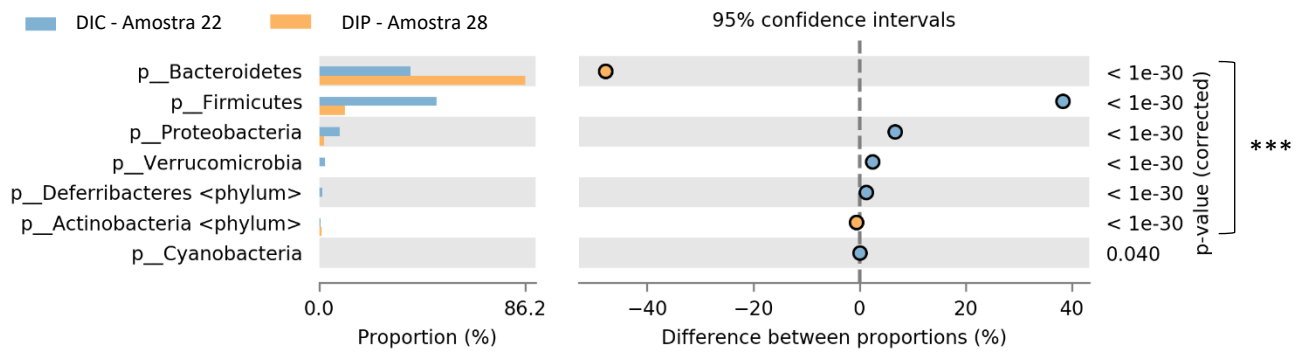
Figura 34: Análise qualitativa das comunidades bacterianas das fezes através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético infectado controle (DIC) *versus* diabético infetado tratado com pectina (DIP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e gênero (C), abundância relativa por filo (B), abundância relativa por gênero (D), diversidade (E) e dispersão (F). Fezes coletadas após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas não foram evidenciadas em função do baixo n amostral.

