

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

CHRISTIANE RABELO COUTINHO

AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NA PELE DE MEMBRO POSTERIOR
ISQUÊMICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1

BELO HORIZONTE

2015

CHRISTIANE RABELO COUTINHO

**AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NA PELE DE MEMBRO POSTERIOR
ISQUÊMICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Simone Odília Antunes
Fernandes

Coorientadora: Dra. Lucíola da Silva Barcelos

Coorientador: Dr. Valbert Nascimento Cardoso

BELO HORIZONTE

2015

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais por todo apoio incondicional de uma vida inteira. Graças a toda educação, amor e exemplo de vocês eu consegui chegar até aqui. Pai, você é o melhor exemplo de herói que tenho e que jamais terei na minha vida, pois você sempre acredita que os sonhos são possíveis e por isso sempre os alcança. Mãe, você me mostra todos os dias como uma mulher pode ser forte e leve ao mesmo tempo! Obrigada por sempre acompanhar meus passos e por sempre me dizer as coisas certas na hora certa!

Mila, minha querida irmã, obrigada por ser essa amiga e confidente que sempre está por perto para me proteger e aconselhar! Se eu pudesse escolher mil vezes uma irmã, as mil seria você! Mesmo você não estando aqui no dia sei que você está sempre comigo em pensamento e de coração.

Ao meu querido irmão Rodrigo, que entrou na minha vida só para trazer alegria e amor.

À Professora Simone, minha orientadora, pela oportunidade de continuar meus estudos e por me abrir as portas da UFMG e do Laboratório de Radioisótopos. Obrigada pelas orientações, sugestões e por acreditar no meu potencial!

Ao Professor Valbert Cardoso, meu coorientador, que me ajudou na elaboração e acompanhamento desse trabalho, sempre com brilhantes sugestões.

À Professora Lucíola Barcelos, minha coorientadora, por me aceitar como aluna, pela orientação e por gentilmente abrir as portas do Laboratório de Angiogênese. E principalmente, pelo exemplo profissional.

Para Leandro Ceotto, deveria escrever um agradecimento inteiro! Presente em TODAS as etapas desse trabalho. Obrigada pela paciência em me apresentar o mundo científico mesmo quando eu nem sabia o que era o Prisma! Obrigada pelos ensinamentos técnicos, pelo incentivo e por nunca me deixar desistir mesmo quando as coisas pareciam muito difíceis. Agradeço pelas risadas, pelo apoio emocional e até pelas broncas. Foi sem dúvida o responsável por essa conquista! Meus sinceros agradecimentos!

Ao Puebla pela ajuda e conselhos e por me mostrar que as coisas não são tão complicadas quanto parecem. A todos os colegas do Laboratório de Angiogênese que sempre me ajudaram! Em especial a Camila, Fabrício, Leandro Barbosa, Jousie e Brígida! Muito obrigada!

A Lívia Moura pelas boas conversas e boa vontade sempre em me ensinar! A Patrícia Barros, a Lays, ao Leonardo, ao Farmacêutico Vanderli Pacheco e a todos os colegas do Laboratório de Radioisótopos!

A Fernanda Silva pela inúmeras tentativas de realização do Western Blot.

Dra. Viviane Santuari Parisotto Marino e a Radiofarmacêutica Isabela Ribeiro, do setor de Medicina Nuclear do Hospital Madre Teresa, pelo fornecimento do ^{99m}Tc para a realização dos experimentos.

As amigas e colegas de trabalho do Laboratório Coopeder-MG! Nanda, Dantas e Norma pelos desabafos diários! A Elcione por sempre fazer o possível e impossível para possibilitar a realização do meu mestrado!

As primas-irmãs Luiza e Danielle Coutinho que serviram de inspiração para cursar o Mestrado! Ao meu mais novo primo Paulo pela valiosa discussão e incentivo.

Ao Professor Vicente Toledo, coordenador do Programa, pela atenção e por sempre apresentar soluções para as dificuldades.

A Ângela e ao Silas, da secretaria do Programa pela eficiência!

As Rabelas e aos Coutinho que sempre estão presentes!