A**B****C**

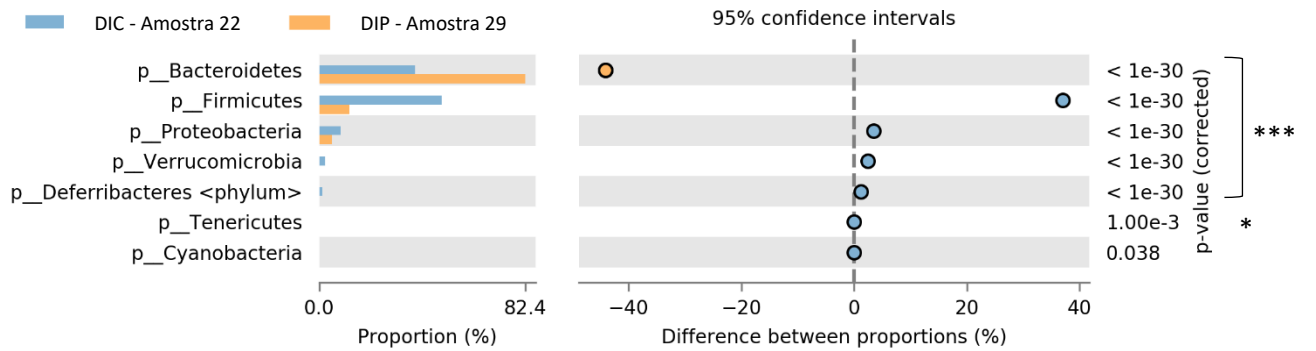
D

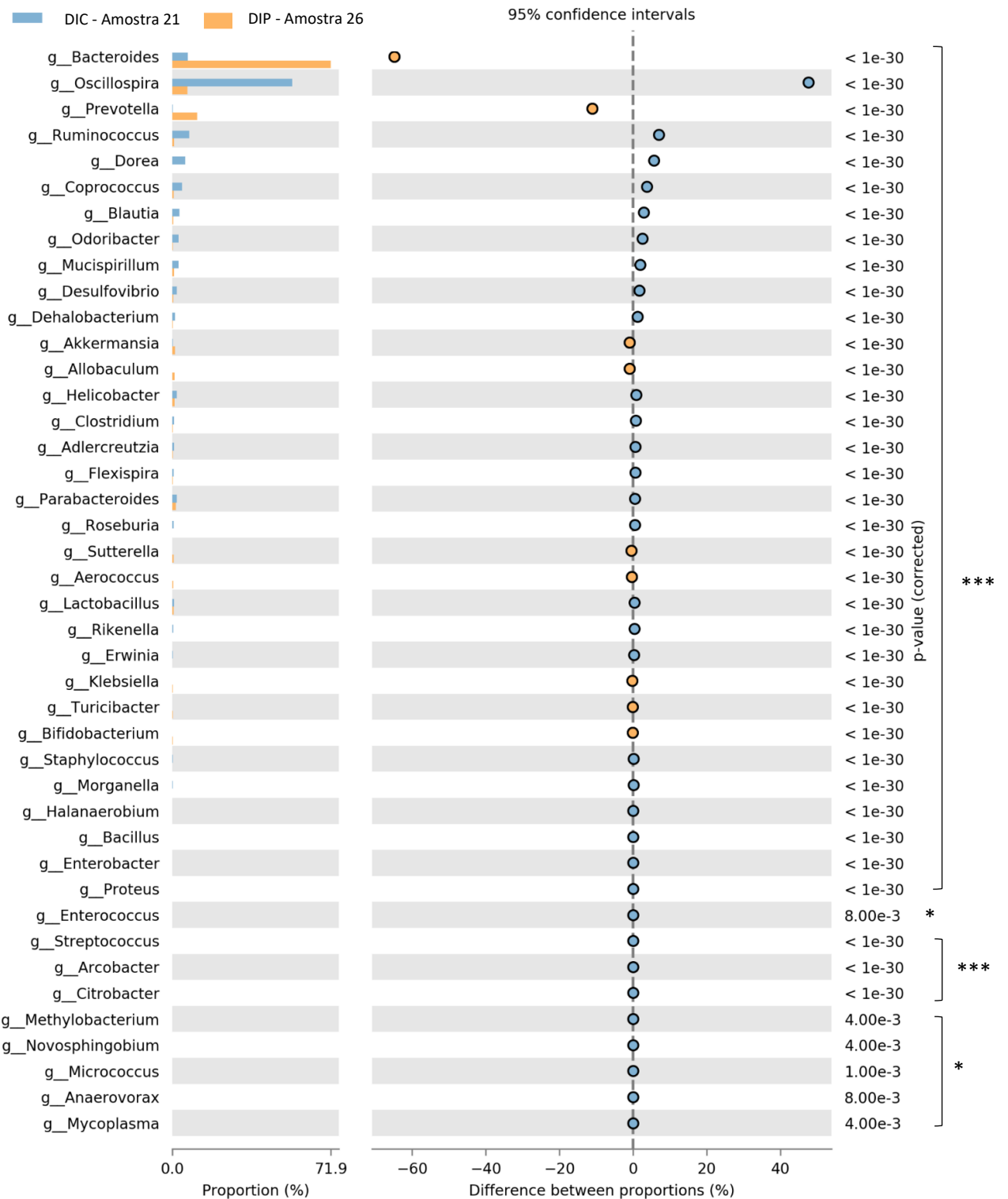


E

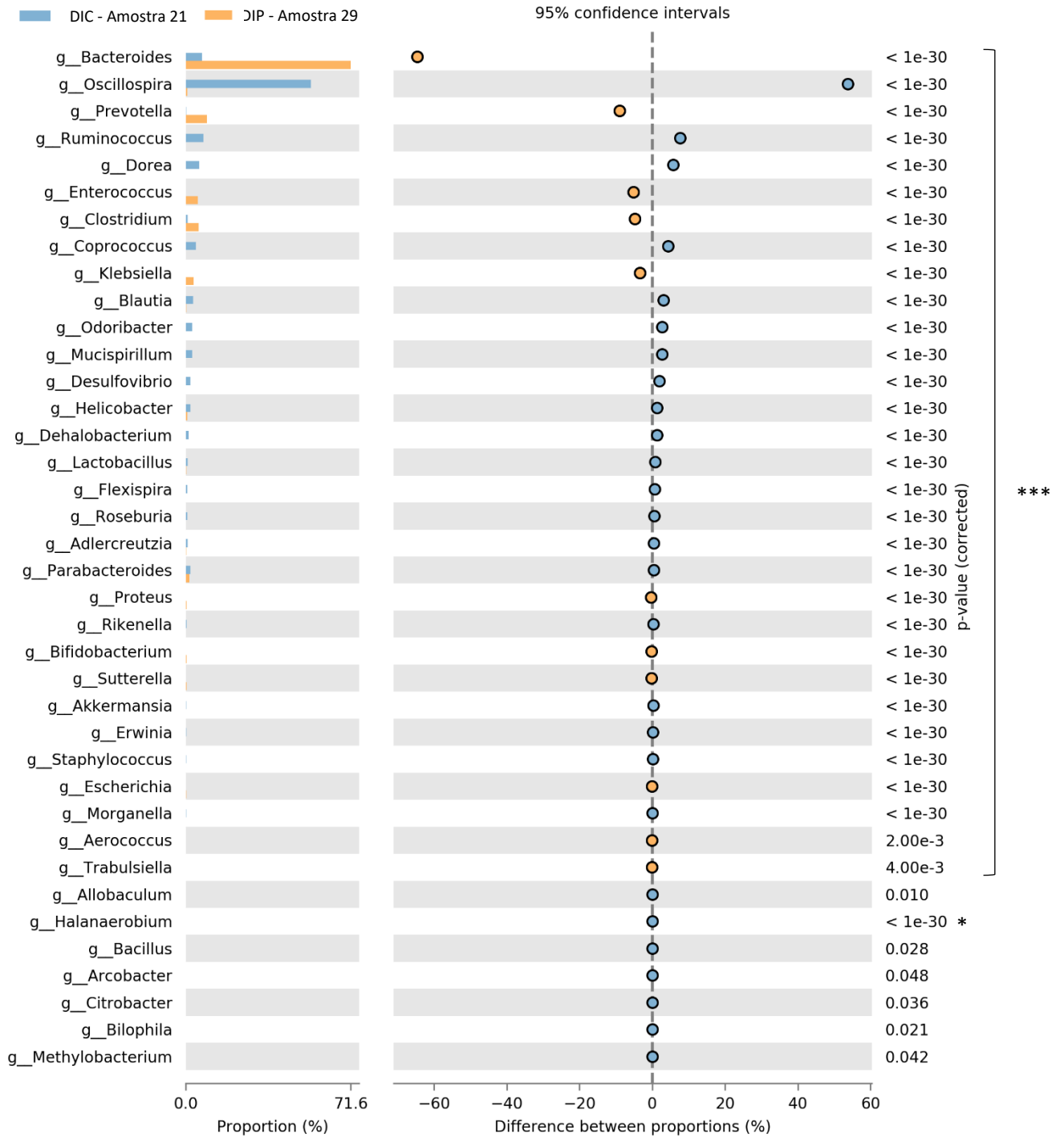


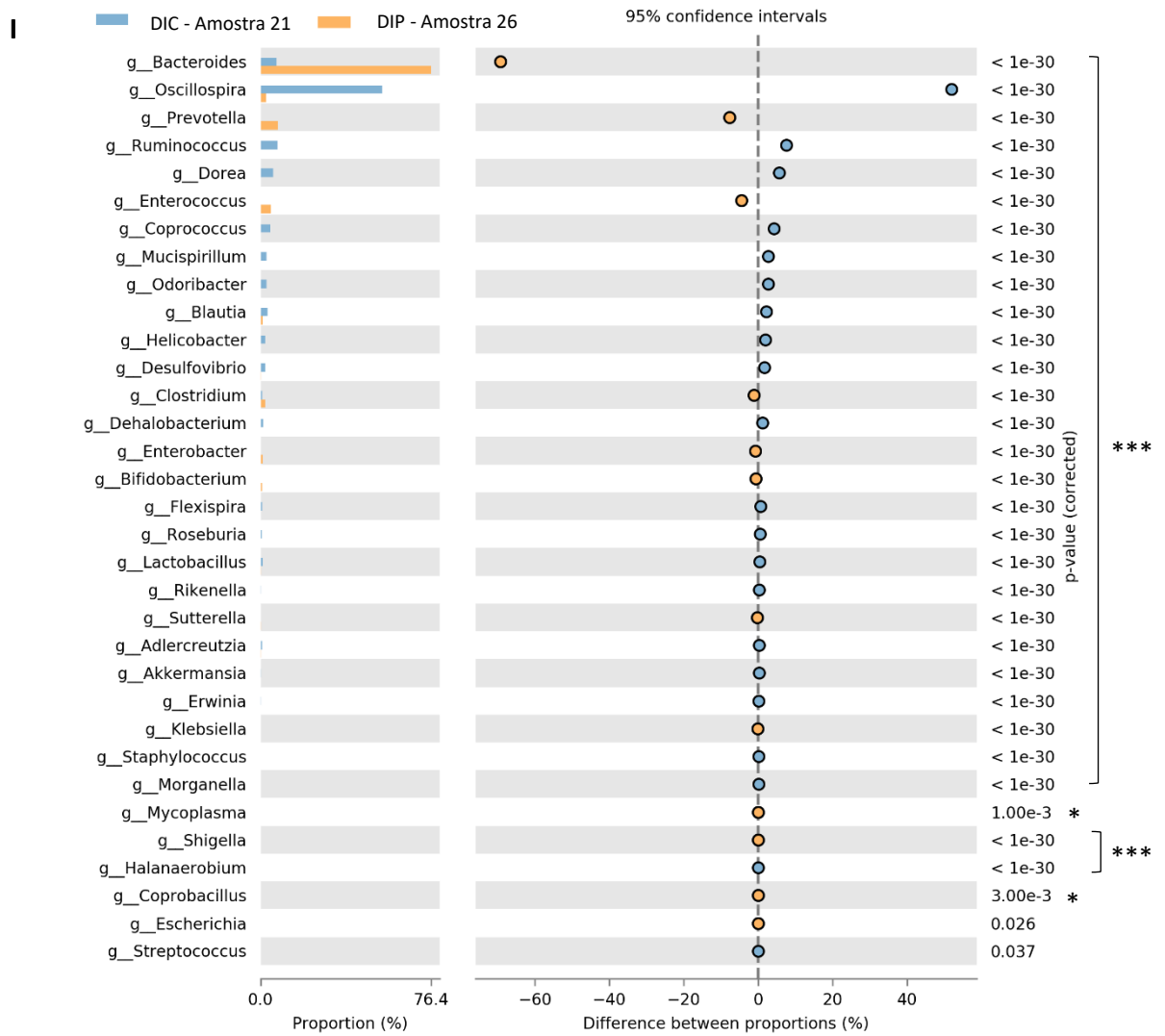
F

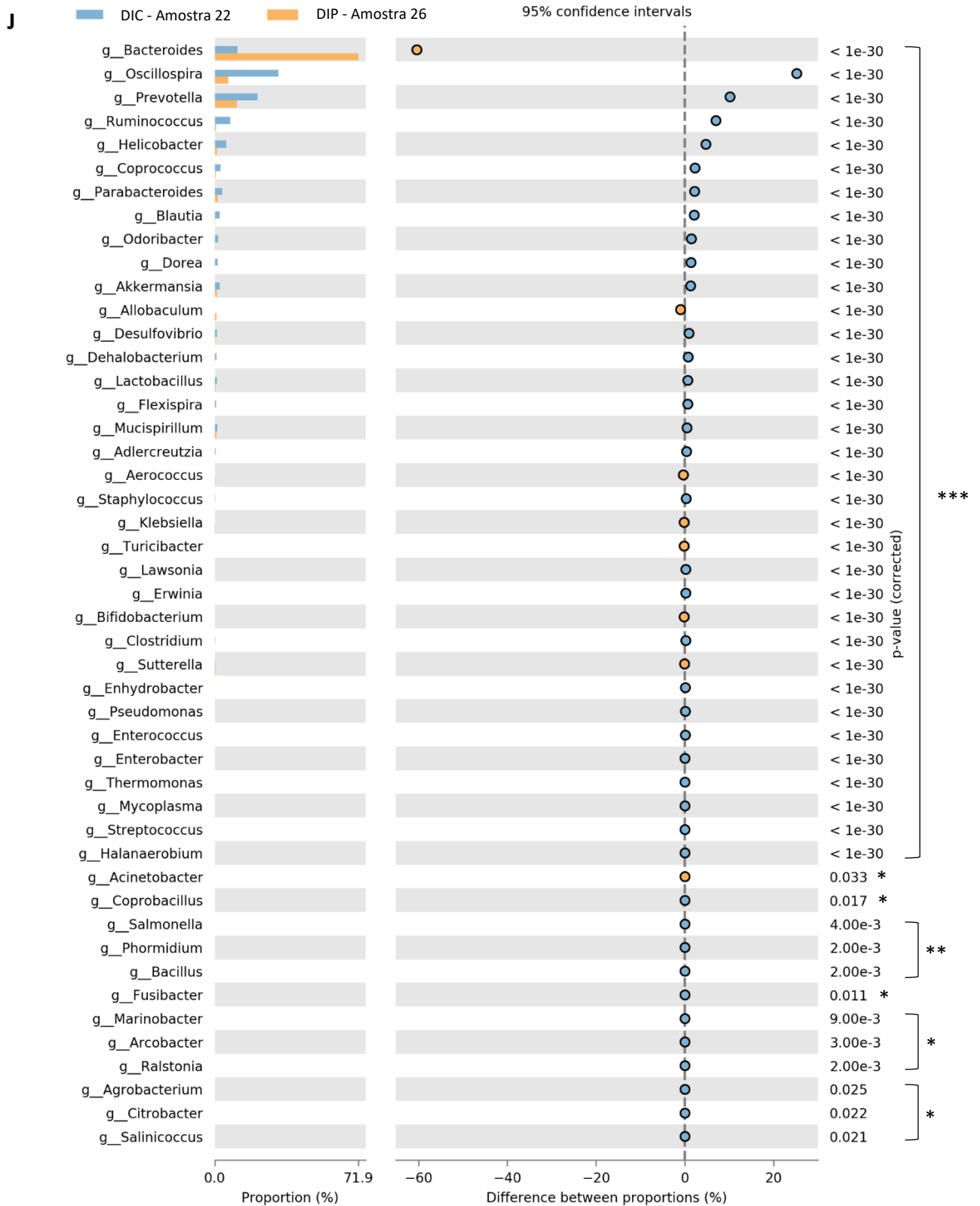


G

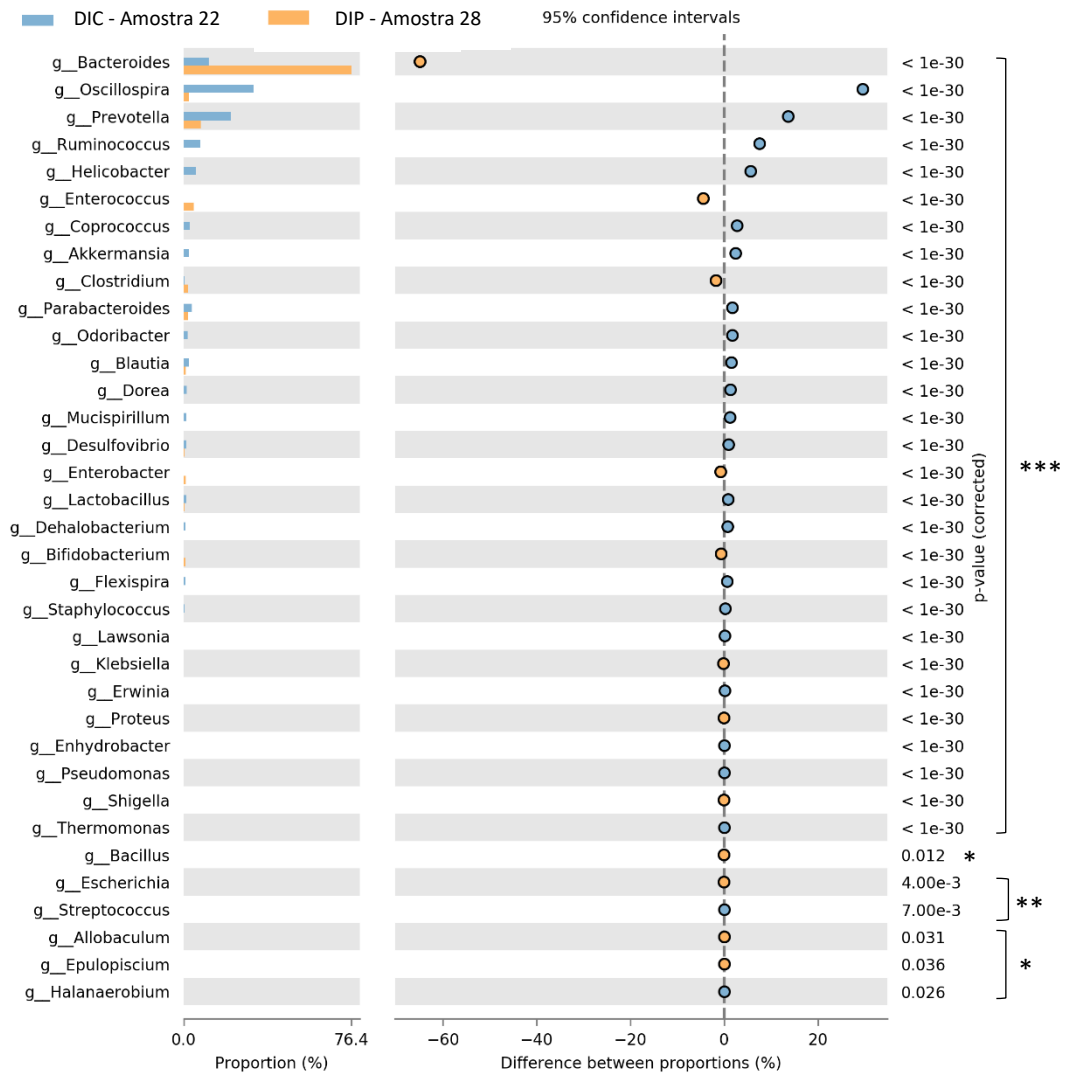
H







K



L

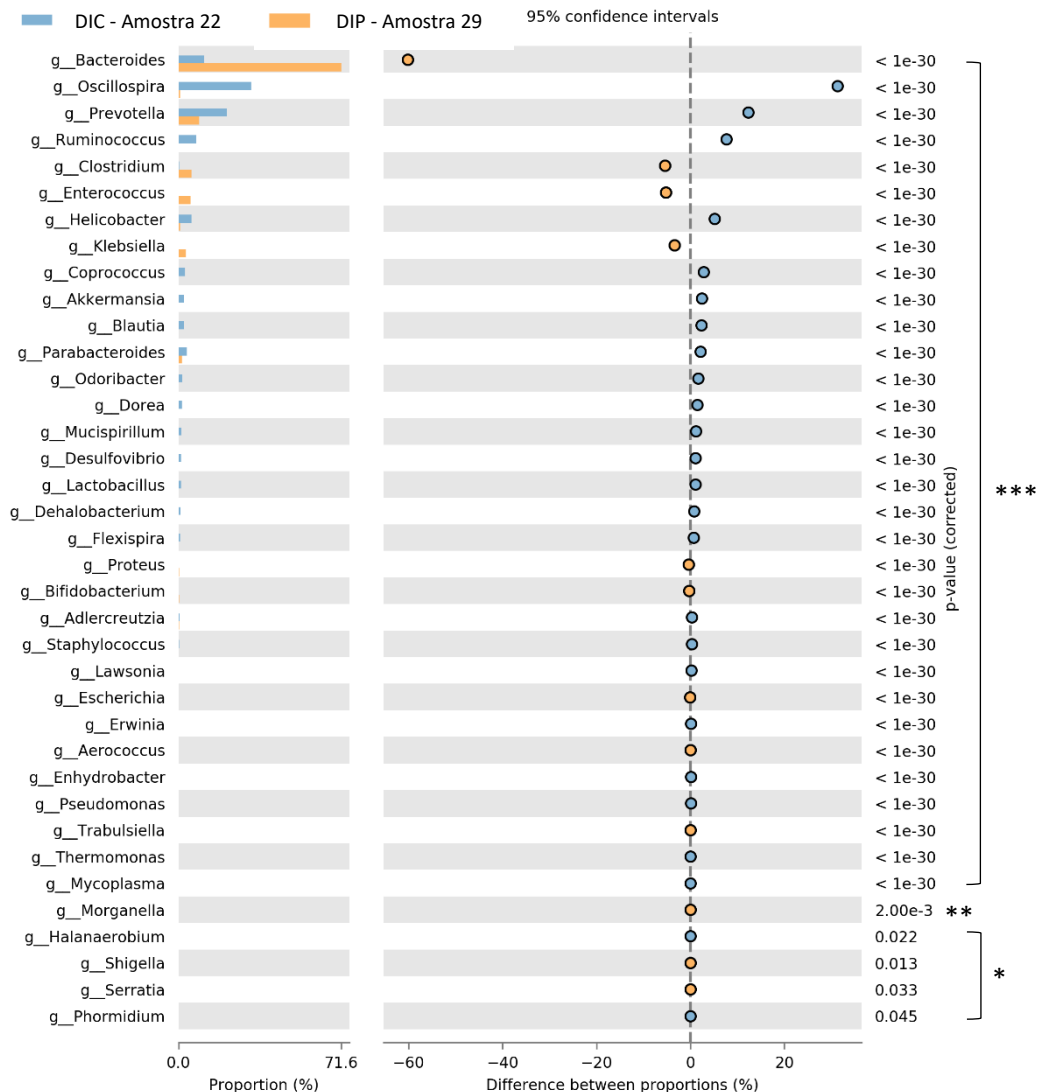


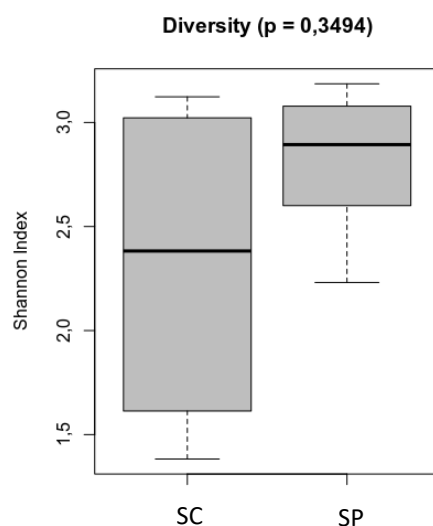
Figura 35: Metagenômica de fezes, realizada através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise de amostras aos pares a nível de filo: amostra 21 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 26 do grupo diabético infectado pectina (DIP) (A); amostra 21 do grupo DIC *versus* amostra 28 do grupo DIP (B); amostra 21 do grupo DIC *versus* amostra 29 do grupo DIP (C); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 26 do grupo DIP (D); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 28 do grupo DIP (F); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 29 do grupo DIP (F). Análise de amostras aos pares a nível de gênero: amostra 21 do grupo DIC *versus* amostra 26 do grupo DIP (G); amostra 21 do grupo DIC *versus* amostra 29 do grupo DIP (H); amostra 21 do grupo DIC *versus* amostra 26 do grupo DIP (I); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 26 do grupo DIP (J); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 28 do grupo DIP (K); amostra 22 do grupo DIC *versus* amostra 29 do grupo DIP (L). Fezes coletadas após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$, os valores de p são indicados nos gráficos.

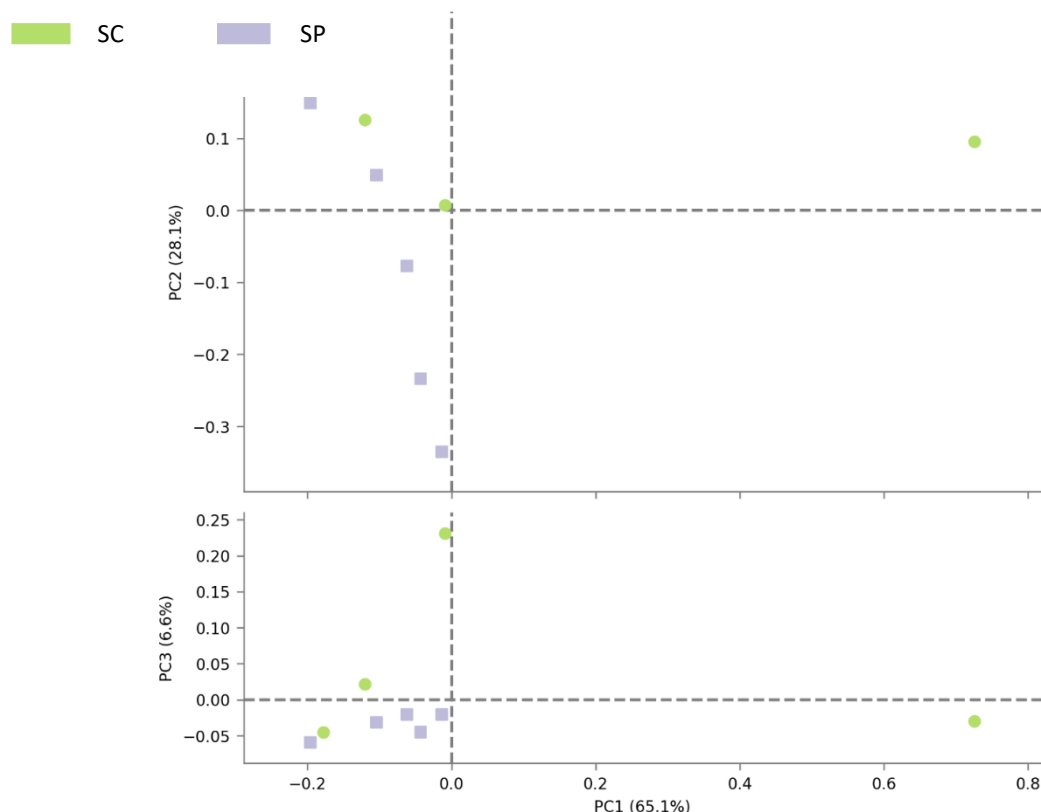
6.14. Metagenômica de pele

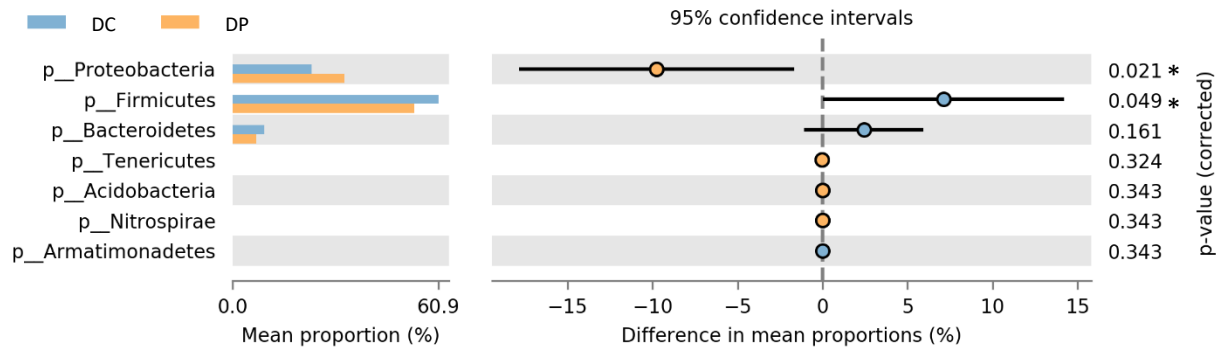
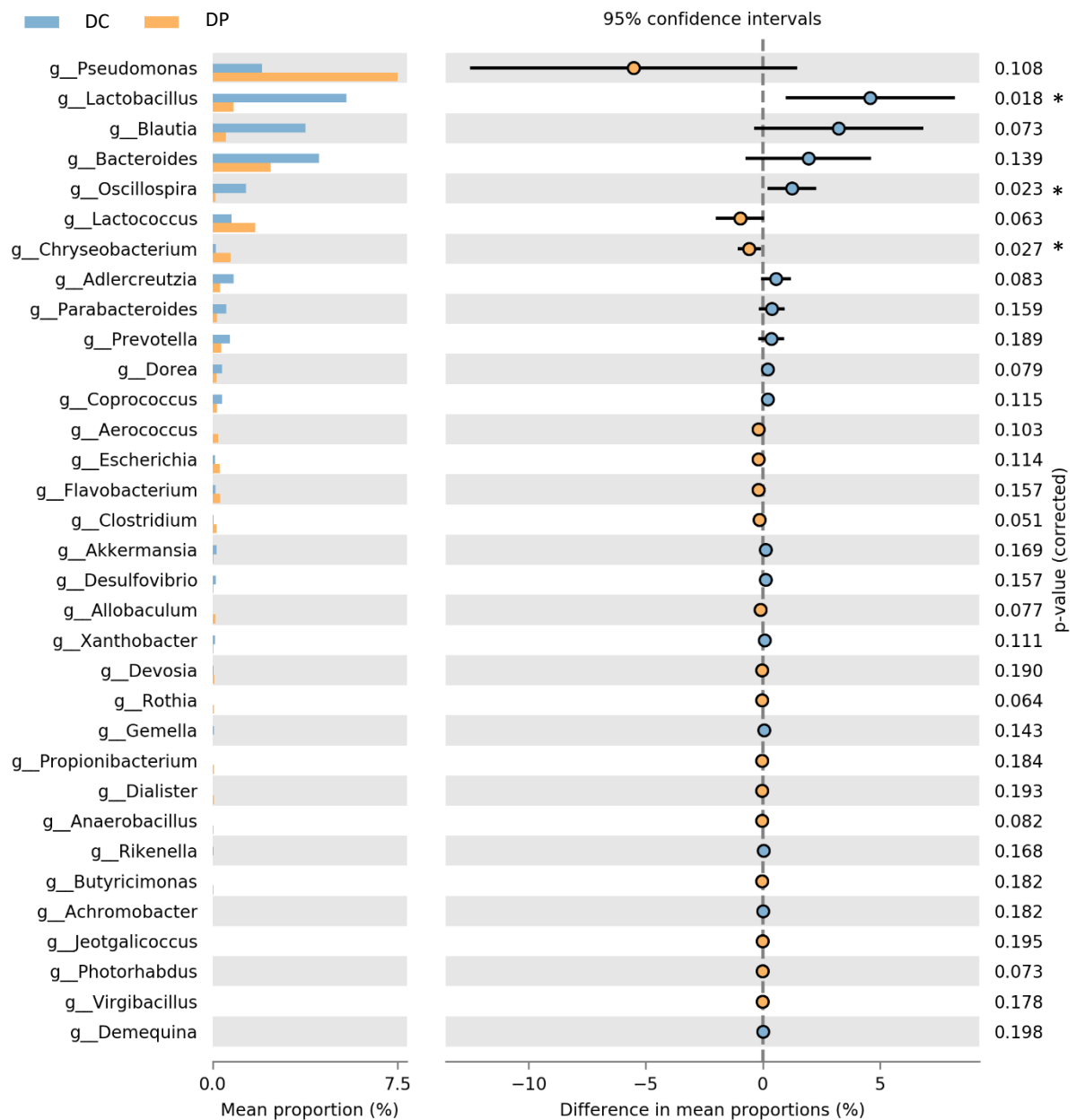
6.14.1. Análise da pele basal após duas semanas de dieta experimental

A análise metagenômica da pele basal dos grupos saudáveis, coletada no momento da confecção das feridas, não gerou resultados, por escassez de material genético nas amostras. A análise da diversidade (Figura 36A) evidenciou que não houve diferença significativa entre a diversidade do grupo saudável controle e o grupo saudável tratado com pectina. A análise de dispersão das amostras (Figura 36B) confirma a similaridade das amostras dos grupos.

A



B

A**B**

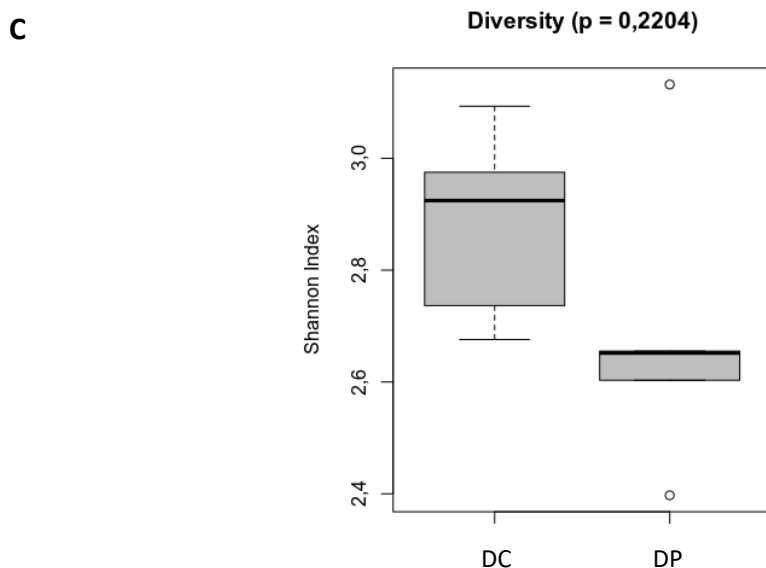
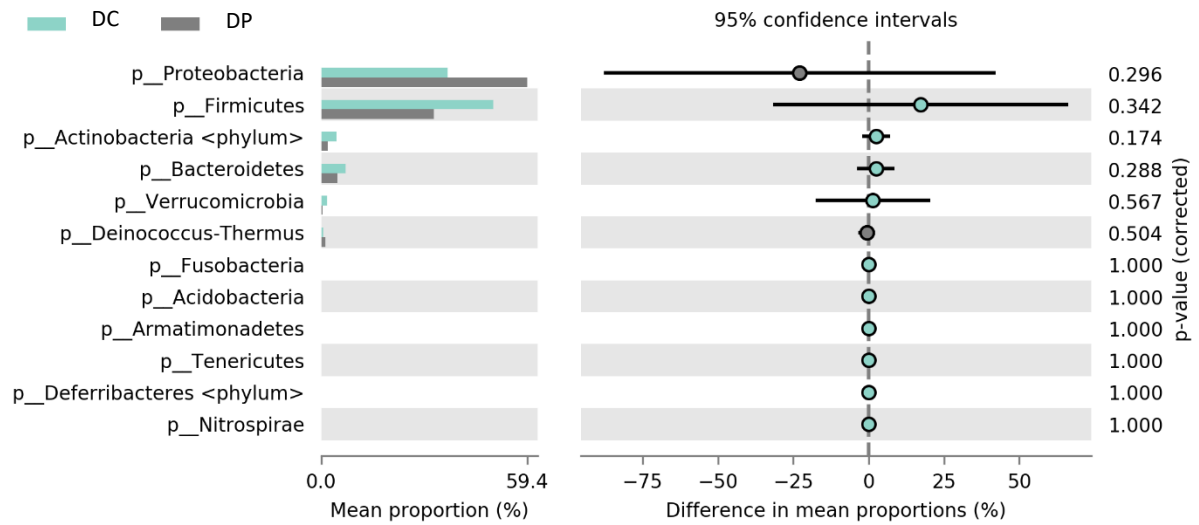
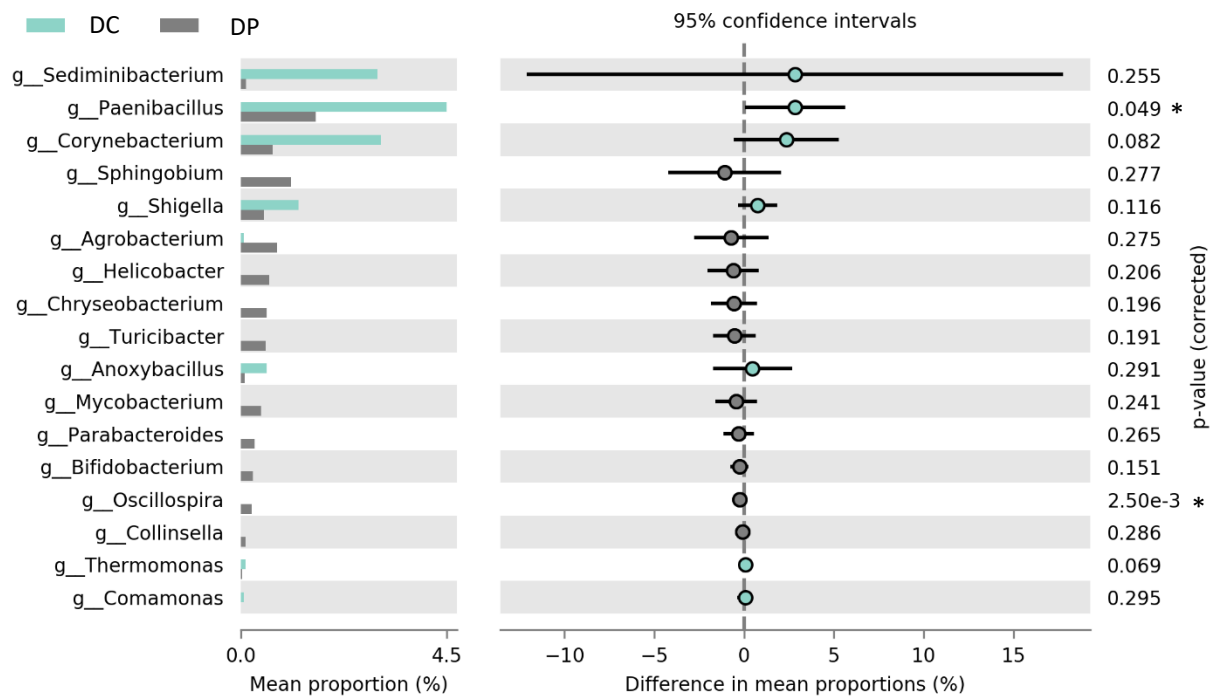


Figura 37: Comunidades bacterianas da pele basal. Análise realizada através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético controle (DC) *versus* diabético tratado com pectina (DP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A), gênero (B) e diversidade (C). Peles coletadas no momento de confecção das feridas e após duas semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$, os valores de p são indicados nos gráficos.

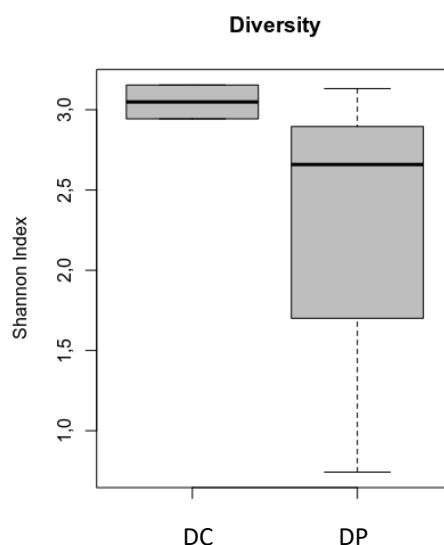
6.14.2 Análise das feridas - quatro semanas de dieta experimental

Para esta análise, as feridas foram coletadas após 14 dias da confecção e quatro semanas recebendo a dieta experimental. Por escassez de material genético, não foi possível realizar a análise metagenômica dos grupos saudáveis.

Avaliando os grupos diabéticos, observou-se que a pectina proporcionou um aumento na abundância relativa do gênero *Oscillospira*. As bactérias detectadas nestes grupos com maior abundância relativa (sem diferença estatística) foram as dos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes* e bactérias dos gêneros *Sediminibacterium*, *Paeniactillus* e *Corynebacterium* (Figura 38).

A**B**

C



D

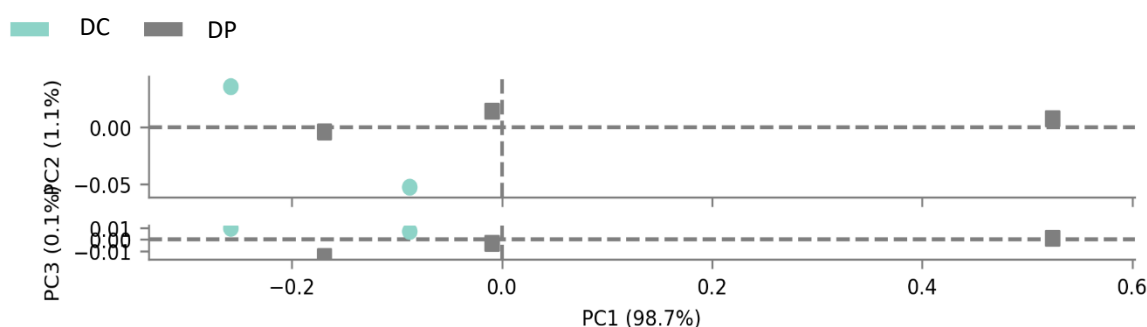
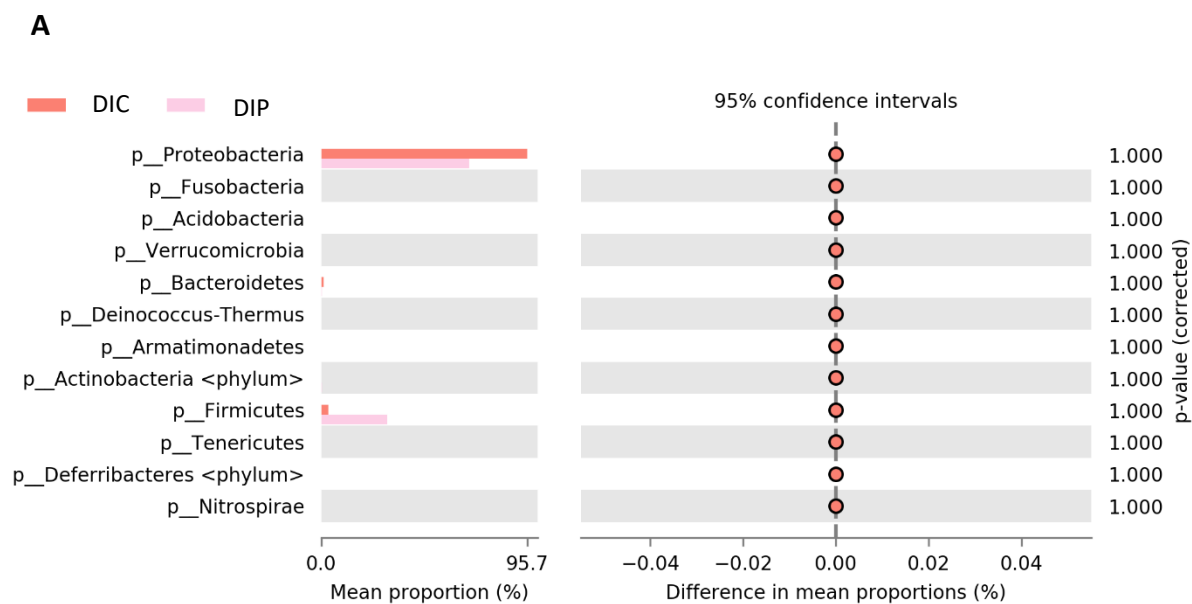


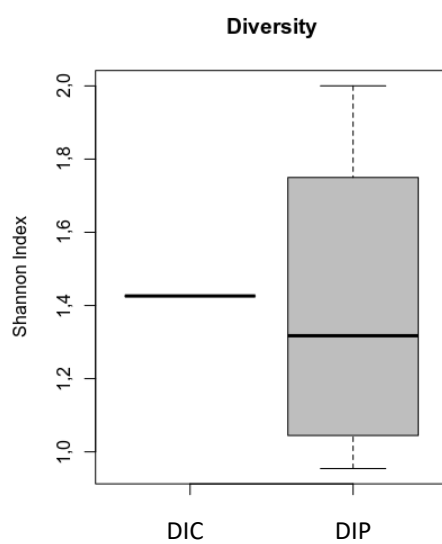
Figura 38: Comunidades bacterianas das feridas. Análise realizada através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético controle (DC) versus diabético tratado com pectina (DP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A), gênero (B), diversidade (C) e dispersão (D). Feridas coletas no 14º dia após a confecção das mesmas e após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$, os valores de p são indicados nos gráficos.

Quanto aos grupos diabéticos infectados, verificou-se que não houve diferença significativa entre a análise metagenômica do grupo diabético infectado controle e do grupo diabético infectado tratado com pectina (Figura 39). Contudo, devido à escassez de amostras, em função da alta mortalidade destes grupos, foi realizada a análise por pares (Figura 40), na qual verificou-se que o grupo tratado com pectina, em todas as análises, apresentou aumento na abundância relativa de bactérias do filo *Firmicutes* e dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Já no grupo controle, observou-se redução na abundância relativa

de bactérias dos filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e dos gêneros *Erwinia* e *Enterobacter* (Figura 40).



B



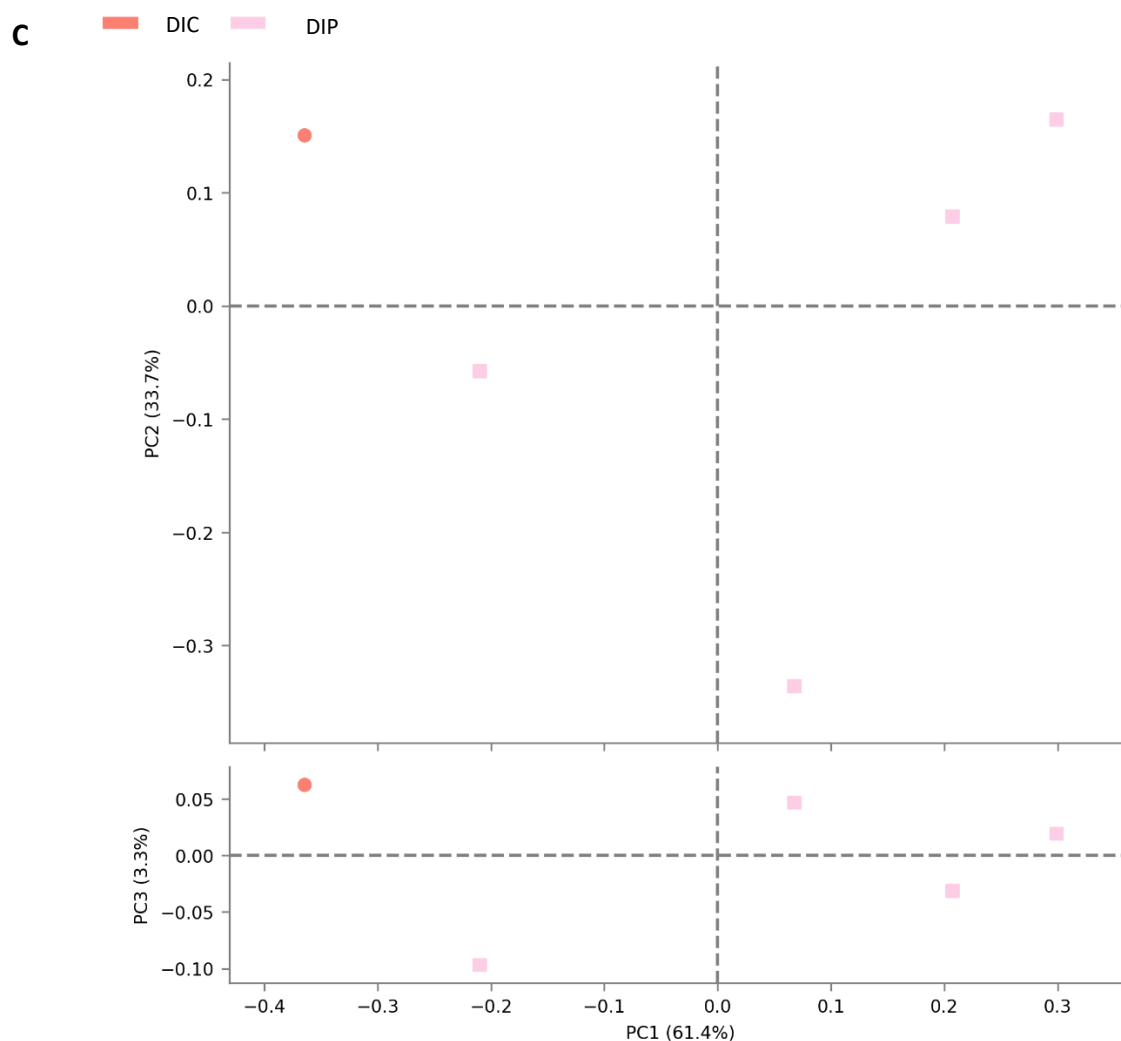
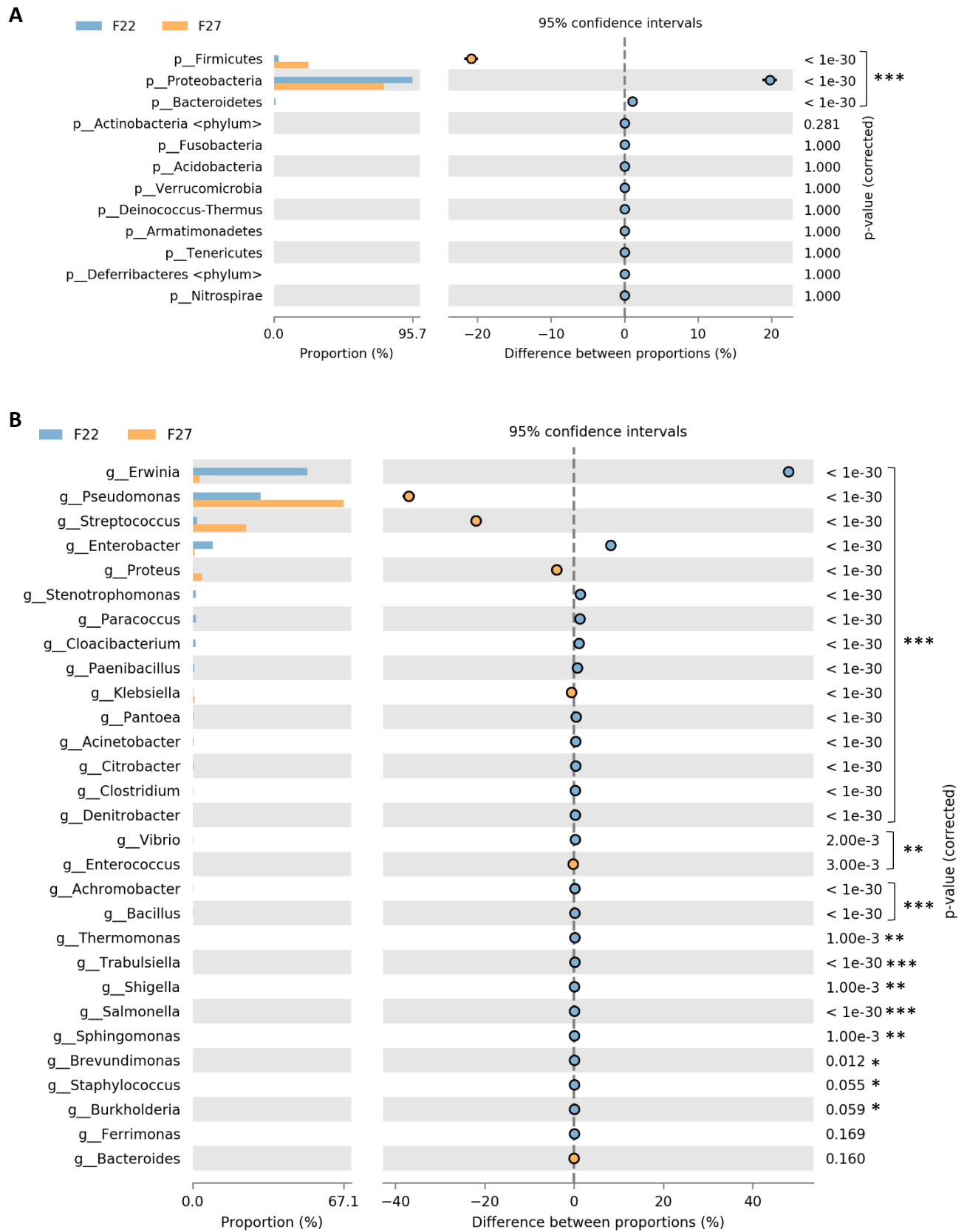
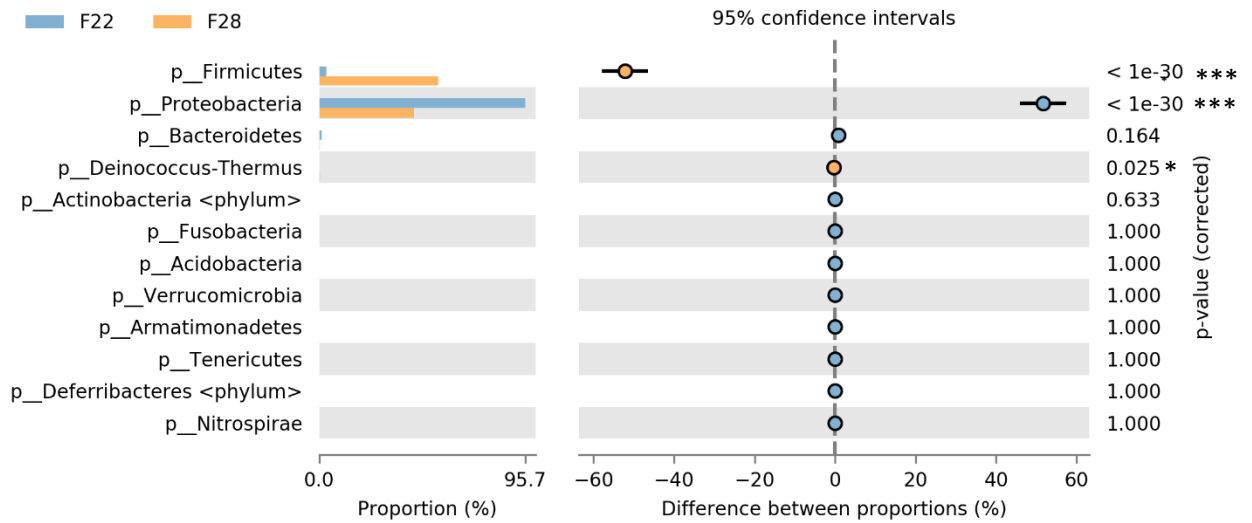
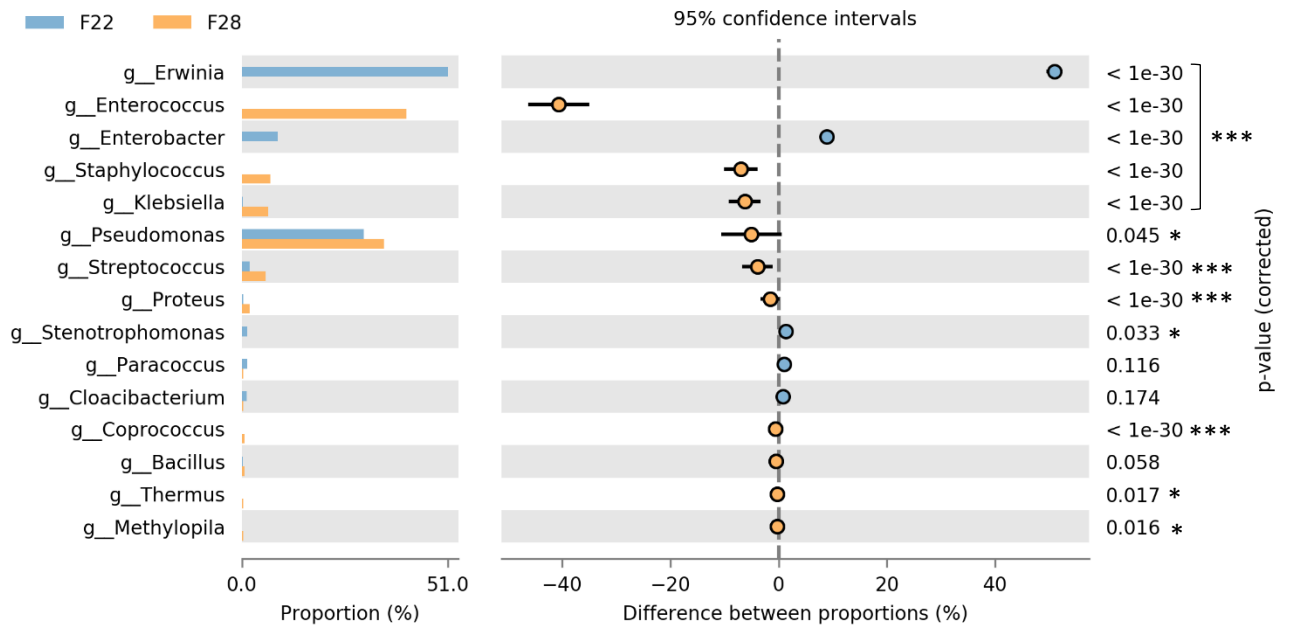
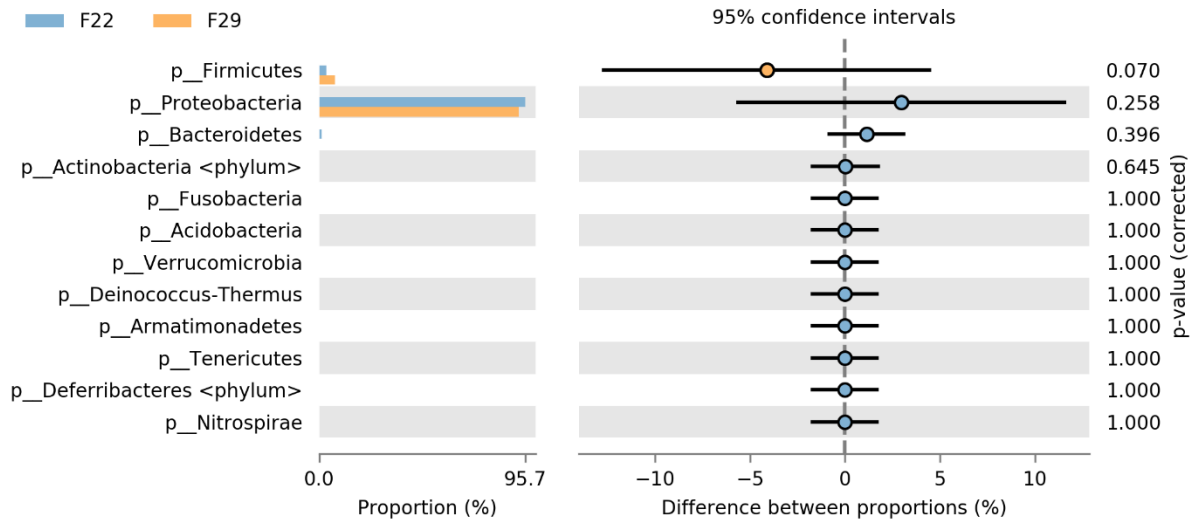
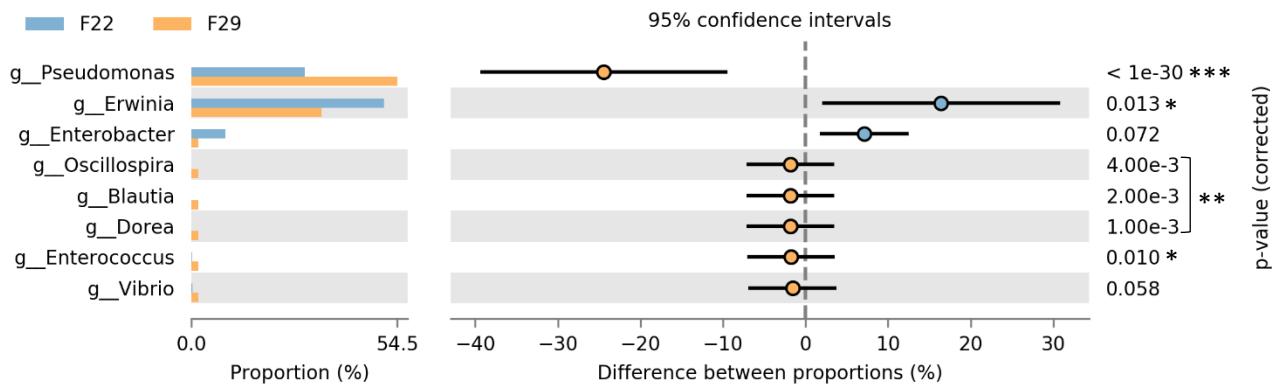
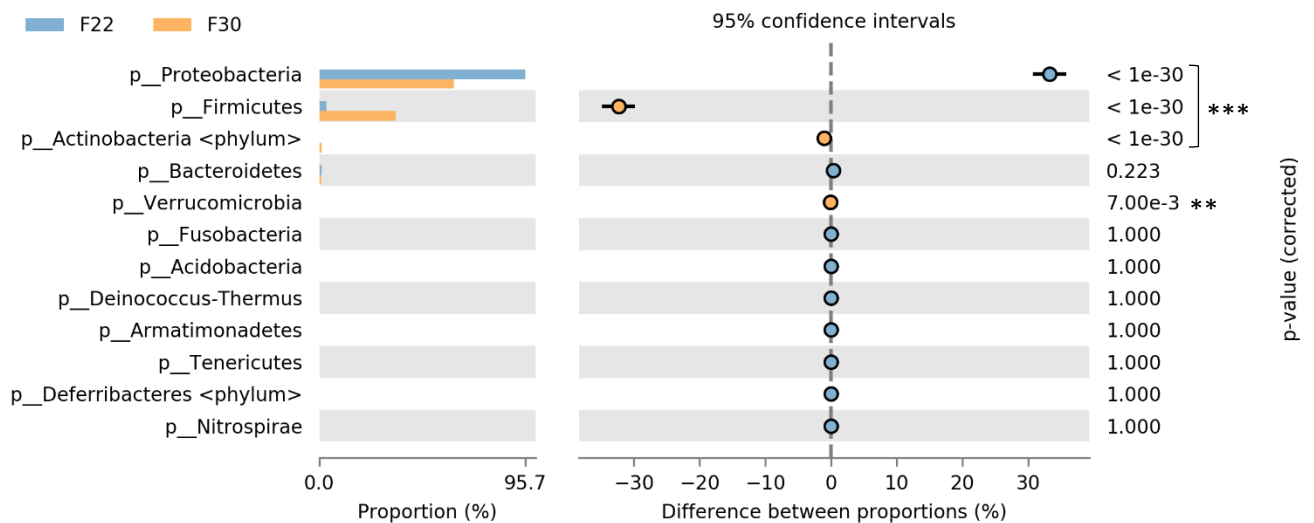