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho! Eu só posso agradecer de ter pessoas tão especiais na minha vida! Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK - da expressão inglesa *Ammonium-Chloride-Potassium* (Amonio Cloreto de Potássio)

ADA - da expressão inglesa *American Diabetes Association* (Associação Americana do Diabetes)

AGEs - Produtos de Glicação Avançada

ATP- adenosina trifosfato

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AX- Aloxano

β - Beta

BB - da expressão inglesa *Bio-breeding* (Reprodução Biológica)

CEBIO - Centro de bioterismo

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG

CI - Claudicação Intermitente

CCL2/ MCP1 - Proteína Quimiotática de Monócitos 1

CXCL1 - Quimiocina motivo CXC ligante 1

DAC - Doença Arterial Coronariana

DAP - Doença Arterial Periférica

DCCT - da expressão inglesa *Diabetes Control and Complication Trial* (Controle do Diabetes e Triagem das suas Complicações)

DM - diabetes *mellitus*

DM 1 - diabetes *mellitus* Tipo1

DM 2 - diabetes *mellitus* Tipo 2

DMSO - Dimetil sulfóxido

EASD - da expressão inglesa *European Association for the Study of Diabetes* (Associação Europeia para o estudo do Diabetes)

ECD - Etilenodicisteínato de dietila

EDTA - da expressão inglesa *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra acético)

EPM - Erro padrão da média

FDA - Food and Drug Administration

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

G-CSF - Fator Estimulador da Colônia de Granulócitos

GJ - Glicemia de jejum

H&E - Hematoxilina e Eosina

IA - Isquemia Aguda

Hb1a - Hemoglobina glicada 1a

ICC/C - Isquemia Crônica (Crítica)

HIF-1 α - Fator Induzido pela Hipóxia 1 alfa

IDF - da expressão inglesa *International Diabetes Federation* (Federação Internacional do Diabetes)

HMPAO - hexametilpropilenoamino oxima

¹¹¹In - Índio-111

keV - Kilo-elétron-volt

LPDI - da expressão inglesa *Laser Doppler Perfusion Imaging* (Imagem de Perfusão por Laser Doppler)

M - Molar (Mol/Litro)

mg/kg - miligramas por quilo

μ Ci - micro Curie

μ L - Microlitros

MBq - Megabequerel

MMP- Metaloproteases

MN - Medicina Nuclear

⁹⁹Mo - Molibidênio-99

MPO – Mieloperoxidase

Na^{99m}TcO₄ - Pertecnetato de Sódio

NaCl - Cloreto de Sódio

NAG - N-acetil-β-D-glicosaminidase

Nm - Nanômetro

NO - Óxido Nítrico

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B

NGSP - da expressão inglesa *National Glycohemoglobin Standardization Program* (Programa Nacional de Padronização da Glicohemoglobina)

NOD - da expressão inglesa *non-obese diabetic* (diabéticos não obesos)

OAF - Oclusão da Artéria Femoral

PARP - poli-ADP-ribose-polimerase

PBS - Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina)

PKC - Proteína Quinase C

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

p/v - peso sobre volume

Rpm - Rotações por minuto

ROI - Regiões de Interesse

ROS - espécies reativas de oxigênio

STZ - Estreptozotocina

T_{1/2} - Tempo de meia vida

^{99m}Tc - Tecnécio-99 meta-estável

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TTOG - teste de tolerância oral e glicose