Figura 39: Comunidades bacterianas das feridas. Análise realizada através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise dos grupos diabético infectado controle (DC) *versus* diabético infectado tratado com pectina (DP). Comunidades bacterianas apresentadas por filo (A) e diversidade (B). Feridas coletas no momento de confecção das feridas e após quatro semanas de administração das dietas experimentais. Comunidades bacterianas das feridas, detectadas através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise de amostras aos pares a nível de filo e gênero, respectivamente: amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 27 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (A) e gênero (B); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 28 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (C) e gênero (D); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 29 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (E) e gênero (F); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 30 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (G) e gênero (H). Feridas coletas no momento de confecção das feridas e após quatro semanas de administração das dietas experimentais. Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$, os valores de p são indicados nos gráficos. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas não foram realizadas devido ao baixo n amostral.



C**D**

E**F****G**

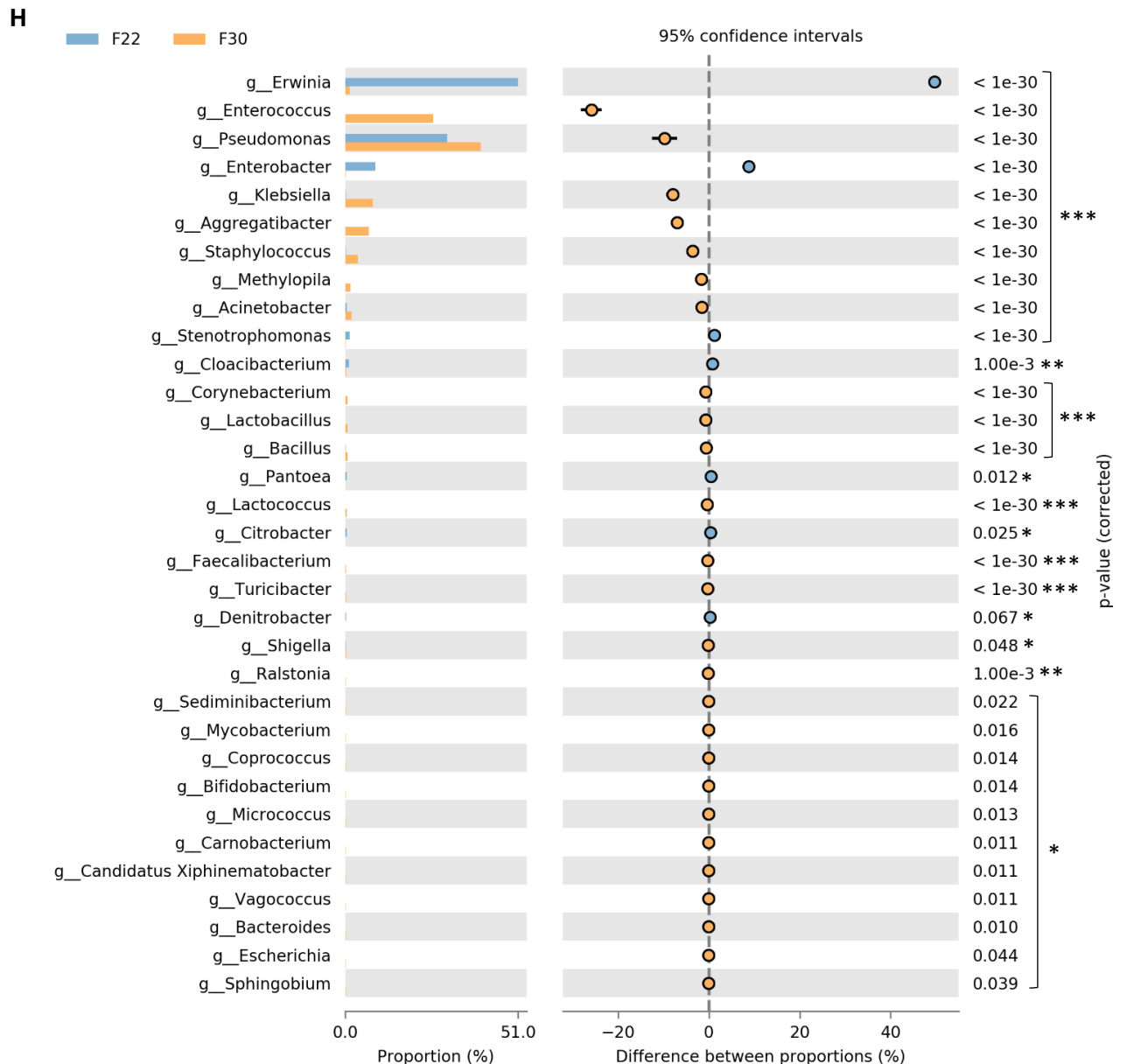


Figura40: Comunidades bacterianas das feridas, detectadas através do sequenciamento do 16S rRNA. Análise de amostras aos pares a nível de filo e gênero, respectivamente: amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 27 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (A) e gênero (B); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 28 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (C) e gênero (D); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 29 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (E) e gênero (F); amostra 22 do grupo diabético infectado controle (DIC) *versus* amostra 30 do grupo diabético infectado pectina (DIP) a nível de filo (G) e gênero (H). Feridas coletas no momento de confecção das feridas e após quatro semanas de administração das dietas experimentais. As letras "p" e "g" significam, respectivamente, "filo" (phylum) e "gênero" (genus). Dados agrupados e expressos em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As diferenças estatísticas são consideradas quando $p < 0.05$, os valores de p são indicados nos gráficos.

6.15. Compilado dos resultados

Tabela 2: Compilado dos efeitos da dieta rica em pectina em animais saudáveis, diabéticos e diabético com infecção.

ANÁLISES REALIZADAS	EFEITOS DA PECTINA NOS GRUPOS		
	SAUDÁVEL	DIABÉTICO	DIABÉTICO INFECTADO
Teste de Tolerância Intraperitoneal à glicose	-	Confirmação do modelo de indução de DM com STZ	
Peso os animais	-	-	-
Ingestão das dietas experimentais	-	-	-
Sobrevivência	-	Aumentou	-
Velocidade de fechamento das feridas	Aumentou	Aumentou	Aumentou
Fotos das feridas	-	Cicatrizes menos evidentes	Fechamento das feridas
Plaqueamento	-	Não influenciou na contagem	
Teste halo	Não interferiu no crescimento de PA <i>In vitro</i> , em condição aeróbia		
Histopatologia - Infiltrado inflamatório	-	-	Aumento no 7º dia
Histopatologia - Espessura da crosta	-	-	-
Histopatologia - Tecido de granulação	Diminuiu no 7º dia	Diminuiu no 14º dia	-
Histopatologia – Epitelização	-	Aumentou	Aumentou
Histopatologia - Escore total (gravidade)	Reduziu no 7º dia	Reduziu no 14º dia	-
Histomorfometria das feridas - Contagem de capilares	Aumentou a angiogênese nos dias 0 e 14	Aumentou a angiogênese nos dias 0 e 14	Aumentou a angiogênese nos dias 0 e 7
Leucócitos totais	-	-	Reduziu leucócitos circulantes no 5º dia
Macrófagos (NAG) nas feridas	-	-	-
Neutrófilos (MPO) nas feridas	Reduziu no 7º dia e aumentou no 14º.	-	-

Proteínas totais (soro)	-	-	-
Albumina (soro)	-	-	-
Creatinina (soro)	-	-	-
TGL (soro)	-	Aumentado no 14º dia	-
Colesterol total (soro)	-	-	-
VLDL (soro)	-	Aumentado no 14º dia	-
LDL (soro)	-	-	-
HDL (soro)	-	-	-
Metagenômica de fezes - Antes das dietas experimentais	-	Aumento na abundância relativa de <i>p. Verrucomicrobia</i>, <i>p. Tenericutes</i>, <i>g. Akkermansia</i> e <i>g. Anaeroplasma</i> Redução na abundância relativa de <i>g. Oscillospira</i>	-
Metagenômica de fezes – Após duas semanas de dietas experimentais	Aumento na abundância relativa de <i>p. Bacteroidetes</i> e <i>g. Bacteroides</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Firmicutes</i>, <i>g. Oscillospira</i>, <i>g. Ruminococcus</i>, <i>g. Desulfovibrio</i> e <i>g. Dehaloacterium</i>	Aumento na abundância relativa de <i>p. Bacteroidetes</i>, <i>g. Bacteroides</i>, <i>g. Provetela</i> e <i>g. Odoribacter</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Firmicutes</i>	-

Metagenômica de fezes - Quatro semanas de dietas experimentais (sendo duas delas na presença de feridas cutâneas)	Aumento na abundância relativa de <i>p. Bacteroidetes</i>, <i>g. Bacteroides</i> e <i>g. Prevotella</i> Redução na abundância relativa de <i>P. Firmicutes</i>	Aumento na abundância relativa de <i>g. Prevotella</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Actinobacteria</i>	Análise por pares: Aumento na abundância relativa de <i>p. Bacteroidetes</i>, <i>g. Bacteroides</i> e <i>g. Prevotella</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Firmicutes</i>, <i>p. Proteobacteria</i>, <i>p. Oscillospira</i>, <i>p. Verrucomicrobia</i> e <i>g. Oscillospira</i>
Metagenômica de pele basal - Tempo basal (duas semanas de dietas experimentais)	Não foi possível realizar análise estatística.	Aumento na abundância relativa de <i>p. Proteobacteria</i>, <i>g. Lactobacillus</i> e <i>g. Chryseobacterium</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Firmicutes</i> e <i>g. Oscillospira</i>	-
Metagenômica das feridas - Eutanásia (quatro semanas de dietas experimentais, sendo duas delas na presença de feridas cutâneas)	Não foi possível realizar analisar Mais abundantes foram: <i>p. Proteobacteria</i>, <i>p. Firmicutes</i>, <i>g. Sediminibacterium</i>, <i>g. Paeniaceillus</i>, <i>g. Corynebacterium</i>	Aumento na abundância relativa de <i>g. Paenibacillus</i> e <i>g. Oscillospira</i> Mais abundantes foram: <i>p. Proteobacteria</i>, <i>p. Firmicutes</i>, <i>g. Sediminibacterium</i> e <i>g. Corynebacterium</i>	Análise por pares. Aumento na abundância relativa de <i>p. Firmicutes</i> <i>g. Proteus</i> <i>g. Pseudomonas</i> <i>g. Streptococcus</i> <i>g. Enterococcus</i> Redução na abundância relativa de <i>p. Proteobacteria</i> <i>p. Bacteroidetes</i> <i>g. Erwinia</i> <i>g. Enterobacter</i>

* As letras "p" e "g" são abreviaturas, respectivamente, de "filo" (phylum) e "gênero" (genus).

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho optou-se por utilizar o modelo de indução química utilizando a aplicação de estreptozotocina (STZ), que é um dos produtos mais utilizados para este fim. Quando administrada em doses sub-diabetogênicas (40mg/kg) causa lesões inflamatórias nas ilhotas beta pancreáticas, com início mediado pelo sistema imune, resultando em morte progressiva das células beta e culminando no quadro de diabetes (LENZEN, 2008).

A STZ é um agente antimicrobiano, citotóxico e análogo da glicose, que é seletivamente acumulado nas células beta pancreáticas, via transportador de glicose GLUT2, presente na membrana plasmática destas células, causando lesão inflamatória e morte progressiva nestas células, ocasionando o quadro de diabetes (LENZEN, 2008). A STZ conta com diferentes mecanismos que ocasionam a necrose das células beta pancreáticas: sua capacidade alquilante de DNA, causando danos e sua fragmentação; depleta o NAD⁺, inibindo a biossíntese e a secreção de insulina, causando depleção de energia; causa metilação de proteínas e geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (LENZEN, 2008; KIRSTEN *et al.*, 2010).

Através do teste de glicosúria foi possível realizar uma triagem, excluindo os animais que não desenvolveram o diabetes. Já o TTIG validou o modelo de indução. Os camundongos foram considerados diabéticos quando, em glicosúria evidente, a glicemia foi registrada acima de 250 mg/dl após 14 dias da última dose de STZ. A persistência do diabetes foi determinada ao longo do estudo por teste de glicosúria (EMANUELLI *et al.*, 2002).

A perda de peso é um dos sintomas do diabetes (DANEMAN, 2006). Acompanhando as alterações ponderais não foi observada diferença estatística entre os grupos. A pectina foi relatada anteriormente como responsável por ganho de peso e melhoria de desempenho em vacas e frangos (SILVA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014). ZHAO *et al.*, (2010) verificaram que a infecção por PA, quando realizada no mesmo dia da confecção das feridas, causava uma perda superior a 30% do peso corporal dos camundongos, mas quando a infecção era transferida para o 2º dia de lesão não havia diferença de peso entre os grupos controle e infectado. Já GOLDFUSKY *et al.* (2015) relatam que a infecção com *P. aeruginosa*, ainda que produtora de biofilme, não afeta o peso de camundongos normais ou diabéticos, o que corrobora nossos achados.

Quanto a ingestão alimentar, verificou-se que a pectina aumentou a ingestão do grupo diabético tratado, com posterior normalização. O grupo diabético com ferida infectada e dieta

controle apresentou maior ingestão, quando comparado ao grupo diabético com dieta controle, evidenciando que a infecção da ferida contribuiu para o sintoma de polifagia. O estudo de Savastano *et al.*, (2014) verificaram parâmetros de saciedade em humanos pela ingestão das fibras dietéticas oligofrutose e pectina, fornecidas durante três semanas. Nesta pesquisa, com humanos saudáveis, não verificaram diferenças quanto ao ganho de peso, ingestão e avaliações subjetivas de apetite (SAVASTANO *et al.*, 2014). Diferentemente, Shein *et al.* (2019) verificaram efeitos de alívio na hipofagia e camundongos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, e alimentados com fibra dietética solúvel proveniente da casca de soja preta. Sobre o efeito da infecção na polifagia da diabetes, é de conhecimento que, durante infecções, ocorre um aumento do metabolismo energético, para atender a demanda do organismo frente a infecções e alterações metabólicas subsequentes (MEIRA, 1995).

Analisando a sobrevivência dos animais, inferimos que o diabetes e a infecção por *P. aeruginosa* (PA) são responsáveis por alta mortalidade e estas duas condições, somadas, diminuem drasticamente as chances de sobrevivência dos animais. Observa-se que a confecção das feridas em si não é fator influenciador da mortalidade, visto que os grupos saudáveis apresentaram 100% de sobrevivência. Nos grupos diabéticos sem infecção, nota-se um efeito protetor da pectina. O grupo diabético pectina contou com uma taxa de sobrevivência média de 54,2%, já o grupo diabético controle contou com 9,4%, uma diferença de 82,6%. Os grupos com menores taxas de sobrevivência foram os grupos diabéticos com dieta controle e os grupos diabéticos infectados.

Nossos dados de sobrevivência corroboram com os achados de Hunt *et al.* (2017) que, ao investigarem as taxas de cura de feridas infectadas por PA, em camundongos C57BL6/J saudáveis e diabéticos, verificaram que, no contexto de infecção de uma das duas feridas e utilizando uma cepa de PA selvagem, houve maior mortalidade no grupo diabético, que chegou a 30%, enquanto os camundongos saudáveis com infecção não apresentaram mortalidade. Já quando a infecção foi realizada em ambas as feridas, utilizando cepas distintas em cada uma, verificaram mortalidade de 20% nos camundongos saudáveis e 64% nos diabéticos, reforçando a ideia de que camundongos diabéticos são menos eficazes em lidar com a infecção (HUNT *et al.*, 2017).