²³⁵U - Urânio-235

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

%DI/g - Porcentagem de dose injetada por grama

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é considerado uma pandemia e é caracterizado pelo alto risco de desenvolvimento de complicações vasculares, dentre elas a Doença Arterial Periférica (DAP). A DAP é de duas a quatro vezes mais comum em pacientes diabéticos do que em não diabéticos e causa uma redução do fluxo sanguíneo nos membros inferiores (isquemia). A isquemia desencadeia uma resposta vascular e inflamatória que pode levar ao desenvolvimento das feridas diabéticas isquêmicas, e que podem evoluir para necrose e amputação do membro inferior. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inflamatória na pele de membro posterior após isquemia em modelo de diabetes Tipo 1. Foram utilizados camundongos Balb\C de 6 semanas de idade que foram divididos em dois grupos: diabéticos (STZ) e não diabéticos (Controle). A indução do diabetes ocorreu por injeções de STZ 50mg/kg/dia por cinco dias consecutivos e a isquemia do membro posterior foi induzida pela oclusão unilateral da artéria femoral (OAF). A confirmação da isquemia foi feita pela imagem de perfusão por Laser Doppler e as análises foram realizadas nos dias 0, 1, 3 e 7 após a OAF. Para avaliar a inflamação fez-se a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico, e na pele, analisou-se o infiltrado de neutrófilos e macrófagos pelas dosagens de MPO e NAG no membro isquêmico e no contralateral, bem como as principais quimiocinas recrutadoras dessas células, CXCL1 e CCL2, respectivamente. Cortes histopatológicos corados por H&E e a dosagem de VEGF também foram investigados. O sangue total foi retirado do plexo braquial e em seguida os leucócitos foram separados e marcados com o ^{99m}Tc -ECD. Posteriormente, os ^{99m}Tc -ECD-leucócitos foram injetados na veia da cauda dos animais para realização de imagens cintilográficas. Os resultados mostraram que a isquemia manteve-se durante todo o período experimental. No sangue periférico, o grupo diabético apresentou menor número de leucócitos no 3º dia após a OAF ($p < 0,001$) se comparado ao controle. O escore inflamatório mostrou que na pele há aumento do infiltrado no grupo controle no 3º dia após a OAF e no grupo diabético ocorre no 1º dia após a OAF, sendo que o grupo controle apresentou maior concentração de neutrófilos nos dias 3 ($p < 0,001$) e 7 após a OAF ($p < 0,001$) e o grupo diabético apresentou maior concentração de macrófagos nos dias 0 ($p < 0,01$) e 3 ($p < 0,001$) após a OAF. Ao avaliar a concentração de VEGF, o grupo diabético apresentou uma menor concentração em relação ao controle nos dias 1 ($p < 0,001$), 3 ($p < 0,01$) e 7 ($p < 0,01$) após a OAF. Nas imagens cintilográficas não houve diferença entre os grupos. Novos resultados ainda serão necessários para a avaliação do emprego de leucócitos radiomarcados na identificação precoce de possíveis alterações na pele.

Palavras-chave: inflamação; diabetes *mellitus*; doença arterial periférica; isquemia; leucócitos; leucócitos radiomarcados.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is considered a pandemic and is characterized by a high risk of developing vascular complications, among them Peripheral Arterial Disease (PAD). PAD is two to four times more common in diabetics than in non-diabetics and causes a reduction of blood flow in lower limbs (ischemia). The ischemia triggers a vascular and inflammatory response that can lead to the development of diabetic ischemic wounds, which can progress to necrosis and amputation of lower limbs. Thus, we aimed to evaluate the inflammatory activity in the skin of hind limbs after ischemia in diabetic mice. 6 weeks old balb/c mice were divided in two groups: diabetic (STZ) and nondiabetic (Control). Diabetes was induced by 50mg/kg/day of streptozotocin for five days. Hindlimb ischemia was induced by permanent left femoral artery occlusion (FAO). Confirmation of ischemia was done by laser Doppler perfusion imaging and analyzes were carried out 0, 1, 3 and 7 days after the FAO. To assess skin inflammation, we analyzed total and differential leukocyte count in peripheral blood, and in skin we analyzed macrophage and neutrophil infiltration by evaluating NAG and MPO activities, respectively, in ischemic and contralateral non-ischemic skin of hindlimbs. Also evaluated are the main recruiting chemokines these cells, CXCL1 and CCL2, respectively, histopathological sections stained with H&E and the dosage of VEGF. The leukocytes were isolated from brachial plexus and labeled with ^{99m}Tc -ECD and were injected into the tail vein of animals to conduct scintigraphic images and analyzed quantitatively by counting the radioactivity in the regions of interest. The results showed that ischemia was maintained throughout the trial period. In peripheral blood, the diabetic group had lower white blood cell count on the 3^o day after FAO ($p < 0,001$), if compared with control. The inflammatory score showed that in the skin in the control group had higher score on the 3^o day after FAO and in diabetic group the score were higher on 1^o day after FAO, wherein the control group had higher concentration of neutrophils on the 3^o day ($p < 0,001$) and on the 7^o day ($p < 0,001$) after FAO and diabetic group had had higher concentration of macrophages on the 0 day ($p < 0,01$) e 3 ($p < 0,001$) after FAO. When assessing the concentration of VEGF, the diabetic group presented a lower on the day 1 ($p < 0,001$), 3 ($p < 0,01$) e 7 ($p < 0,01$) after FAO. In the scintigraphic images there was no difference between groups. Thus, our results suggest that are differences in the inflammatory profile in diabetic and control group. New results will still be required to evaluate the use of radiolabeled leukocytes in the early identification of possible changes in the skin.