O entendimento sobre a mortalidade no presente estudo é amparado nos estudos de (HUNT *et al.*, 2017), contudo, é inegável que existem diferenças que impactam na mortalidade, como: I) realizaram duas feridas por animal; o presente estudo confeccionou quatro feridas por

animal, o que significa também o dobro de carga bacteriana por animal; II) realizaram a infecção das feridas 24 horas após a confecção das mesmas; na atual pesquisa, infectamos imediatamente após a confecção da feridas; III) o estudo de (HUNT *et al.*, 2017) realizou indução de DM por administração de STZ, mas seus animais receberam injeções intraperitoneais de solução de glicose (25%) para evitar hipoglicemia fatal, devido a necrose maciça do pâncreas, pela ação da STZ; no atual estudo os animais não receberam solução de glicose como tratamento.

Em outra publicação no mesmo ano, Hunt *et al* (2017-2) desenvolveram outro modelo de infecção em modelo murino sem pelos, novamente com indução de DM por uso de STZ, contudo, utilizaram camundongos SKH-1 e relataram 100% de sobrevivência, comparando com o estudo anterior da mesma equipe, no qual utilizaram camundongos C57BL6/J e contaram com grande mortalidade (HUNT *et al.*, 2017). Estes dados indicam que a taxa de sobrevivência em estudos que envolvem infecção de feridas em animais diabéticos pode variar conforme a linhagem do estudo e diferenças nos protocolos adotados.

Em nosso estudo, todos os camundongos foram monitorados, visando a observação de qualquer anormalidade ao longo do delineamento. Alterações como perda de peso, imobilidade, desidratação, pelo arrepiado e falhado, hipotermia, postura curvada e a aparência dos olhos foram observadas como indicativo de sepse, dor e sofrimento. Em adição a estas observações visuais, a perda de peso de 25% com relação ao peso original, foram critérios utilizados para a eutanásia dos camundongos, visando um desfecho ético (HUNT *et al.*, 2017).

O modelo de infecção foi realizado a partir de pesquisas na literatura e adaptações dos modelos existentes, buscando adaptá-los para um modelo de ferida aplicado às demandas metodológicas da equipe de pesquisa, que utiliza, inclusive, quatro feridas por animal. A concentração de inóculo nas feridas também foi objeto de padronização, visto que uma infecção ideal para este estudo seria aquela capaz de gerar uma infecção que perdure tempo suficiente para prejudicar o processo cicatricial, configurando o quadro observado em feridas infectadas de humanos, mas não tão alta para que a infecção localizada se torne sistêmica, ocasionando sepse e óbito dos animais (TATARA *et al.*, 2015).

O plaqueamento do macerado do fígado indicou que o modelo não causou sepse nos animais. Recente pesquisa da mesma equipe padronizou um modelo similar de infecção, de quatro feridas por animal, com a utilização de disco de poliuretano sob as feridas, que confere maior superfície de contato entre bactéria e ferida, propiciando a permanência da infecção, já

que o objetivo do estudo era a avaliação da formação de biofilme pela infecção por *Pseudomonas aeruginosa* nas feridas de camundongos. O trabalho de Borges *et al.* (2022) utilizou a carga infectante de 10^4 bactérias/mL e também fizeram uso de cobertura oclusiva durante os 14 dias após a confecção de feridas. E ainda, não verificaram ocorrência de sepse nos animais (BORGES *et al.*, 2022).

O momento e tipo de infecção, além da opção de usar ou não a cobertura oclusiva, também foram objetos de estudo neste trabalho. Em estudo de Zhao *et al.* (2010), mencionou-se que o uso do curativo é o que proporciona a formação e o acúmulo de exsudato; e que o tempo de permanência do curativo está relacionado com o controle de expansão da ferida. Relatam ainda que a troca repetitiva do curativo nos pilotos que realizaram irritou a pele dos animais e removeu o excesso de fluido purulento formado na superfície da ferida. Dado estas observações, a pesquisa de Zhao *et al.* (2010) optou, posteriormente, por manter os curativos ao longo de todo o estudo, que durou 17 dias consecutivos, sem remoção dos curativos a qualquer momento, diferentemente do que acontece com as feridas humanas, que não requerem de curativo para o desenvolvimento da infecção (ZHAO *et al.*, 2010). Devido a estas observações, optamos pela utilização do curativo oclusivo durante todo o período de cicatrização (14 dias), sem remoção, inclusive, para os registros fotográficos. As medições das feridas, ocorridas ao longo do período do fechamento, contando com o auxílio de um paquímetro, foram realizadas sob o curativo, que era transparente. Importante ressaltar que o curativo de alguns animais necessitou ser reforçado em momentos específicos, conforme observações diárias, para evitar a remoção dos mesmos pelos animais.

Na análise de leucócitos totais verificou-se que a pectina reduziu o número de leucócitos circulantes no 5º dia após a confecção das feridas, em comparação ao seu controle. A capacidade da pectina em modular o sistema imune já foi relatada. Zhang *et al.*, (2016) verificaram a ação da dieta contendo pectina na inflamação pulmonar de camundongos submetidos a modelo de inflamação alérgica das vias respiratórias. Averiguaram que o tratamento reduziu a inflamação pulmonar, reduzindo a infiltração de eosinófilos, IgE, citocinas Th2 e aumentou as citocinas Th1 (ZHANG *et al.*, 2016).

O infiltrado de macrófagos (NAG) nas feridas não sofreu influência da dieta nos tempos avaliados, já o infiltrado de neutrófilos (MPO), no 7º dia, sofreu redução no grupo saudável tratado com pectina e sofreu um aumento neste mesmo grupo, no 14º dia. Poul *et al.* (2003) indicaram uma expressão altamente seletiva de GPR43 em leucócitos e sugeriu um papel dos

Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) no recrutamento de populações celulares para locais de infecção bacteriana. MASLOWDKI *et al.*, (2009), investigando a regulação das respostas inflamatórias pela microbiota intestinal via receptor GPR43, verificaram que o acetato induz um forte fluxo de cálcio em neutrófilos de camundongos, mas não em neutrófilos de camundongos *Gpr43*^{-/-}, indicando que GPR43 é um receptor funcional para AGCC em neutrófilos. E ainda, os AGCC seriam capazes de induzir a liberação de espécies reativas de oxigênio e aumentar a atividade fagocítica destas células (MASLOWSKI *et al.*, 2009).

A pectina não influenciou os níveis de proteínas totais, albumina e creatinina. Zhao *et al.*, (2010) realizaram estas mesmas dosagens no desenvolvimento de um modelo de ferida infectada com PA, em camundongos diabéticos (db/db) e não identificaram alterações. O diabetes pode provocar dislipidemias (SCHOFIELD *et al.*, 2016), assim, realizou-se a dosagem sérica das frações lipídicas. No contexto da diabetes a pectina promoveu aumento de triglicérides e VLDL. Os mecanismos da pectina dentro deste contexto ainda necessitam de mais investigações. A possibilidade de elevação de frações lipídicas pela ingestão de alguns tipos de prebióticos foi discutida por Jenkins *et al.* (1991) e Vogt *et al.* (2006). Segundo estes estudos, a suplementação de lactulose é capaz de aumentar a produção de ácidos graxos livres e TGL. Sabe-se que os ácidos graxos de cadeia curta possuem papéis importantes na regulação do metabolismo lipídico (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Foi proposto que a fermentação da lactulose aumenta a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato e propionato no cólon e afeta o metabolismo lipídico, uma vez que podem ser convertidos em Acetil-CoA, substrato para a síntese de gordura nos hepatócitos. Contudo, Jenkins *et al.* (1991) discutiram que, após a elevação de ácidos graxos séricos, as concentrações médias foram reduzindo ao longo do dia, o que os levou a concluir que fermentações rápidas podem aumentar os substratos e refletir em aumento momentâneo dos lipídios séricos. Segundo Saranteas *et al.* (2005), altas concentrações de cetamina, que inclusive, foi utilizada em nosso estudo, interfere na homeostase metabólica, elevando a concentração de triglicerídeos no soro, sem afetar o metabolismo do colesterol e HDL (SARANTEAS *et al.* 2005).

Os resultados da cinética de fechamento evidenciam que a pectina é capaz de otimizar o fechamento de feridas de animais saudáveis e diabéticos, inclusive, com infecção, sob uso de cobertura oclusiva. Todas as feridas apresentaram um fechamento até o 14º dia de análise, com exceção do grupo diabético infectado com dieta controle. Verificou-se que os animais do grupo diabético infectado contaram com formação de eritema e exsudato; contudo, os animais do grupo diabético infectado pectina foram capazes de realizar o reparo tecidual, com fechamento

total das feridas até o 14º dia; ao contrário do seu controle, que além de maior produção de exsudato ainda contou com um aumento expressivo das feridas, com relação ao seu tamanho original.

Ainda para investigar os efeitos da pectina na cicatrização das feridas, realizou-se a análise histológica, pela qual observou-se que, no contexto saudável, a pectina diminuiu o tecido de granulação e o escore total no 7º dia. Importante ressaltar que o escore total indica a gravidade e aspectos negativos relacionados a evolução do processo cicatricial. Desta forma, quanto maior o escore total, pior é o contexto da cicatrização. No contexto do diabetes, a pectina reduziu o tecido de granulação e o escore total no 14º dia e ainda aumentou a epitelização, avaliada no 14º dia. No grupo diabético infectado, observou-se que a pectina foi capaz de aumentar a epitelização.

As fotomicrografias evidenciam aspectos importantes para compreensão do processo cicatricial dentro do contexto estudado. A análise histopatológica revela que os animais diabéticos contaram com edema, que pode ser refletido na maior espessura da pele destes animais. A análise das peles íntegras, no tempo basal, evidencia que o grupo saudável contou com maior quantidade de tecido adiposo, com relação ao grupo diabético. Sabe-se que o diabetes resulta em perda de peso (DANEMAN *et al.*, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019). Neste tempo também verificou-se que o tratamento com pectina resultou em um aumento no número de folículos pilosos. Os folículos pilosos são importantes apêndices da pele, possuem alta capacidade de auto-renovação e são uma fonte de células-tronco, com propriedades para acelerar a regeneração tecidual. O crescimento dos folículos pilosos e a atividade das células-tronco são regulados por várias vias de sinalização. Existem vários tipos de células-tronco e vários estudos já investigam seu potencial no processo de regeneração da pele e outros sistemas (MA *et al.*, 2017; PETERSON; NAR, 2022).

No 7º dia após a confecção das feridas é possível visualizar, nas fotomicrografias, as feridas, o tecido de granulação, o infiltrado celular e uma considerável formação de crosta. O processo de epitelização neste tempo já é evidente e mais avançado nos grupos saudáveis. No 14º dia após a confecção das feridas, já se observa a epitelização completa das feridas, com exceção do grupo diabético infectado e com dieta controle. O grupo diabético controle contou com a epitelização completa, contudo, observa-se ainda a existência de crosta. O grupo diabético com ferida infectada e dieta controle não foi capaz de realizar o fechamento das feridas, diferentemente do grupo diabético com ferida infetada e tratado com pectina. Os cortes

histológicos desse grupo apresentam-se com uma lacuna na região da ferida, pela fragilidade inicial do tecido, que culminou em sua perda durante os procedimentos histológicos.

É comum que feridas crônicas e feridas diabéticas ocorram em um contexto de hipóxia. A hipóxia contribui para perpetuar o processo cicatricial através de vários mecanismos. A hipóxia prolongada em feridas pode desencadear uma cascata de eventos que levam à geração de radicais reativos e prejudiciais e espécies oxidativas, que podem prejudicar o processo de cicatrização. Além do mais, vários antioxidantes, como o óxido nítrico, são produzidos de maneira dependente de oxigênio (SONEJA *et al.*, 2005). O óxido nítrico possui efeito fundamental na atividade do NF-kappa B em macrófagos murinos. Esse mecanismo depende da concentração local de NO e permite maior agilidade na ativação de células imunes, otimizando a resposta imune contra estímulos patogênicos e dano tecidual (CONNELLY *et al.*, 2001). No presente estudo, realizou-se a análise dos capilares sanguíneos na pele basal e nas feridas coletadas nos tempos de 7 e 14 dias após a confecção. Foi evidenciado que a dieta enriquecida com pectina apresentou efeitos pró-angiogênicos em todos os tempos avaliados. No contexto saudável este aumento ocorreu no dia 0 e 14 após a confecção das feridas. No contexto diabético, se deu nos dias 0 e 14 e no contexto da ferida diabética infectada, nos dias 0 e 7. Vieira (2018) verificou angiogênese aumentada em animais saudáveis tratados com dieta enriquecida com pectina, corroborando nossos achados.

Sintetizando os efeitos da pectina até este ponto, é possível inferir que a dieta rica em fibras solúveis foi capaz de otimizar o fechamento de feridas cutâneas excisionais, acelerando a velocidade de fechamento das feridas saudáveis, diabéticas e diabéticas com infecção por *P. aeruginosa*, mesmo com alta carga bacteriana, com interferências no infiltrado inflamatório, no tecido de granulação, na epitelização, na angiogênese e no infiltrado de neutrófilos. Os efeitos de uma dieta rica em fibras solúveis foi objeto de estudo de outras pesquisas, que trabalharam em outros contextos, para evidenciar os mecanismos envolvidos nesta ação. O trabalho de Vieira (2018), também desenvolvido pelo presente grupo de pesquisa, publicado no formato de tese, demonstrou que a dieta enriquecida com pectina foi capaz de acelerar o processo de cicatrização tecidual em camundongos saudáveis. De forma semelhante aos nossos achados, Vieira (2018) evidenciou um aumento na taxa de fechamento da ferida cutânea e efeitos modulatórios sobre componentes da resposta inflamatória e angiogênica.

Macia *et al.* (2015) demonstraram que camundongos alimentados com amido resistente ou acetato, foram protegidos da colite, que envolve lesão intestinal, inflamação e reparo

tecidual. Em contrapartida, animais alimentados com dieta pobre em fibra alimentar tiveram um agravamento no desenvolvimento da colite.

O plaqueamento das feridas, no presente estudo, serviu como contraprova da presença da *P. aeruginosa* nas mesmas e evidenciou que o modelo diabético com infecção, independente da dieta contendo ou não pectina, apresentou elevada carga de PA no 14º dia. Apesar da ferida diabética infectada tratada com pectina ter apresentado o mesmo nível de infecção que o grupo diabético infectado controle, somente o grupo tratado com pectina foi capaz de realizar o fechamento.

In vitro, verificamos que apenas a microbiota cutânea aeróbia, presente na pele dos animais tratados com pectina não seria capaz de interferir, sozinha, no crescimento da PA. Importante levar em consideração que o cultivo *in vitro* não reproduz a composição da microbiota cutânea (GRICE *et al.*, 2008). Nesta análise, foi possível representar apenas a diversidade de micro-organismos cultiváveis em condição de aerobiose, excluindo a análise de bactérias anaeróbias.

Diante deste cenário, algumas indagações foram aventadas em relação a capacidade de promoção da restauração da microbiota cutânea e benefício à cicatrização de feridas. Orientados nestes questionamentos, demos continuidade nesta busca, investigando os possíveis efeitos da dieta rica em pectina na microbiota intestinal e na microbiota cutânea, utilizando amostras de fezes, pele basal e feridas.

Neste estudo, utilizamos análise metagenômica para mapear a composição da comunidade microbiana intestinal, através das amostras de fezes, e verificamos ainda a comunidade da pele, através das amostras de pele basal e feridas. Essas análises foram usadas para agrupar sequências do gene 16S rRNA em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e exibição destas a partir de filos e gêneros.

O sequenciamento metagenômico das amostras de fezes demonstra a microbiota colônica. Esta análise revelou que, anteriormente à administração das dietas, a condição do diabetes por si só, foi capaz de modificar esta microbiota, com aumento relativo na abundância de *p. Verrucomicrobia*, *p. Tenericutes*, *g. Akkermansia*, *g. Aneroplasma* e redução relativa na abundância *g. Oscillospira*. O sequenciamento de amostras de fezes indica ainda que a alimentação acrescida de pectina foi capaz de promover mudanças na microbiota colônica, no contexto saudável, de diabetes, com e sem infecção. Após duas semanas de dieta enriquecida

com pectina observou-se um aumento relativo na abundância de p. *Bacteroidetes* e g. *Bacteroides*; redução relativo na abundância de p. *Firmicutes* e g. *Oscillospira*. É notável ainda um aumento relativo na abundância de p. *Bacteroidetes*, g. *Bacteroides*, g. *Prevotella* e redução relativo na abundância de p. *Firmicutes* neste mesmo grupo, porém, na quarta semana de administração das dietas. Nos grupos diabéticos, observou-se que o tratamento ocasionou um aumento relativo na abundância de p. *Bacteroidetes*, g. *Bacteroides*, g. *Prevotella* e redução de relativo na abundância p. *Firmicutes* na segunda semana de dieta. Na quarta semana de dieta observa-se um aumento relativo na abundância de g. *Prevotella* e redução relativo na abundância de p. *Actinobactéria*. No grupo diabético infectado, observou-se que a dieta suplementada com pectina, após duas semanas de administração, proporcionou um aumento relativo na abundância de p. *Bacteroidetes* e g. *Bacteroides* e redução relativa na abundância de p. *Firmicutes* e g. *Oscillospira* na microbiota colônica.

A *Verrucomicrobia* é uma bactéria benéfica, encontrada de forma distribuída no intestino humano saudável e possui potencial para modular o processo inflamatório (YU *et al.*, 2019). A redução dos seus níveis pode ser um indicativo de disbiose intestinal (YU *et al.* 2019). Curiosamente, verificou-se neste estudo um aumento na abundância relativa do filo *Verrucomicrobia*, no ambiente colônico, nos animais diabéticos. Estes dados corroboram os dados de Yu *et al.* (2019), que constataram um aumento na abundância relativa de *Verrucomicrobia* no intestino de camundongos geneticamente diabéticos (db/db), através da análise de 16S rRNA de amostras fecais. Yu *et al.*, (2019) discutem que este aumento se deu provavelmente como uma resposta de feedback positivo para regular um desequilíbrio da microbiota em função do diabetes. De forma interessante, observou-se no presente estudo um aumento na abundância relativa de *Verrucomicrobia* somente na segunda semana, o que já não ocorreu na quarta ou na sexta semana de dieta com pectina.

Um aumento na abundância relativa do filo *Bacteroidetes*, nos grupos alimentados com pectina, a partir da segunda semana de dieta, se deu tanto no grupo saudável como no diabético. Yu *et al.* (2019) observaram um aumento desta bactéria em camundongos pseudo-livres de germes após o transplante de bactérias fecais de animais diabéticos (db/db). Sabe-se que *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* são os filos bacterianos mais predominantes na comunidade intestinal humana (YU *et al.*, 2019). Destes, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* foram detectados na análise metagenômica do presente estudo.

O estudo de Chambers *et al.* (2019), desenvolveu um projeto randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, em adultos com sobrepeso e obesidade e analisaram os efeitos da suplementação de propionato de inulina, um controle de inulina e um controle de celulose na microbiota colônica. A fermentação de inulina causou um aumento relativo de *Actinobacteria* a nível de classe. De forma oposta, verificamos no presente estudo uma redução na abundância relativa de *Actinobacteria* nas amostras de fezes dos animais diabéticos, alimentados com pectina por quatro semanas. As diferenças entre os estudos, a condição do diabetes e a fonte de fibras pode ter influenciado nos resultados. Chambers *et al.* (2019) observaram ainda, que ambas suplementações, com propionato de inulina e inulina, diminuíram a abundância de espécies seletivas de *Firmicutes* e estimularam o crescimento de *Bacteroides*, em comparação com a celulose (CHAMBERS *et al.*, 2019), este último achado corrobora nossos achados: verificamos que a pectina proporcionou uma diminuição na abundância relativa na abundância de *Firmicutes*, no grupo saudável e diabético, após duas semanas de dieta e no saudável e diabético infectado, após quatro semanas de dieta; os grupos saudável e diabético apresentaram um aumento na abundância relativa de *Bacteroides* após duas semanas de dieta e os grupos saudável e diabético infectado apresentaram essa elevação após quatro semanas de dieta.