Keywords: Inflammation; diabetes *mellitus*; peripheral arterial disease; ischemia; leukocytes; radiolabeled leukocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da Estreptozotocina (STZ).....	18
Figura 2 - Desenho ilustrativo da oclusão de um segmento arterial de membro inferior.....	22
Figura 3 - Migração de leucócitos.....	25
Figura 4 - Figura ilustrativa da via da úlcera diabética.....	26
Figura 5 - Mecanismos de cicatrização de feridas em pessoas saudáveis (esquerda) versus em pessoas com diabetes (direita).....	29
Figura 6 - Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m.....	32
Figura 7 - Método de obtenção do grupo diabético (STZ) e do grupo controle (C).....	38
Figura 8 - Modelo Experimental de Isquemia de Membro posterior.....	39
Figura 9 - Equipamento de imagem de perfusão por laser Doppler.....	40
Figura 10 - Escala de cores que codificam o fluxo sanguíneo nas imagens de perfusão por laser Doppler.....	40
Figura 11- Contagem celular em câmara de Neubauer.....	41
Figura 12 - Preparo do esfregaço sanguíneo.....	42
Figura 13 - Procedimento para isolamento de leucócitos totais do sangue periférico.....	45
Figura 14 - Gama-câmara para animais.....	47
Figura 15 - Representativa das regiões de interesse (ROIs).....	47
Figura 16 - Contador de radiação gama.....	48
Figura 17 - Avaliação do Fluxo Sanguíneo de membro posterior através da imagem de perfusão por Laser Doppler.....	51
Figura 18 - Contagem total de leucócitos do sangue periférico diluídos na solução de Turk e contados na câmara de Neubauer.....	53
Figura 19 - Cortes histopatológicos corados por H&E.....	55
Figura 20 - Cinética do Infiltrado de neutrófilos e macrófagos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos.....	57

Figura 21 - Concentração de VEGF na pele do membro posterior isquêmico.....	58
Figura 22 - Imagens cintilográficas (visão anterior) de camundongos controle e STZ 3 horas após a injeção de ^{99m}Tc-ECD-Leucócitos.....	59
Figura 23 - Contagem total da radiação na dos ^{99m}Tc-ECD-Leucócitos nos membros posteriores com OAF e sem OAF nos grupos controle e STZ, 3 horas após a injeção.....	60
Figura 24 - Relação alvo/não alvo dos membros posteriores após oclusão da artéria femoral em modelo experimental de Diabetes Tipo 1, 3 horas após a injeção de ^{99m}TC-ECD-leucócitos.....	61
Figura 25 - Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos controle e STZ.....	62
Figura 26 - Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos controle e STZ entre os dias 0, 1 e 3 após a OAF.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios diagnósticos do diabetes.....	17
Tabela 2: Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico.....	53
Tabela 3: Escore Inflamatório.....	54

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> (DM)	14
1.1.1 Classificação do DM	15
1.1.2 Diagnóstico do DM	16
1.1.3 Modelos Animais de Indução do DM	18
1.1.4 Complicações endoteliais do DM	20
1.2 Doença Arterial Periférica (DAP)	21
1.3 Complicações da DAP no diabético	23
1.4 Lesões cutâneas no diabético	25
1.5 Medicina Nuclear/ Farmácia Nuclear	31
1.5.1 Tecnécio-99m	31
1.5.2 O papel da Medicina Nuclear no diagnóstico de processos inflamatórios usando leucócitos radiomarcados	33
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 MÉTODOS.....	37
4.1 Animais	37
4.2 Método de obtenção do grupo diabético e do grupo controle	37
4.3 Isquemia de membros posteriores em camundongos	38
4.4 Avaliação da recuperação hemodinâmica pós-isquêmica por imagem de perfusão por Laser Doppler	39
4.5 Contagem Total dos Leucócitos.....	40
4.6 Contagem diferencial dos Leucócitos	42
4.7 Avaliação da atividade do N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) – Presença de macrófagos.....	43
4.8 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) – Presença de neutrófilos.....	43
4.9 Dosagem de citocinas.....	44
4.10 Análises histopatológicas	44
4.11 Isolamento dos Leucócitos do Sangue Total.....	44

4.12	Análise da Viabilidade Celular	45
4.13	Marcação do Etilenodicisteína Dietil Éster (ECD) com ^{99m} Tc	46
4.14	Marcação de leucócitos com ^{99m} Tc-ECD	46
4.15	Imagens Cintilográficas com ^{99m} Tc-ECD-leucócitos	46
4.16	Estudo <i>ex vivo</i> da pele do membro posterior	48
4.17	Análise Estatística	49
5.	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação da isquemia tecidual de membros posteriores	50
5.2	Avaliação da inflamação na pele	52
5.3	Avaliação dos níveis de VEGF na pele	57
5.4	Emprego de leucócitos radiomarcados.....	58
5.4.1	Imagens Cintilográficas	58
5.4.2	Estudo <i>ex vivo</i> da pele do membro posterior isquêmico	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	71
8	PERSPECTIVAS.....	72
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Diabetes *mellitus* (DM)

O diabetes *mellitus* (DM) agrupa um conjunto de enfermidades metabólicas de etiologia diversa que é caracterizado por hiperglicemia e alterações no metabolismo devido a alteração na secreção, na ação da insulina, ou de ambas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). A insulina é um hormônio produzido pelas células beta (β) do pâncreas e tem como função principal controlar os níveis de glicose do sangue, através da captação de glicose pelas células (NAPOLITANO; MEGNA; MONFRECOLA, 2015).

O DM é considerado hoje uma pandemia devido ao aumento da incidência e prevalência em todo o mundo, tornando-se um grave problema de saúde pública. A hiperglicemia, decorrente do DM, é responsável por inúmeras complicações micro e macrovasculares, que podem levar à retinopatia, nefropatia, neuropatia central e periférica e doenças cardiovasculares (CALAFIORE e BASTA, 2015).

Em 2014, a Federação Internacional de Diabetes (IDF, sigla em inglês) estimou que havia no mundo cerca de 387 milhões de pessoas com diabetes e a projeção para 2035 é que este número aumente para aproximadamente 592 milhões. Ainda de acordo com a IDF, ocorrem em torno de 4,9 milhões de mortes por ano em decorrência do diabetes, significando uma morte em decorrência do DM a cada 7 segundos. Em termos financeiros, essa doença é responsável por um gasto anual de U\$ 612 bilhões de dólares ao ano, representando cerca de 11% de todo o dinheiro gasto em assistência médica no mundo. No Brasil, o DM foi responsável por mais de 470 mil mortes entre 2000 e 2010, sendo que neste mesmo período, a taxa de mortalidade aumentou de 20,8 para 28,7 mortes por 100 mil habitantes (MINISTERIO DA SAUDE, 2013).

Além dos custos financeiros, o DM tem importantes efeitos psicossociais na vida dos pacientes, pois muitas vezes pode levar à depressão, exclusão social e a danos físicos. Dessa forma, o DM traz não apenas consequências econômicas, mas também humanas e sociais, sendo responsável pela redução da expectativa e da qualidade de vida desses pacientes (KORZON-BURAKOWSKA; DZIEMIDOK, 2011)

1.1.1 Classificação do DM

A classificação clássica, proposta pela Associação Americana de Diabetes (ADA), dividiu o diabetes em diabetes *mellitus* Tipo 1 (DM1), Tipo 2 (DM2), de outros tipos e o Diabetes gestacional (KHARROUBI, 2015).

O diabetes *mellitus* Tipo 1 (DM1) é uma doença inflamatória crônica que leva a destruição seletiva das células β nas ilhotas pancreáticas. Essas células são afetadas por um processo que envolve mecanismos da autoimunidade celular e humoral contra seus antígenos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012), sendo que essa desordem ocorre em indivíduos já predispostos geneticamente ou de forma idiopática. Vários fatores ambientais têm sido apontados como possíveis fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença, como infecções virais, vacinas da infância, consumo precoce de cereais ou proteínas do leite da vaca e falta de amamentação, mas até o momento nenhum agente ou estilo de vida tem sido demonstrado como efetivamente causador dessa doença (ATKINSON; CHERVONSKY, 2012). A maneira pela qual esses possíveis fatores atuam no desenvolvimento do DM1 continuam mal compreendidos e por vezes até controversos (BARDINI; ROTELLA; GIANNINI, 2012).

A destruição das células β pancreáticas leva a uma deficiência de insulina, sendo necessária sua reposição desde o início da enfermidade. O DM1 representa de 5 a 10% de todos os casos de diabetes (FRYKBER *et al.*, 2006), sendo que de 80 a 90 % dos casos de DM1 acomete crianças e adolescentes. Geralmente, desenvolve-se de repente e pode levar ao aparecimento de sintomas como a poliúria, polidipsia, polifagia, com severa desidratação e a cetoacidose (KHARROUBI, 2015).

O diabetes *mellitus* Tipo 2 (DM2) é o tipo predominante na população, correspondendo de 90 a 95% de todos os casos de diabetes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012), e é caracterizado por resistência insulínica, hiperglicemia crônica e deficiência relativa na secreção de insulina (SOUZA *et al.*, 2012). A deficiência na ação da insulina ou deficiência na função de células β pancreáticas podem ser decorrentes de defeitos genéticos, da idade e, principalmente, estar associados à mudanças no estilo de vida, com o aumento do sedentarismo e no consumo de

alimentos industrializados, que levam à obesidade (CORNELL, 2015; KHARROUBI, 2015).