Zhang *et al.* (2020) realizaram o sequenciamento de 16S rRNA para detectar a composição da microbiota intestinal em 154 idosos com diabetes tipo 2, sendo que, 73 idosos apresentaram cognição normal e 81 idosos apresentaram comprometimento na cognição. Nesta investigação, Zhang *et al.* (2020) verificaram menor abundância relativa de *Tenericutes*, na microbiota intestinal do grupo com indivíduos diabéticos e comprometimento cognitivo. Interessantemente, verificamos o aumento na abundância relativa de *Tenericutes* no grupo diabético, anteriormente à administração das dietas experimentais. Foi notável que após a introdução da dieta enriquecida com pectina, não foram mais verificadas diferenças estatísticas deste filo.

Oscillospira é frequentemente encontrado em alta proporção na microbiota fecal e intestinal de animais e humanos (KONIKOFF *et al.*, 2016) e é capaz de produzir butirato. Suas características metabólicas e biológicas ainda estão sendo investigadas, porém, vários estudos mostram uma forte associação entre esse organismo e doenças relacionadas a inflamação e possui efeitos positivos no contexto de doenças metabólicas relacionadas à obesidade (YANG *et al.*, 2021). Neste estudo, o diabetes estava associado a um aumento relativo na abundância de *Oscillospira* intestinal, enquanto o grupo saudável que recebeu pectina por duas semanas e o grupo diabético infectado que recebeu pectina por quatro semanas, contaram com uma

redução na abundância relativa desta bactéria, no ambiente colônico (KONIKOFF *et al.*, 2016; GOPHNA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2021).

Os papéis fisiológicos da *Akkermansia* e sua ação sob os distúrbios metabólicos ainda estão sob investigação. Foi demonstrado que ela se encontra em menor quantidade em camundongos obesos e diabéticos e que a alimentação prebiótica foi capaz de reduzir sua abundância. Redução esta que apresenta correlação positiva com a melhora do perfil metabólico e inflamatório (EVERARD *et al.*, 2013, PLOVIER *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020). No atual estudo, verificamos no grupo diabético, anteriormente ao início da administração da dieta enriquecida com pectina, uma maior abundância relativa de *Akkermansia*. Ainda nesse grupo, após a ingestão de pectina, não foi verificado novamente aumento relativo na abundância deste gênero. É dedutível que nos estágios ainda iniciais do diabetes, possa ter ocorrido um feedback positivo.

Yuan *et al.* (2020) ao estudar os efeitos de dois extratos ricos em polissacarídeos sob o diabetes tipo 2 de ratos, constataram que ambos os extratos reverteram a disbiose da microbiota intestinal dos camundongos diabéticos, aumentando a abundância relativa dos gêneros *Odoribacter*, *Anaeroplasma*, *Parasutterella* e *Muribaculum*, enquanto diminuíram a abundância relativa dos gêneros *Enterococcus*, *Klebsiella* e *Aerococcus*. No atual estudo verificou-se uma abundância relativa do gênero *Anaeroplasma*, no contexto da diabetes, anterior à administração das dietas, nas amostras de fezes. Sabe-se que esta bactéria é um potencial probiótico anti-inflamatório para o tratamento da inflamação intestinal crônica, com mecanismos que envolvem o aumento de células plasmáticas secretoras de IgA na lâmina própria do intestino delgado e indução da expressão da citocina TGF- β em células T de camundongos (BELLER *et al.*, 2019).

Verificamos um aumento relativo do gênero *Provatella* nas fezes dos grupos diabéticos alimentados com pectina por duas e por quatro semanas. A *Provatella* tem sido relacionada a dietas ricas em fibras. É uma importante bactéria encontrada na cavidade oral e no intestino grosso humano (PRECUP *et al.*, 2019). Sua abundância tem sido relacionada a uma melhor capacidade para perda de peso diante de uma dieta rica em fibras, apoiando o estudo de biomarcadores na nutrição personalizada para o controle da obesidade (CHRISTENSEN *et al.*, 2019).

Os efeitos na microbiota intestinal ocasionados pela dieta rica em fibras, através da ação dos produtos da sua fermentação, como é o caso dos AGCC, possuem mecanismos ainda sob

investigação. Macia *et al.* (2015) elucidaram que a dieta rica em fibras e o tratamento com acetato, no contexto da colite induzida em camundongos, molda a microbiota intestinal. Os AGCC causam hiperpolarização secundária à mobilização de Ca^{2+} , causando ativação do inflamassoma NLRP3 epitelial, que estimula a produção de IL-18 no intestino. Os efeitos benéficos da fibra alimentar são mediados por GPR43 e GPR109A, um receptor expresso por células epiteliais colônicas. Assim, o estudo de Macia *et al.* (2015) esclarece vias moleculares importantes para o entendimento e dimensão da importância da fibra alimentar para o eixo dieta, microbiota e sistema imune.

Assim como o ambiente intestinal, a colonização da superfície da pele é altamente variável e complexa. Sua composição varia conforme localização topográfica, alimentação, condições de saúde e fatores ambientais exógenos. A imunidade cutânea inata e adaptativa são capazes de modular a microbiota da pele, mas a microbiota, por sua vez, também “educa” o sistema imune (GRICE, SEGRE, 2011). O desequilíbrio da microbiota cutânea está relacionado com doenças, como, por exemplo, a dermatite atópica, cujo tratamento é feito pela administração de probióticos. A compreensão do microbioma da pele é extremamente necessária para o estudo das relações entre microbioma e doenças, assim como o uso de moduladores de microbiota (MONIAGA *et al.*, 2022).

O sequenciamento do 16S rRNA é uma nova tecnologia de sequenciamento que possibilita a análise de comunidades microbianas e seu papel nas alterações da microbiota, inclusive a cutânea. Uma melhor compreensão destas doenças pode auxiliar na formulação de novas modalidades terapêuticas (CARMONA-CRUZ *et al.*, 2022). As evidências sobre a dinâmica da dieta na modulação da microbiota e doenças associadas ainda são escassas e mais pesquisas precisam ser desenvolvidas para elucidar essa dinâmica.

No presente estudo, amostras de pele basal e feridas foram coletadas para análise metagenômica. Durante a coleta da pele basal e a coleta das feridas, os animais contavam, respectivamente, com duas semanas e quatro semanas de ingestão da dieta rica em fibras. A análise da pele basal contava com animais saudáveis e diabéticos. Não foi possível obter a análise das amostras basais dos animais saudáveis. Já nos diabéticos, verificou-se que a alimentação com pectina resultou em um aumento relativo na abundância de p. *Proteobacterias*, g. *Lactobacillus* e g. *Chryseobacterium* e redução na abundância relativa de p. *Firmicutes* e g. *Oscillospira*.

As amostras de feridas coletadas após 14 dias da confecção, referente aos grupos saudáveis, diabéticos e diabéticos com infecção, apresentaram escassez de material genético, portanto, não foi possível a realização da análise do grupo saudável. Quanto ao grupo diabético, observou-se que a pectina proporcionou um aumento relativo na abundância de *g. Oscillospira*. Neste mesmo grupo, as bactérias mais abundantes foram: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Sediminibacterium*, *Paeniactillus* e *Corynebacterium*.

Quanto aos grupos diabéticos infectados, verificou-se que não houve diferença significativa entre a análise metagenômica do grupo diabético infectado controle e do grupo diabético infectado tratado com pectina. Contudo, devido à escassez de mostras, em função da alta mortalidade destes grupos, foi realizada análise por pares. Nesta, observa-se no grupo tratado com pectina, um aumento relativo na abundância das bactérias *p. Firmicutes*, *g. Proteus*, *g. Pseudomonas*, *g. Streptococcus* e *g. Enterococcus* e redução na abundância relativa das bactérias *p. Proteobacteria*, *p. Bacteroidetes*, *g. Erwinia* e *g. Enterobacter*. Sabe-se que os principais filos comumente detectados na pele humana são *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroides* (GRICE *et al.*, 2009).

Para melhor compreensão dos nossos achados, buscamos compreender melhor as bactérias encontradas nas amostras de pele e feridas, relacionando-as com contextos de saúde e doença, com foco em doenças de fundo inflamatório e/ou feridas cutâneas, conforme o que já está descrito na literatura até o momento. Sobre as *Proteobactérias*, por exemplo, sabe-se que são um importante componente da diversa e complexa microbiota da pele humana, apresentam alta diversidade na microbiota da pele e são associadas a disbiose, doenças inflamatórias intestinais e alterações metabólicas, como obesidade e diabetes (SHIN *et al.*, 2015; RIZZATTI *et al.*, 2017). O presente estudo demonstrou que a pectina promoveu redução na abundância relativa no filo *Proteobacteria* e aumentou na abundância relativa de *Firmicutes* nas feridas de camundongos diabéticos. Geralmente, os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* dominam a microbiota intestinal e a disbiose inclui uma prevalência aumentada de *Proteobacteria*. O aumento de *Proteobacteria* tem sido considerado uma assinatura diagnóstica para potencial disbiose, aumento da inflamação colônica, risco de doença e ainda, seu aumento está associada a níveis reduzidos de AGCC (SHIN *et al.*, 2015).

Quanto aos *Lactobacillus*, sabe-se que seu uso tópico resulta na redução de lesões de acne (LEBEER *et al.*, 2022). Os *Lactobacilos* são conhecidos por possuírem efeitos imunomoduladores benéficos no controle de condições inflamatórias da pele e por inibirem

bactérias patogênicas, através da produção de metabólitos antimicrobianos. Sua influência no sistema imunológico se faz através da mediação de metabólitos bacterianos e padrões moleculares associados a micróbios, que aumentam as barreiras protetoras da pele (MUIZUDDIN *et al.*, 2012; DELANGHE *et al.*, 2021). Ong *et al.* (2019) evidenciaram que o tratamento tópico com *Lactobacillus plantarum* auxiliou na cicatrização de feridas de ratos e suprimiu infecções por *Staphylococcus aureus*, por inibirem a geração de estafiloxantina, principal responsável pela resistência das bactérias às defesas do sistema imune através da liberação de espécies reativas de oxigênio. O tratamento com bactéria também aumentou a produção de TNF- α , IL-4 e IL-6 nas fases iniciais da cicatrização, com diminuição gradual de TNF- α (ONG *et al.*, 2019). Assim como a aplicação tópica, seu uso na forma oral também resulta em benefícios para a pele, como foi verificado por Moreira *et al.* (2021), que realizaram o tratamento oral com diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, e *L. paracasei*), no modelo de feridas cutâneas excisionais em camundongos. Os resultados evidenciaram um fechamento de feridas cutâneas mais eficaz, com redução da cicatriz, da inflamação e melhora da fibrogênese.

O gênero *Chryseobacterium* contém mais de 80 espécies de bactérias, geralmente encontradas em ambientes úmidos, sendo a maioria não patogênica, contudo, encontram-se relatos clínicos de infecções humanas, geralmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos e em bebês (BOOTH, 2014; SRINIVASAN *et al.*, 2016). Outro estudo interessante, no contexto de feridas diabéticas e microbiota cutânea, envolvendo bactérias também identificadas no presente estudo, é o estudo de Kim *et al.* (2020). Para investigar o comportamento das bactérias no desenvolvimento de feridas crônicas, Kim *et al.* (2020) usaram o modelo murino db/db/-/- de feridas diabéticas e utilizaram inibidores de enzimas antioxidantes para resultar em altos níveis de estresse oxidativo. Verificaram que as feridas diabéticas crônicas e com alto estresse oxidativo possuíam menor diversidade da microbiota e foram colonizadas por bactérias formadoras de biofilme, como a *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* e a *Corynebacterium frankenforstense*, esta última, também detectada no presente estudo. Estas bactérias foram apontadas por produzirem exotoxinas que causam danos amplos aos tecidos.

Nossos resultados demonstraram que a modulação da microbiota pode se dar através da ingestão de produtos alimentares, como a pectina. É de conhecimento que a ingestão de fibras solúveis resulta na produção de gases e ácidos graxos de cadeia curta, que promovem um pH favorável e modificam o ambiente colônico. Assim, a microbiota intestinal, pode interagir com

o hospedeiro pela produção de diversos metabólitos (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019; LARA-ESPINOZA *et al.*, 2018).

Face aos resultados obtidos neste trabalho, discutimos aqui os possíveis mecanismos envolvendo o eixo dieta, microbiota, produção de metabólitos e cicatrização. A caracterização das populações microbianas em diferentes locais pode levar a descobertas sobre como estes metabólitos influenciam na célula hospedeira e consequentemente na cicatrização de feridas diabéticas. Contudo, o papel específico de várias destas bactérias na microbiota intestinal, cutânea e na saúde humana, assim como seus mecanismos, não foram totalmente estabelecidos (BOWLER *et al.*, 2001).

Sabe-se que a inulina, a celulose, a goma guar e a pectina são fibras alimentares solúveis e estão entre os principais substratos para a fermentação bacteriana e subsequente produção de ácidos graxos de cadeia curta, sendo que a pectina produz principalmente o acetato (CHAMP, 2004). Estes metabólitos desempenham papéis importantes no metabolismo e nas vias de sinalização (CRACIUN *et al.*, 2022). Os *Bacteroidetes*, por exemplo, produzem principalmente acetato e propionato, enquanto *Firmicutes* produzem principalmente butirato (LOUIS *et al.*, 2009). *Oscillospira*, cuja abundância relativa foi aumentada pela dieta rica em pectina, é um gênero capaz de produzir butirato e já foi caracterizado como um candidato a probiótico. Sua abundância é relacionada a um papel importante nas atividades metabólicas associadas à obesidade (YANG *et al.*, 2021). Os *Bacteroides* são bastante variáveis, podem se comportar como bactérias benéficas ou patogênicas. Assim, acredita-se que seu comportamento depende das condições ambientais do hospedeiro. Esta bactéria é capaz de produzir ácido succínico, ácido acético, ácido láctico e ácido propiônico em proporções variáveis durante a fermentação (RIOS-COVIAN *et al.*, 2015).

Os *Lactococcus* são bactérias produtoras de ácido láctico, que é um ácido graxo de cadeia curta. A aplicação tópica de bactérias lácticas estimulou a proliferação de queratinócitos e acelerou a reepitelização pela indução da migração destas células. Os *Lactococcus* também reduziram a secreção de mediadores pró-inflamatórios pelos queratinócitos, como MCP-1, que desempenha um papel fundamental na psoríase, na dermatite atópica e em outras doenças da pele (BRANDI *et al.*, 2020).

Os produtos finais da fermentação microbiana, dentre os quais o butirato, o propionato e o acetato são os principais, são envolvidos em uma gama de funções fisiológicas. Os AGCC participam da manutenção da integridade da mucosa intestinal, melhoram o metabolismo de

glicose e lipídios, o gasto de energia, o sistema imunológico e as respostas inflamatórias (AGUS *et al.*, 2020). Estes metabólitos são detectados por receptores específicos, com mecanismos variados e sinalizam por meio de mecanismos variados. A função geral desses metabólitos incluiu regulação da motilidade intestinal, da secreção de hormônios, manutenção da barreira epitelial, regulação da função das células do sistema imunológico e modulação de respostas inflamatórias (PRIYADARSHINI *et al.*, 2019; AGUS *et al.*, 2020)

Explicitando a ação e importância dos AGCC para mecanismos que podem resultar em benefícios na cicatrização de feridas, menciona-se a pesquisa de LIU *et al.*, (2016), na qual demonstraram que o butirato de sódio (NaBu), um ácido graxo de cadeia curta, promoveu migração celular em células endoteliais aórticas bovinas e aumentou a expressão de proteínas envolvidas na sinalização celular angiogênica, incluindo p-PKC β 1, p-FAK, p-ERK1/2, p-NF κ B, p-PLC γ 1 e p-VEGFR2.

A resposta inflamatória pode ser exacerbada ou prolongada em animais germ free, que também apresentam menos AGCC. Em contrapartida, Maslowski *et al.* (2009) demonstraram que a microbiota de animais convencionais confere homeostase ao sistema imunológico e protege contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias. Um dos mecanismos envolvidos neste controle são os AGCC, que se ligam ao receptor 43 acoplado à proteína G (GPR43), cuja estimulação é essencial para a construção da resposta inflamatória. Os camundongos deficientes em GPR43 (Gpr43 $^{-/-}$) apresentam inflamação exacerbada ou sem resolução e com aumento de mediadores inflamatórios, em modelos de colite, artrite e asma (MASLOWSKI *et al.*, 2009). Ainda neste contexto, evidenciando a ligação entre dieta, microbiota e resposta imune, Canesso *et al.* (2014), utilizando camundongos livres de germes, avaliaram a influência da microbiota comensal na cicatrização de feridas cutâneas de roedores. Verificaram que a ausência da microbiota acelerou a cicatrização de feridas, caracterizada por uma redução de neutrófilos e um aumento de marcadores que indicam polarização de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório.

Jiao *et al.* (2020) analisaram os efeitos do óleo dos esporos de um cogumelo, denominado *Gnoderma lucidum*, na cicatrização de feridas de queimadura na pele de camundongos e analisou a influência do tratamento na abundância da microbiota cutânea e os mecanismos subjacentes. A microbiota nas feridas foi analisada usando a sequência 16s rRNA. Neste estudo, evidenciaram que o tratamento com o óleo acelerou a cicatrização de queimaduras na pele, modulou a microbiota da pele, aumentou o processo de cicatrização, reduziu expressão

de IL17A, IFN- γ e reduziu LPS. A microbiota da pele afetou a cicatrização cutânea através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), Toll-like receptor 4 (TLR4), que cumprem um importante papel no sistema imune inato.

Diante das evidências aqui obtidas, inferimos que este trabalho possibilita, mais adiante, com aperfeiçoamentos, para a solidificação de um modelo experimental de feridas diabéticas infectadas. Os resultados aqui detalhados contribuem para o entendimento da ação das fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas, através da modulação da microbiota intestinal e cutânea, mas também instigam uma série de questionamentos, que podem ser refletidos na formulação de novas pesquisas, que possam dar continuidade a estas investigações. O presente estudo contou com limitações, como a alta mortalidade dos animais, um n amostral pequeno para as análises metagenômicas e o não aprofundamento na investigação de mecanismos relacionados ao sistema imunológico, confirmando que a ciência é feita de pequenas contribuições, por isso, aponta-se a necessidade de continuação desta linha de pesquisa, visando o aprofundamento na investigação dos mecanismos envolvidos na cicatrização sob influência dos metabólitos bacterianos, influenciados pela dieta.

8. CONCLUSÃO

Através dos resultados alcançados neste trabalho, pode-se concluir que:

- ✓ O modelo experimental de ferida diabética e ferida diabética infectada foi efetivo em reproduzir um modelo de ferida crônica;
- ✓ O uso do curativo é fundamental para obtenção do modelo de ferida infectada;
- ✓ O modelo de ferida diabética experimental com e sem infecção por *P. aeruginosa* diminui as chances de sobrevivência dos animais, contudo, a pectina foi um fator protetivo para os grupos diabéticos sem infecção;
- ✓ A dieta rica em fibras solúveis é capaz de acelerar o reparo tecidual, no contexto de feridas excisionais em animais saudável e também no contexto da diabetes, inclusive com infecção por *P. aeruginosa*;
- ✓ A pectina auxiliou na velocidade do fechamento das feridas;
- ✓ O diabetes influencia na microbiota colônica dos animais, independente da dieta;
- ✓ A alimentação enriquecida com pectina foi capaz de causar alterações a microbiota colônica dos animais saudáveis, diabéticos com e sem infecção. O tempo de consumo das dietas influencia no perfil da microbiota;
- ✓ A alimentação enriquecida com pectina foi capaz de causar alterações na microbiota da pele de animais diabéticos;
- ✓ A pectina auxiliou no fechamento das feridas por meio da modulação de componentes do reparo tecidual, como o grau de inflamação, formação de tecido de granulação, angiogênese, infiltrado local de neutrófilos e modulação da microbiota colônica e cutânea.