O DM ainda pode ter outras causas como disfunções endócrinas, uso de drogas, síndromes genéticas e também pode surgir durante a gravidez (diabetes gestacional), mas a causa ainda não é bem esclarecida e pode ou não regredir após o parto (FRYKBER *et al.*, 2006).

1.1.2 Diagnóstico do DM

O diagnóstico do DM durante anos foi baseado nos níveis de glicemia de jejum (GJ) e no Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG), no qual a concentração de glicose é avaliada no sangue duas horas após administração oral de 75g de glicose dextrosol. Em 2010, o *International Expert Committee* que inclui representantes do *American Diabetes Association* (ADA), o *International Diabetes Federation* (IDF), e o *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) recomendaram o uso da hemoglobina glicada (HbA1c) no diagnóstico do diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

A inclusão da hemoglobina glicada (HbA1c) trouxe vantagens em relação a dosagem de GJ devido à maior facilidade ao paciente, uma vez que, não é necessário o jejum, possui maior estabilidade pré-analítica e menor variação diária durante períodos de estresse ou doença. Entretanto, a HbA1c apresenta as desvantagens de ter alto custo, menor disponibilidade do teste em algumas regiões do Brasil e, por vezes, baixa correlação com a glicemia média em certos indivíduos (SOUZA *et al.*, 2012). Os parâmetros que devem ser analisados para o diagnóstico do Diabetes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios diagnósticos do Diabetes

A1c \geq 6,5%. O teste deve ser realizado em um laboratório especializado usando método certificado pelo NGSP* e padronizado para o ensaio clínico DCCT**.

ou

GJ \geq 126 mg/dL. O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica de pelo menos 8 h.

ou

TTOG \geq 200 mg/dL durante o. O teste deve ser realizado como descrito pelo Organização Mundial de Saúde (OMS), usando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água e quantificação da glicose 2 horas depois.

ou

Em um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, a glicose plasmática aleatória **\geq 200 mg / dL**

Fonte: AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013.

NGSP* *National Glycohemoglobin Standardization Program*

DCCT** *Diabetes Control and Complication Trial*

O tratamento do DM consiste no controle constante da glicemia, sendo que mudanças no estilo de vida, como dietas e a realização de atividades físicas, assim como intensa farmacoterapia para controle da hiperglicemia e dos fatores de risco, com o objetivo de reduzir substancialmente as taxas de mortalidade e eventos vasculares (CORNELL, 2015).

1.1.3 Modelos Animais de Indução do DM

Os modelos experimentais representam uma ferramenta essencial para o entendimento das bases moleculares, da patogênese das complicações e da utilidade de agentes terapêuticos em doenças multifatoriais como é o caso do DM (CHATZIGEORGIU *et al.*, 2009). Alguns dos principais modelos utilizados serão brevemente introduzidos a seguir.

No modelo de DM Tipo 1, a geração de animais insulino-dependentes pode ser induzida pelo tratamento com a Estreptozotocina (STZ) ou com o Aloxano (AX) (QUONDAMATTEO, 2014). A STZ é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces achromogens* e que contém uma molécula de glicose, na forma de desoxiglicose, e um porção metilnitrosuréia (Figura 1). A presença da glicose é então responsável pelo direcionamento químico da STZ para as células β pancreáticas, uma vez que estas expressam constitutivamente o transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) na membrana celular, o qual também está presente nos rins e no fígado. A porção metilnitrosuréia é altamente reativa e é responsável pelos efeitos tóxicos da STZ (WU; YAN, 2015), causando danos no DNA das células β pancreáticas (GAO; ZHENG, 2014).