9. REFERÊNCIAS

- AGUS, A; CLÉMENT, K; SOKOL, H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. **Recent Advances in Basic Science**, v. 70, p. 1174-1182., 2021.
- ALHAZMI, A. Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. **International Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. p44, 4 fev. 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. **Diabetes Care**, v. 42, n. Supplement 1, p. S13–S28, jan. 2019.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, n. Supplement_1, p. S62–S67, 1 jan. 2009.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, n. Supplement_1, p. S67–S74, 1 jan. 2013.
- ASSMANN, T. S; BRONDANI, L. A; BOUÇAS, A. P; RHEINHEIMER, J; SOUZA, B. M; CANANI, L. H; BAUER, A. C; CRISPIM, D. Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Nitric Oxide**, v. 61, p. 1–9, dez. 2016.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. *The Lancet*, v. 383, n. 9911, p. 69–82, jan. 2014.
- BADESCU, S. V; TATARU, C; KOBYLINSK, L; GEORGESCU, E. L; ZAHIU, D. M; ZAGREAN, A. M; ZAGREAN, L. The association between Diabetes mellitus and Depression. **Journal of Medicine and Life**, v. 9, n. 2, p. 120-125, Apr-Jun. 2016.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, mar. 2005.
- BARRETT, E. J; LIU, Z; KHAMAISI, M; KING, G. L; KLEIN, R; KLEIN, B. E. K; HUGHES, T. M; CRAFT, S; FREEDMAN, B. I; BOWDEN, D. W; VINIK, A. I; CASELLINI, C. M. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 12, p. 4343–4410, 1 dez. 2017.
- BEAUKEMA, M; FAAS, M. M; VOS, P. D. The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1364-1376, sep. 2020.
- BELLER, A; KRUGLOV, A; DUREK, P; GOETZE, V. V; WERNER, K; HEINS, G. A; NINNEMANN, J; LEHMANN, K; MAIER, R; HOFFMANN, U; RIEDEL, R; HEIKING, K; ZIMMERMANN, J; SIEGMUND, B; MASHREGHI, M. F; RADBRUCH, A; CHANG, H. D. Specific microbiota enhances intestinal IgA levels by inducing TGF- β in T follicular helper cells of Peyer's patches in mice. **European Journal of Immunology**, v. 50, p. 783-794, jun. 2020.
- BINDELS, L. B; DELZENNE, N. M; CANI, P. D; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303–310, maio 2015.

BLAKYTYN, R; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 6, p. 594 - 608, 2006.

BOLGER, A. M; LOHSE, M; USAEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, Aug. 2014.

BOOTH, S. J. Cheyeseobaterium Related genera Infections. **The comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1-4, 2007.

BORGES, E. L; AMORIM, G. L; MIRANDA, M. B; MARTINS, F. S; GUEDES, A. C. M; SAMPAIO, K. H; SPIRA, J. A. O; BARCELOS, L. S. Biofilm model on mice skin wounds. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 37, n. 3, feb. 2022.

BRANDI, J; CHERI, S; MANDFREDI, M; CARLO, C. D; VANELLA, V. V; FEDERICI, F; BOMBIERO, E; BAZAJ, A; RIZZI, E; MANNA, L; CORNAGLIA, G; MARINI, U; VALENTI, M. T; MARENGO, E; CECCONI, D. Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. **Nature**, v. 10, n. 1172, 2020.

BURHANS, M. S; HAGMAN, D. K; KUZMA, J. N; SCHMIDT, K. A; KRATZ, M. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. **Comprehensive Physiology**, v. 13, n. 9, p. 1-58, jun 2019.

BOWLER, P. G; BUERDEN, B. I; ARMSTRONG, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244-269, 2001.

CAMPOS, A. C. L; BORGES-BRANCO, A; GROTH, A. K. Wound Healing. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CANESSO, M. C. C; CASSINI-VIEIRA, P; MOREIRA, C. F; LUONG, S; RACHID, M. A; MARTINS, F. S; TEIXEIRA, M. M; VIEIRA, A. T; MACKAY, C. R; BARCELOS, L. S. Dietary fiber improves skin wound healing and scar formation through the metabolite-sensing receptor GPR43. **J. Investigative Dermatology**, 23:S0022-202x(23)01939-5, 2023.

CANESSO, M. C. C; VIEIRA, A. T; CASTRO, T. B. R; SCHIRMER, B. A; CISALPINO, D; MARTINS, F. S; RACHID, M. A; NICOLI, J. R; TEIXEIRA, M. M; BARCELOS, L. S. Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em animais isentos de microbiota comensal. **Journal of Immunology**, v. 193, p. 5171-5180, Oct. 2014.

CANTERI, M. H. G; MORENO, L; WOSIACKI, G; SCHEER, A. P. Pectina: from raw material to the final product. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 10 abr. 2012.

CAPORASO, J. G; KUCZYNSKI, J; SOMBAUGH, J; BITTINGER, K; BUSHMAN, F.D; COSTELLO, E. K; FIERER, N; PENÄ, A. G; GOODRICH, J. K; GORDON, J. I; HUTTLEY, G. A; KELLEY, S. T; KNIGHTS, D; KOENIG, J. E; LEY, R. E; LOZUPONE, C. A; MCDONALD, D; MUEGGE, B. D; PIRRUNG, M; REEDER, J; SEVINSKY, J. R; TURNBAUGH, P. J; WALTERS, W. A; WILDMANN, J; YATSUNENKO, T; ZANEVELD, J; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, May 2010.

CAPORASO, J. G; LAUBER, C. L; WALTERS, W. A; BERG-LYONS, D; HUNTLEY, J; FIERER, N; OWENS, S. M; BETLEY, J; FRASER, L; BAUER, M; GORMLEY, N; GILBERT, J. A; SMITH, G; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community

analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, Aug. 2012.

CARMONA-CRUZ, S; OROZCO-COVARRUBIAS, L. The huma skin microbiome in selected cutaneous diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, March 2022.

CASSINI-VIEIRA, P; MOREIRA, C; SILVA, M; BARCELOS, L. S. Estimation of Wound Tissue Neutrophil and Macrophage Accumulation by Measuring Myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl-D-glucosaminidase (NAG) Activities. **Bio-protocol**, v. 5, n. 22, e1662, nov, 2015.

CHAMBERS, E. S; BYME, C. S; MORRISON, S. J; MURPHY, K. G; PRESTON, T; TEDFORD, C; PEREZ-GARCIA, I. FOUNTANA, S; CONTRERAS-SERRANO, J. I; HOLMES, E; REYNOLDS, C. J; ROBERTS, J. F; BOYTON, R. J; ARMANN, D. M; MCDONALD, J. A. K; MARCHESI, J. R; AKBAR. A. N; RIDDELL, N. E; WALLIS, G. A; FROST, G. S. Dietary supplementation with inulin-propionate eter or inulin improves insulin sensitivity in adult with overweight and obesity with effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. **Randomized Controlled Trial**, v. 68, n. 8, p. 1430-1438, Aug. 2019.

CHAMP, M. M. J. Physiological Aspects of Resistant Starch and in vivo Measurements. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 3, p. 749–755, 2004.

CHEN, K; CHEN, H; FAAS, M. M; HAAN, B. J; LI, J; XIO, P; ZHANG, H; DIANA, J; VOS, P; SUN, J. Specific inulin-type fructan fibers protect against autoimmune diabetes by modulating gut immunity, barrier function, and microbiota homeostasis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 8, Aug. 2017.

CHRISTENSEN, L; VUHOLM, S; ROAGER, H. M; NIELSEN, D. S; KRYCH, L; KRIST, M; ASTRUP, A; HJORTH, M. F. Prevotella Abundance Predicts Weight Loss Success in Healthy, Overweight Adults Consuming a Whole-Grain Diet Ad Libitum: A Post Hoc Analysis of a 6-Wk Randomized Controlled Trial. **The Journal of Nutrition and Disease**, v.149, n. 12, p. 2174-2181, Dec. 2019.

CHUNG, W. S. F; MEIJERINK, M; ZEUNER, B; HOLK, J; LOUIS, P; MEYER, A. S; WELLS, J. M; FLINT, H. J; DUNCAN, S. H. Prebiotic potential of pectina and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, Oct. 2017.

CLARK, R. A. F. Casics of Cutaneous Wound Repair. **The Journal od Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 19, n. 8, p. 693-706, 1993.

CLAUSEN, T. D; MATHIESEN, E. R; HANSEN, T; PEDERSEN, O; JENSEN, D. M; LAUEBORG, J; DAMM, P. High Prevalence of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes in Adult Offspring of Women With Gestational Diabetes Mellitus or Type 1 Diabetes: The role of intrauterine hyperglycemia. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 340–346, 1 fev. 2008.

CONNELLY, L; PALACIOS-CALLENDER, M; AEIXA, C; MONCADA, S; HOBBS, A. J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **Journal of imunnology**, v. 15, n. 166, p. 3873-3881, Mar. 2001.

COBAS R, RODACKI M, GIACAGLIA L, CALLIARI L, NORONHA R, VALERIO C, CUSTÓDIO J, SANTOS R, ZAJDENVERG L, GABBAY G, BERTOLUCI M. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, (2022).

CRACIUN, C. I; NEAG, M. A; CATINEAN, A; MITRE, A. O; RUSU, A; BALA, C; ROMAN, G; BUZOIANU, A. D; MUNTEAN, D. M; CRACIUN, A. E. The relationships between gut microbiota and diabetes mellitus, and treatments for diabetes mellitus. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 308, Feb. 2022.

DAMM, P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 104, n. Supplement, p. S25–S26, mar. 2009.

DANEMAN, D. TYPE 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, p. 847-858, 2006.

DAVANI-DAVARI, D; NEGAHDARIPOUR, M; KARIMZADEH, I; SEIFAN, M; MOHKAM, M; MASOUMI, S. J; BERENJIAN, A; GHASEMI, Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 9 mar. 2019.

DELANGHE, L; SPACOVA, I; MALDEREN, J. V; OERLEMANS, E; CLAES, I; LEBEER, S. The role of lactobacilli in inhibiting skin pathogens. **Biochemical Society Transactions**, v. 49 n. 2, p. 617-627, 2021.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2449–2462, jun. 2018.

DORAN, A. C.; YURDAGUL, A.; TABAS, I. Efferocytosis in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 4, p. 254–267, abr. 2020.

DUH, E. J.; SUN, J. K.; STITT, A. W. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. **JCI Insight**, v. 2, n. 14, p. e93751, 20 jul. 2017.

EMANUELLI, C; SALLIS, M. B; PINNA, A; STACCA, T; MILLIA, A. F; SPANO, A; CHAO, J; CHAO, L; SCIOLA, L; MADESSU. Prevention of Diabetes-Induced Microangiopathy by Human Tissue Kallikrein Gene Transfer. **Circulation**, v. 106, p. 993-999, 2002.

ESTEVIÃO, L. R. M; CASSINI-VIEIRA, P; LEITE, A. G. B; BULHÕES, A. A. V. C; BARCELOS, L. S; EVÊNICO-NETO, J. Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **Bio Protocol**, v. 9, n. 13, e3285, Jul. 2019.

EVERARD, A; BELZER, C; GEURTS, L; OUWERKERK, J. P; DRUART, C; BINDELS, L. B; GUIOT, Y; DERRIEN, M; MUCCIOLI, G. G; DELZENNE, N. M; VOS, W. M; CANI, P. D. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal apithelium controls diet-induced obesity. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n.22, p. 9066-9071, May. 2013.

FELDMAN, E. L; CALLAGHAN, B. C; POP-BUSUI, R; ZOCHODNE, D. W; WRIGHT, D. E; BENNETT, D. L; BRIL, V; ARBOR, A. Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 42, June 2020.

FERNANDES, L. DE F.; PIMENTA, F. C.; FERNANDES, F. DE F. Isolamento e perfil de suscetibilidade de bactérias de pé diabético e úlcera de estase venosa de pacientes admitidos no pronto-socorro do principal hospital universitário do estado de Goiás, Brasil. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 3, p. 211–217, set. 2007.

FRANK, C.; BAYOUMI, I.; WESTENDORP, C. Approach to infected skin ulcers. **The College of Family Physicians of Canada**, v. 51, n. 10, p. 1352 - 1359, Oct. 2005.

FRANKLIN, M. J; CHANG, C; AKIYAMA, T; BOTHNER, B. New Technologies for Studying Biofilms. **Microbiology Spectrum Journal**, v. 3, n. 4, 2015.

FRIEDRICH, A. D; PAZ, M. L; LEONI, J; MAGLIO, D. H. G. Message in a Bottle: Dialog between Intestine and Skin Modulated by Probiotics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1067, 9 jun. 2017.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560–582, set. 2015.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of Thrombus Formation. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 9, p. 938–949, 28 ago. 2008.

GIANINO, E.; MILLER, C.; GILMORE, J. Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. **Bioengineering**, v. 5, n. 3, p. 51, 26 jun. 2018.

GIBSON, G. R; SCOTT, K. P; RASTALL, R. A; TUOHY, K. M; HOTCHKISS, A; DUBERT-FERRANDON, A; GAREAU, M; MURPHY, E. F; SAULNIER, D; LOH, G; MACFARLANE, S; DELZENNE, N; RINGEL, Y; KOZIANOWKI, G; DICKMANN, R; LENOIR-WIJNKOOP, I; WALKER, C; BUDDINGTON, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, maio 2010.

GOLDUFSKY, J; WOOD, S. J; JAYARAMAN, V; MAJDOBEH, O; CHEN, L; QIN, S; ZHANG, C DIPIETRO, L. A; SHAFIKHANI, S. H. Pseudomonas aeruginosa uses T3SS to inhibit diabetic wound healing: P. aeruginosa inhibits wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 4, p. 557–564, jul. 2015.

GONG, T; LIU, L; JIANG, W; ZHOU, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, fev. 2020.

GOPHNA, U; KONIKOFF, T; NIELSEN, H. B. Oscillospira and related bacteria - From metagenomic species to metabolic features. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 835 - 841, Mar. 2017.

GRICE, E. A; KONG, H. H; CONLAN, S; DEMING, C. B; DAVIS, J; YOUNG, A. C; NLSC, C. S. P; BOFFARD, G. G; BLAKESLEY, R; MURRAY, P. R; GREEN, E. D; TURNER, M. L; SEGRE, J. A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. **Science**, v. 324, n. 5931, p. 1190-1192, May, 2009.

GRICE, E. A; KONG, H. H; RENAUD, G; YOUNG, A. C; NISC, C. S. P; BOUFFARD, G. G; BLAKESLEY, R. W; WOLFSBERG, T. G; TURNER, M. L; SEGRE, J. A. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v. 18, p. 1043-1050 2008.

GRICE, E. A; SEGRE. The skin microbiome. **Nature Review Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 24-253, 2011.

GUÉNICHÉ, A; DAVID, P; DAVID, P; PHILIPPE, B; STEPHANIE, B; ELIF, B; ISABELLE, C. H. Probiotics for photoprotection. **Dermato-Endocrinology**, v. 1, n. 5, p. 275–279, set. 2009.

HAND, T. W. Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 12, p. 831–843, dez. 2016.

HAPO, Study Cooperative Research Group. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes: The HAPO Study Cooperative Research Group. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 63, n. 10, p. 615–616, out. 2008.

HERNÁNDEZ, M. A. G; CANFORA, E. F; JACKAN, J. W. E; BLAAK, E. B. The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1943, aug. 2019.

HESKETH, M; SAHIN, K. B; WEST, Z. E; MURRAY, R. Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1545, 17 jul. 2017.

HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and probiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut microbes**, v. 8, n. 2, p. 172-184, Feb. 2017.

HOPE, S. V; WIENAND-BARNETT; S. W; SHEPHERD, M; KING, S. M; FOX, C; KHUNTI, K; ORAM, R. A; KNIGHT, B. A; HATTERSLEY, A. T; JONES, A. G; SHIELDS, B. M. Practical Classification Guidelines for Diabetes in patients treated with insulin: a cross-sectional study of the accuracy of diabetes diagnosis. **British Journal of General Practice**, v. 66, n. 646, p. e315–e322, maio 2016.

HUNT, A. M. A; GIBSON, J. A; LARRIVEE, A. L; O'REILLY, S; NVITSKAYA, S; BUSIK, J. V; WALTERS, C. M. A bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* wound model reveals increased mortality of type 1 diabetic mice to biofilm infection. **Journal of Wound Care**, v. 26, n. Sup7, p. S24–S33, jul. 2017-1.

HUNT, A. M. A; GIBSON, J. A; LARRIVEE, A. L; O'REILLY, S; NVITSKAYA, S; BUSIK, J. V; WALTERS, C. M. Come to the Light Side: In Vivo Monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections in Chronic Wounds in a Diabetic Hairless Murine Model. **Journal of Visualized Experiments**, n. 128, p. 55991, 10 out. 2017-2.

HUTKINS, R. W; KRUMBECK, J. A; BINDELS, L. B; CANI, P. D; FAHEY JR, G; GOH, Y. J; HAMAKER, B; MARTENS, E. C; MILLS, D. A; RASTAL, R. A; VAUGHAN, E; SANDERS, M. E. Prebiotics: why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 1–7, fev. 2016.

JENKINS, D. J; BLOOM, S. R; ALBUQUERQUE, R. H; LLEEDS, A. R; SARSON, D. L; METZ, G. L; ALBERT, K. G. M. M. Pectin and complications after gastric surgery: normalisation of postprandial glucose and endocrine responses. **Gut**, v. 21, n. 7, p. 574–579, 1 jul. 1980.

JENKINS, D. J; WOLEVER, T. M; JENKIN, A; BRIGHENTI, F; VUKSAN, V; RAO, A. V; VEZINA, C; Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 141-147, 1991.

JL, J; SHU, D; ZHENG, M; WANG, J; LUO, C; WANG, Y; ZOU, X; LY, X; LIU, T; QU, H. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24838, jul. 2016.

JIAO, C; XIE, Y; YUN, H; LIANG, H; HE, C; JIANG, A; WU, Q; YANG, B. B. The effect of *Ganoderma lucidum* spore oil in early skin wound healing: interactions of skin microbiota and inflammation. **Aging**, v. 12, n. 14, p. 14125–14140, 21 jul. 2020.

JOHNSON, T; GÓMEZ, B. I; MCINTYRE, M. K; DUBICK, M. A; CHRISTY, R. J; NICHOLSON, S. E; BURMEISTER, D. M. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2699, 11 set. 2018.

JONES, R. E.; FOSTER, D. S.; LONGAKER, M. T. Management of Chronic Wounds. **JAMA Insights - Clinical Update**, n. 2018. p. 2, Sept. 2018.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S44–S51, 15 fev. 2017.

KABASHIMA, K; HONDA, T; GINHOUX, F; EGAWA, G. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, jan. 2019.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, V. 12, N. 4, P. 390-399, Aug. 2001.

KERTESZ, I. The Pectin Substances. **Interscience Publishers**, v. 41, n. 1, p. 54, 1951.

KIM, J. H; RUEGGER, P. R; LEBIG, E. G; SCHALKWYK, S. V; JASKE, D. R; HSIAO, S; BORMEMAN, J; MARTIN-GREEN, M. High levels of oxidative stress create a microenvironment that significantly decreases the diversity of the microbiota in diabetic chronic wounds and promote biofilm formation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 259, Jun. 2020.

KIMBALL, A; SCHALLER, M; JOSHI, A; DAVIS, F; DENDEKKER, A; BONIAKOWSKI, A; BERMICK, J; OBI, A; MOORE, B; HENKE, P. K; KUNKEL, S. L; GALLAGHER, Ly6C Hi Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes Mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 5, p. 1102–1114, maio 2018.

KIMURA, I; INOUE, D; HIRANO, K; TSUJIMOTO, G. The SCFA receptor GPR43 and Energy Metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 85, jun. 2014.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAI TOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina - Ribeirão Preto**, v. 43, n. 1, p. 3, 30 mar. 2010.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, jul. 2011.

KONIKOFF, T; GOPHNA, U. Oscillospira: a central, enigmatic component of the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 7, p. 523-524, 2016.

KONSTANTINOV, N. K. Respiratory failure in diabetic ketoacidosis. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 8, p. 1009, 2015.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, out. 2016.

LARA-ESPINOZA, C. et al. Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 942, 18 abr. 2018.