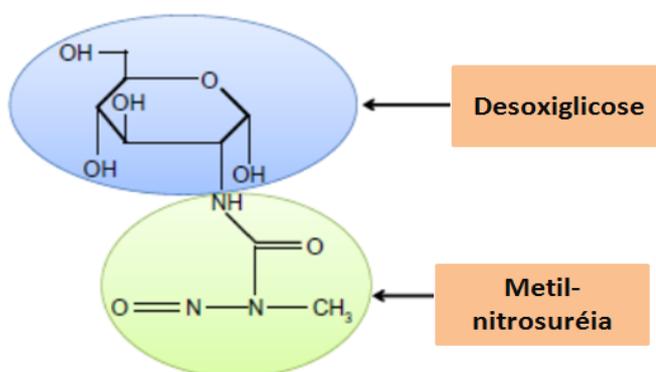


Figura 1: Estrutura molecular da Estreptozotocina (STZ)

A toxicidade da STZ ocorre através da transferência do grupo metil da STZ para o DNA, causando danos que levam a fragmentação do DNA. Na tentativa de reparo do DNA, a enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP), é super estimulada e leva à diminuição do NAD⁺ intracelular e, conseqüentemente, diminuição dos estoques de adenosina trifosfato (ATP). A depleção dos estoques de energia celular

resultam em necrose das células β . Outro fator que possivelmente atua contribuindo para o dano celular é a glicosilação de proteínas, porém, acredita-se que a metilação do DNA seja a responsável pelos defeitos funcionais das células β após a exposição à STZ (LENZEN, 2008).

A geração de animais insulino-dependentes também pode ser induzida pelo Aloxano (AX) que é um composto químico altamente instável. O Aloxano apresenta uma estrutura molecular semelhante à glicose, de forma que o transportador GLUT-2 reconhece o AX e o transporta para dentro da célula, onde exerce seu efeito tóxico pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LENZEN, 2008), levando à destruição das células β do pâncreas (KING, 2012; CHATZIGEORGIOU *et al.*, 2009).

Dentre os modelos experimentais de diabetes insulino-dependentes, os induzidos por STZ são os mais utilizados pelo fato de a STZ ser considerada o melhor agente diabetogênico (CHEN *et al.*, 2010), principalmente, devido às suas propriedades químicas, em particular à maior estabilidade se comparada ao AX (LENZEN, 2008). Vale salientar que, apesar desses métodos serem apropriados para gerar animais insulino-dependentes, esses modelos não apresentam o componente auto-imune (CHATZIGEORGIOU *et al.*, 2009), que é uma característica do DM1 em humanos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

Existem ainda modelos de DM1 que envolvem a destruição auto-imune espontânea das células β do pâncreas, como os camundongos NOD (da expressão inglesa *non-obese diabetic*) e os ratos BB (da expressão inglesa *Bio-breeding*) (QUONDAMATTEO, 2014). Porém, estes também apresentam algumas desvantagens como altos custos de manutenção, para ambos os modelos, baixa previsibilidade do desenvolvimento do DM em camundongos NOD e severa leucopenia em animais BB (KING, 2012; CHATZIGEORGIOU *et al.*, 2009).

1.1.4 Complicações endoteliais do DM

Os mecanismos patogênicos de ambas as formas do DM são diferentes, porém, os sintomas e consequências, como distúrbios metabólicos e prejuízo no balanço de lipídios, são características comuns (BARDINI; ROTELLA; GIANNINI, 2012). Tanto o DM1 quanto o DM2 são caracterizados pelo alto risco de desenvolvimento de complicações crônicas com prejuízos micro e macrovasculares em diversos órgãos (BARDINI; ROTELLA; GIANNINI, 2012). O risco relativo para doenças cardiovasculares é de duas a quatro vezes maior nos pacientes diabéticos que na população geral (TRICHES *et al.*, 2009), sendo o DM um fator de risco maior para a Doença Arterial Periférica (DAP) (THIRUVOIPATI, 2015).

Muitos estudos já demonstraram que a hiperglicemia crônica leva a doenças vasculares, com alterações do metabolismo e das funções endoteliais (MADONNA; DE CATERINA, 2011; ROBERTS; PORTER, 2013; ALTABAS, 2015). O endotélio não é apenas um tecido inerte que cobre a parede dos vasos sanguíneos, ele desempenha um papel na inibição da atividade das plaquetas, na adesão de leucócitos à parede do vaso e, ainda, mantém um equilíbrio na atividade fibrinolítica e pró-trombótica. Além disso, exerce função imune e no controle do volume e dos eletrólitos contidos nos espaços intra e extravasculares (LIBBY, 2012; KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012).

A disfunção do endotélio decorrente da hiperglicemia ocorre principalmente por uma diminuição na produção de óxido nítrico (NO) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo e tem um papel determinante na progressão das complicações vasculares associadas ao DM (REIS *et al.*, 2008; KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012). O NO é o principal mediador secretado pelas células endoteliais e exerce função vasodilatadora, na preservação da integridade do vaso por inibição da inflamação, da trombose e da proliferação celular (ALTABAS, 2015). As ROS, quando superproduzidas, levam à ativação das principais vias bioquímicas que podem desencadear complicações vasculares do DM, como a via do poliol e da hexosamina, ativação da proteína quinase C (PKC) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (PANENI *et al.*, 2013; KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012).