LEBEER, S; OERLEMANS, E. F. M. CLAES, I; HENKENS, T; DELANGHE, L; WUYTS, S; SPACOVA, I; BROEK, M. F. L, TUYAERTS, I; WITTOUCK, S; BOECK, I. D;

- ALLLONSIUS, C. N; IEKENS, F; LAMBERT, J. Selective targeting of skin pathobionts and inflammation with topically applied lactobacilli. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 2, 2022.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, fev. 2008.
- LEY, R. E; HAMADY, M; LOZUPONE, C; TURNBAUGH, P; RAMEY, R. R; BIRCHER, J. S; SCHLEGEL, M. L; TUCKER, T. A; SCHRENZEL, M. D; KNIGHT, R; GORDON, J. L. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v. 20, n. 320, p. 1647-1651, Jun. 2008.
- LIU, W; LUO, Z; ZHOU, J; SUN, B. Gut Microbiota and Antidiabetic Drugs: Perspectives of Personalizes Type 2 Diabetes Mellitus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. 853771, 2022.
- LOLOU, V.; PANAYIOTIDIS, M. I. Functional Role of Probiotics and Prebiotics on Skin Health and Disease. **Fermentation**, v. 5, n. 2, p. 41, 17 maio 2019.
- LOUIS, P; FLINT, H. Diversity metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. **Blackwell Publishing Ltd**, v. 294, p. 1-8, 2009.
- MA, X; TIAN, Y; SONG, Y; SHI, J; XU, J; XIONG, K; LI, J; XU, W; ZHAO, Y; SHUAI, J; CHEN, L; PIKUS, M. V; LENGNER, C; REN, F; XUE, L; YU, Z. Msi maintains quiescent state of hair follicle stem cells by directly repressing the Hh signaling pathway. **Journal Investigation Dermatology**, v. 137, n. 5, p. 1015-1024, 2017.
- MAAHS, D. M; WEST, N; S; LAWRENCE, J. M; MAYER-DAVIS, E. Epidemiology of Type 1 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 481–497, set. 2010.
- MACIA, L; TAN, J; VIEIRA, A. T; LEACH, K; STANLEY, D; LUONG, S; MARUYA, M; MCKENZIE, C. I; HIJIKATA, A; WONG, C; BINGE, L; THORBURN, A. N; CHAVALIER, N; ANG, C; MARINO, E; ROBERT, R; OFFERMANN, S; EIXEIRA, M. M; MOORE, R. J; FLAVELL, R. A; FAGARASAN, S; MACKAY, C. R. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nature**, v. 6, n. 6734, 2015.
- MANDAL, R. S; SAHA, S; DAS, S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, n. 13, p. 148-158, 2015.
- MANDERSON, K; PINART, M; TUOHY, K. M; GRACE, W. E; HOTCHKISS, A. T; WIDMER, W; YADHAY, M. P; GIBSON, G. R; RASTALL, R. A. In Vitro Determination of Prebiotic Properties of Oligosaccharides Derived from an Orange Juice Manufacturing By-Product Stream. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8383–8389, dez. 2005.
- MASLOWSKI, K. M; VIEIRA, A. T; NG, A; KRANICH, J; SIERRO, F; YU, D; SCHILTER, H. C; ROLPH, M. S; MACKAY, F; ARTIS, D; XAVIER, R. J; TEIXEIRA, M. M; MACKAY, C. R. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Letters**, v. 461, n. 29, Oct. 2009.
- MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C.; FARLEY, A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**, v. 27, n. 3, p. 35–42, 19 set. 2012.

MEIRA, D. A. Interação infecção, nutrição e imunidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 4, p. 315-319, 1995.

MICHALSKA, M.; WOLF, P. Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 15 set. 2015.

MINZANOVA, S. T; MIRONOV, V. F; ARKHIPOVA, D. M; KHABIBULLINA, A. V; MIRONOVA, L. G; ZAKIROVA, Y. M; MILYUKOV, V. A. Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. **Polymers**, v. 10, n. 12, p. 1407, 19 dez. 2018.

MIR, M; NAJABAT, M; A; BARAKULLAH, A; GULZAR, A; ARSHAD, M; FATIMA, ; ASAD, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 1–21, mar. 2018.

MONIAGA, C. S; OMINAGA, M; TAKAMORI, K. An Altered Skin and Gut Microbiota Are Involved in the Modulation of Itch in Atopic Dermatitis. **Cells**, v11, p. 3930, 2022.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 15 fev. 2017.

MOREIRA, C; CASSINI-VIEIRA, P; SILVA, M; BARCELOS, L. S; Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. **Bio Protocol**, v. 5, n. 22, Jan. 2015.

MOREIRA, C. F; CASINI-VIEIRA, P; CANESSO, M. C. C; FELIPETTO, M; HANFLEY, H; TEIXEIRA, M. M; NICOLI, J. R; MARTINS, F. S; BARCELOS, L. S. Lactobacillus rhamnosus CGMCC 1.3724 (LPR) Improves Skin Wound Healing and Reduces Scar Formation in Mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 709-719, 2021.

MUIZZUDDIN, N; MAHER, W; SULLIVAN, M; SCNITTGER, S; MAMMONE, T. Physiological effect of a probiotic on skin. **Journal of cosmetic Science**, v. 63, n. 6, p. 385-395, 2012.

NAGPAL, R; WANG, S; AHMADI, S; HAYES, J; GAGLIANO, J; SUBACHCHANDRABOSE, S KITZMAN, D. W; BECTON, T; READ, R; YADAY, H. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12649, dez. 2018.

NASCIMENTO, O. J. M. DO; PUPE, C. C. B.; CAVALCANTI, E. B. U. Diabetic neuropathy. **Revista Dor**, v. 17, 2016.

NORRIS, J. M.; JOHNSON, R. K.; STENE, L. C. Type 1 diabetes—early life origins and changing epidemiology. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 226–238, mar. 2020.

ONG, J. S; TAYLOR, T. D; YOUNG, C. C; KHOO, B. Y; SASIDHARAN, S; CHOI, S. B; OHNO, H; LIONG, M. T. Lactobacillus plantarum USM8613 Aids in Wound Healing and Suppresses Staphylococcus aureus Infection at Wound Sites. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 125-137, 2019.

OROSCO, S. S; GUIMARÃES, N. O; PERBELINI, A. G. O; LIMA, J. V. H; NEVES, M. L; SANTANA, R. S; SILVA, T. C. M. F. Characterization of patients with diabetic feet submitted

to amputation of inferior members in a public hospital. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 27, n. 2, p. 25-31, Ago. 2019.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, fev. 2018.

PARKS, D. H; TYSON, G. W; HUGENHOLTZ, P; BEIKO, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, n. 30, v. 21, p.3123 - 3124, Jul. 2014.

PELUCCHI, C; CHATENOU, L; TURATI, F; GALEONE, C; MOJA, L; BACH, J. F; VECCHIA, C. L. Probiotics Supplementation During Pregnancy or Infancy for the Prevention of Atopic Dermatitis: A Meta-analysis. **Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 402–414, maio 2012.

PETERSON, A; NAIR, L. S. Hair Follicle Stem Cells for Tissue Regeneration. **Tissue Engineering**, v. 28, n. 4, p. 695-706, Aug, 2022.

PICCOLI, G. B; GRASSI, G; CABIDDU, G; NAZHA, M; ROGGERO, S; CAPIZZI, I; PASCALE, A. D; PRIOLA, A. M; VICO, C. D. MAXIA, S; LOI, V; ASUNIS, A. M; PANI, A; VELTRI, A. Diabetic Kidney Disease: A Syndrome Rather Than a Single Disease. **The Review of Diabetic Studies**, v. 12, n. 1-2, p. 87-109, 2015.

PLOVIER, H; EVERARD, A; DRUART, C; DEPOMMIER, C; HUL, M. V; CHILOUX, J; OTTMAN, N; DUPARC, T; LICHTENSTEINS, L; MYRIDAKIS, A; DELZENNE, N. M; KLIEVINK, J; BHATTACHARJEE, A; ARK, K. C. H. V. D; AALVINK, S; MARTINEZ, L. O; DUMAS, M. E; MAITER, D; LOUMAYE, A; HERMANS, M. P; THISSEN, J. P; BELZER, C; VOS, W. M; CANI, P. D. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2017.

SRINIVASAN, G; MUTHUSAMY, S; RAVEENDRAN, V; JOSEPH, N. M; EASOW, J. M. Unforeseeable presentation of Chryseobacterium indologenes infection in a paediatric patient. **Bmc Research Notes**, v. 212, 2016.

VELRI, A. Diabetic Kidney Disease: A Syndrome Rather Than a Single Disease. **The Review of Diabetic Studies**, v. 12, n. 1–2, p. 87–109, 2015.

PLOVIER, H; EVERARD, A; DRUART, C; DEPOMMIER, C; HUL, M. V; GEURTS, L; CHILLOUX, J; OTTMAN, N; DUPARARC, T; LICHTENSTEIN, L; MYRIDAKIS, A; DELZENE, N. M; KLIEVINK, J; BHATTACHARJEE, A; ARK, K. C. H. V. D; AALVINK, S; MARTINEZ, L. O; DUMAS, M. E; MAITER, D; LOUMAYE, A; HERMANS, M. P; THISSEN, J. P; BELZER, C; VOS, W. M; CANI, P. D. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the 2 pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature medicine**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2017.

POPOV, S. V.; OVODOV, YU. S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 823–835, jul. 2013.

POUL, E. L; LOISON, C; STRUYF, S; SPRINGAEL, J. Y; LANNOY, V; DECOBECQ, M. E; BRESILLON, S; DUPRIEZ, V; VASSART, G; DAMME, J. V; PARMENTIER, M; DETHEUX, M. Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, Jul. 2003.

POZZILLI, P.; PIERALICE, S. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Current Status and New Horizons. **Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 147, 2018.

- PRADO, S. B. R; FERREIRA, G. F; HARAZONG, Y; SHIGA, T. M; RAZ, A; CARPITA, N. C; FABI, J. P. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16564, dez. 2017.
- PRECUP, G; VODNAR, D. C. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. **The British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 2, p. 131-140, 2019.
- PRYDE, S. E; DUNCAN, S. H; HOLD, G. L; STEWART, C. S; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p. 133–139, dez. 2002.
- PRIYADARSHINI, M; KOTLO, K. U; DUDEKA, P. K; LAYDEN, B. T. Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 3, p. 1091-1115, 2019.
- QUAST, C; PRUESSE, E; YILMAZ, P; GERKEN, J; SCHWEER, T; YARZ, P; PEPLIES, J; GLOCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, Nov. 2013.
- RAMAKANT, P; VERMA, A. K; MISRA, R; PRASAD, K. N; CHAND, G; MISHRA, A; AGARWAL, G; AGARWAL, A; MISHRA, S. K. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? **Diabetologia**, v. 54, n. 1, p. 58–64, jan. 2011.
- REIS, J. S; VELOSO, C A; MATTOS, R. T; PURISH, S; NOGEIRA-MACHADO, J. A. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, out. 2008.
- RIOS-COVIAN, D; SANCHEZ, B; SALLAZAR, N; MARTINEZ, N; REDRUELLO, B; GUEIMONDE, M; REVES-GAVILAN, C. G. Different metabolic features of *Bacteroides fragilis* growing in the presence of glucose and exopolysaccharides of bifidobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 825, 2015.
- RIZZATI, G; LOPETUSO, L. R; GIBININO, G; BINDA, C; GASBARRINI. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, p 1-7, 2017.
- ROBSON, M; KUCUKCELEBI, A; CARP, S. S.; HAYWARD, P. G; HUI, P. S; COWAN, W. T; KO, F; COOPER, D. M. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on wound contraction. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 41-46, 1994.
- RODRIGUES, M; KOSARIC, N; BONHAM, C. A; GURTNER, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.
- SAEEDI, P; PETERSOHN, I; SALPEA, P; MALANDA, B; KARURANGA, S; UNWIN, N; COLAGIURI, S; GUARIGUATA, L; OTALA, A. A; OGURTSOVA, K; SHAW, J. E. WILLIAMS, D. B. R; IF D. A. C. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, nov. 2019.
- SALCIDO, R. What is Bioburden? The Link to Chronic Wounds. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 20, n. 7, p. 368–369, jul. 2007.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370–377, nov. 2013.

SARANTEAS, T; OTOS, N; LOLIS, E; STRANOMITI, J; MOUROUZIS, C; CHANTZI, C; TESEROMATIS, C. Mechanisms of ketamine action on lipid metabolism in rats. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 22, n. 3, p. 222-226, 2005.

SAÚDE, Ministério da. Manual do pé diabético. Brasília, DF, **Ministério da Saúde**, 2016. Acesso em 05/07/2023, às 22:29. Link: http://www.as.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/06/manual_do_pe_diabetico.pdf

SAVASTANO, D. M; HODGE, R. J; NUNEZ, D. J; WALKER, A; KAPIKIAN, R. Effect of two dietary fibers on satiety and glycemic parameters: a randomized, double-blind, placebo-controlled, exploratory study. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 45, dez. 2014.

SAWZDARGO, M; GEORGE, S. R; NGUYEN, T; XU, S; KOLAKOWSKI, L. F; O'DOWD, B. F. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1 **Biochem Biophys Commun**, v. 239, n. 2, p. 543-547, Oct. 1997.

SCALES, B. S.; HUFFNAGLE, G. B. The microbiome in wound repair and tissue fibrosis: Microbiome, wounds, and fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 323–331, jan. 2013.

SCALISE, A; BIANCHI, A; TARTAGLIONE, C; BOLLETTA, E; PIERANGEL, M; TORRESETTI, M; MARAZZI, M; BENEDETTO, D. G. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 28, n. 3–4, p. 151–159, set. 2015.

SCHLOSS, P. D; WESTCOTT, S. L; RYABIN, T; HALL, J. R; HARTMANN, M; HOLLISTER, E. B; LESNIEWSKI, R. A; OAKLEY, B. B; PARKS, D. H; ROBINSON, C. J; SAHL, J. W; STRES, B; THALLINGER, G. G; HORN, D. J. V; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 537–7541, Dec. 2009.

SCHOFIELD, J. D; LIU, Y; RAO-BALAKRISHNA, P; MALIK, R. A; SORAN, H. Diabetes Dyslipidemia. **Diabetes Therapy**, v. 7, n. 2, p. 203–219, Jun. 2016.

SCHWARTZ, S. E; LEVINE, R. A; WEINSTOCK, R. S; PETOKAS, S; MILLS, C. A; THOMAS, F. D. Sustained pectin ingestion: effect on gastric emptying and glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetic patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, p. 1413-1417, 1988.

SERRA, R; GRANDE, R; BUTRICO, L; ROSSI, A; SETTIMIO, U. F; CAROLEO, B; AMARO, B; GALLELI, L; FRANCISCIS, S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 5, p. 605–613, 4 maio 2015.

SHIN, N. R; WHON, T. W; BAE, J. W. Proteobacteria: microbial signature of disbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496-503, 2015.

SIDDIQUI, A. R.; BERNSTEIN, J. M. Chronic wound infection: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 5, p. 519–526, set. 2010.

SILVA, V. K.; MORITA, V. S.; BOLELI, I. C. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com pectina na ração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 1017–1026, ago. 2012.

SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1460–1465, 15 nov. 2003.

SONEJA, A; DREWS, M; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108-119, 2005.

SOUZA, C. G; LIMA, H. B; SILVA, M. J. S; PASCOAL, L. A. F. Fibra solúvel no metabolismo energético de ruminantes. **Pubvet**, v. 8, n. 22, nov. 2014.

SPROCKETT, D. D.; AMMONS, C. G.; TUTTLE, M. S. Use of 16S rRNA sequencing and quantitative PCR to correlate venous leg ulcer bacterial bioburden dynamics with wound expansion, antibiotic therapy, and healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 5, p. 765–771, set. 2015.

SRINIVASAN, G; MUTHUSAMY, S; RAVEENDRAN, V; JOSEPH, N. M; EASOW, J; M. Unforeseeable presentation of Chryseobacterium indologenes infection in a paediatric patient. **Bio Med Central**, v. 9, n. 212, 2016.

SWANSON, P. A; KUMAR, A; SAMARIN, S; VIJAY-KUMAR, M; KUNDU, K; MURTHY, N; HANSEN, J; NUSRAT, A; NEISH, A. S. Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8803–8808, May 2011.

TATARA, A. M; SHAH, S. R; LIVINGSTON, C. E; MIKOS, A. G. Infected Animal Models for Tissue Engineering. **Methods**, v. 84, p.17-24, 2015.

TAYLOR, B. C; LEJZEROWICZ, F; POIREL, M; SHAFFER, J. P; JIANG, L; AKSENOV, A; LITWIN, N; HUMPHREY, G; MARTINO, C; MILLER-MONTGOMERY, S; DORRESTEIN, P. C; VEIGA, P; SONG, S. J; MCDONALD, D; DERRIEN, M; KNIGHT, R. Consumption of Fermented Foods Is Associated with Systematic Differences in the Gut Microbiome and Metabolome. **Microbiology Resource Announcements**, v. 5, n. 2, 2020.

TORKOVA, A. A; LISITSKAYA, K. V; FILIMONOV, I. S; GLAZUNOVA, O. A; KACHALOVA, G; S; GOLUBEY, V. N; FEDOROVA, T. V. Physicochemical and functional properties of Cucurbita maxima pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0204261, 20 Set. 2018.

VALLE, K. Z. M; ACUNÃ, R. A. S; ARANA, J. V. R; LOBO, N; RODRIGUEZ, C; CUEVAS-GONZALES, J. C; TOVAR-CARRILO, K. L. T. Natural Film Baased on Pectin and Allantoin for ound Healing: Obtaining, Characterization, and Rat Model. **Biomed Research International**, v. 2020, Oct. 2020.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 11, p. 692–704, nov. 2015.

VIEIRA, P. C. Avaliação dos mecanismos associados ao efeito terapêutico de dieta rica em fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos – papel do receptor GPR43 e da interleucina (IL)-18 - Tese, **UFMG**, 2018.

- VOGT, J. A; ISHII-SCHRADE, K. B; PENCHARZ, P. B; JONES, P. J. H; WOLEVER, T. M. S. L-Rhamnose and Lactulose Decrease Serum Triacylglycerols and Their Rates of Synthesis, but Do Not Affect Serum Cholesterol Concentrations in Men. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2160-2166, Aug. 2006.
- WEI, Q; ZHANG, Z; LUO, J; KONG, J; DING, Y; CHEN, Y; WANG, K. Insulin treatment enhances pseudomonas aeruginosa biofilm formation by increasing intracellular cyclic di-GMP levels, leading to chronic wound infection and delayed wound healing. **American Journal of Translation Research**, v. 7, n. 199, Jun. 2022.
- WEISBERG, S. P; MCCANN, D; DESAI, M; ROSENBAUN, M; LEIBEL, R; L; FERRANTE, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, N. 12, Dec. 2003.
- WIEDENHEFT, B.; BONDY-DENOMY, J. CRISPR control of virulence in Pseudomonas aeruginosa. **Cell Research**, v. 27, n. 2, p. 163–164, fev. 2017.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, mar. 2006.
- XU, Z; HSIA, H. C. The Impact of Microbial Communities on Wound Healing. **Annals of Plastic Surgery**, v. 00, n. 00, 2018.
- YANG, J; LI, Y; WEN, Z; LIU, W; MENG, L; HUANG, H. Oscillospira - a candidate for the next-generations probiotics. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, Oct. 2021.
- YU, S. M. W; BONVENTRE, J. V. Acute kidney injury and progression of diabetic kidney disease. **Advances in Kidney Disease and Health**, v. 25, n. 2, p. 166-180, March, 2018.
- YUAN, Y; ZHOU, J; ZHENG, Y; XU, Z; LI, Y; ZHOU, S; ZHANG, C. Beneficial effects of polysaccharide-rich extracts from Apocynum venetum leaves on hypoglycemic and gut microbiota in type 2 diabetic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, 2020.
- ZAINE, N. H; BURNS, J; VICARETTI, M; FLETCHER, J. P; BEGG, L; HITOS, K. Characteristics of diabetic foot ulcers in Western Sydney, Australia. **Journal of Foot and Ankle Research**, v. 7, n. 39, Sep. 2014.
- ZEEUWEN, P. L; BOEKHORST, J; BOGAARD, E; H. V. D; KONING, H. D; KERKHOF, P. M. V; SAULNIER, D. M; SWAM, I. I. V; HIJUM, S. A. V; KLEEREBEZEM, M; SCHALKWIJK, J; TIMMERMAN, H. M. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. **Genome Biology**, v. 13, n. 11, p. R101, 2012.
- ZHANG, Z; SHI, L; PANG, W; LIU, W; LI, J; WAG, H; SHI, G. Dietary Fiber Intake Regulates Intestinal Microflora and Inhibits Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation in a Mouse Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0147778, Fev. 2016.
- ZHANG, Y; LU, S; YANG, Y; WANG, Z; WANG, B; ZHANG, B; YU, J; PAN, M; ZHAO, J; GUO, S; CHENG, J; CHEN, X; HOR, K. The diversity of gut microbiota in type 2 diabetes with without cognitive impairment. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 3, p. 589-601, Mar. 2020.
- ZHAO, G; HOCHWALT, P. C; USUI, M. L; UNDERWOOD, R. A; SINGH, P. K; JAMES, G. A; STEWART, P. S; FLECKMAN, P; OLERUD, J. E. Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with Pseudomonas aeruginosa biofilm challenge: a model for the study of

chronic wounds: A biofilm-challenged chronic wound model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 18, n. 5, p. 467–477, Ago. 2010.

ZHAO, R; LIANG, H; CLARKE, E; JACKSON, C; XUE, M. Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2085, Dez. 2016.