Outro fator que ainda podem levar a disfunção do endotélio é a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) (ALTABAS, 2015). Esses AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicosados após a exposição a açúcares redutores e contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, modificando proteínas intracelulares e de membrana e moléculas da matriz e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Acumulam-se na maioria dos órgãos-alvo acometidos no DM e, ainda, nas placas ateroscleróticas (REIS *et al.*, 2008), acelerando a progressão da aterosclerose associada ao DM (HARTGE; UNGER; KINTSCHER, 2007). Além disso, a exposição das células endoteliais à hiperglicemia pode levar à apoptose devido a perda da integridade celular e a progressão à senescência (LIU *et al.*, 2014).

Resumindo, todas essas alterações que ocorrem nos pacientes diabéticos favorecem um estado pró-inflamatório e pró-trombótico que pode levar a aterotrombose (PANENI *et al.*, 2013). Dessa forma, a presença do DM, por si, já é considerada um fator de risco independente para a doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca e doença arterial periférica (DAP) (TRICHES *et al.*, 2009).

1.2 Doença Arterial Periférica (DAP)

A doença arterial periférica (DAP) ocorre pelo estreitamento do calibre das artérias dos membros inferiores, com prejuízo crônico do suprimento sanguíneo e hipoperfusão dos tecidos. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DAP são idade, sexo, tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia e DM, sendo sua principal causa a aterosclerose (VALDIVIELSO; RAMÍREZ-BOLLERO; PÉREZ-LÓPEZ, 2014; NG *et al.*, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2014).

A aterosclerose ocorre por modificações no endotélio conhecidas como ateromas, que se sobressaem e obstruem o lúmen vascular. A estenose arterial, causada pela oclusão total ou parcial de artérias de membros inferiores, resulta em uma diminuição do fluxo sanguíneo para os membros (Figura 2).

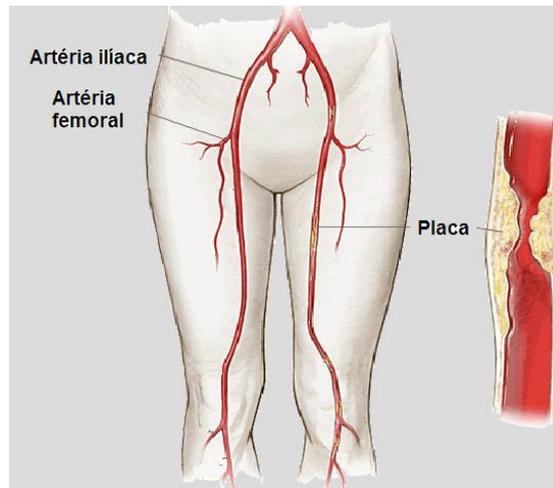


Figura 2: Desenho ilustrativo da oclusão de um segmento arterial de membro inferior. A DAP se inicia com a obstrução do fluxo sanguíneo arterial nos membros inferiores. Muitas vezes, essa obstrução se deve à formação de uma placa aterosclerótica nas artérias dos membros inferiores. Figura adaptada de: < <http://uvahealth.com/services/vascular-center/treatment/peripheral-arterial-disease>

A DAP tem se tornado um problema crescente em todo o mundo, afetando de 8-12 milhões de americanos (PANICO *et al.*, 2015). No Brasil, os dados da prevalência da DAP ainda são escassos e restritos a populações específicas, sendo praticamente todos os estudos realizados na região sudeste do país (MAKDISSE *et al.*, 2008). Um estudo realizado com idosos residentes na cidade de São Paulo encontrou uma prevalência de 36,4% de DAP (MAKDISSE *et al.*, 2007).

Muitos pacientes com DAP são assintomáticos, embora alguns possam apresentar manifestações clínicas (PANICO *et al.*, 2015). As manifestações clínicas da DAP são a claudicação intermitente (CI), a isquemia aguda (IA) e a isquemia crônica (crítica) (IC/ICC) de membro inferiores. A claudicação intermitente é caracterizada por dores musculares desencadeadas pelo exercício físico, mas que cessam durante o repouso (SUMPIO, 2012). A isquemia aguda é definida como uma diminuição súbita da perfusão do membro inferior, decorrente da trombose ou a embolia, que pode resultar em ameaça para a viabilidade do membro. A isquemia crônica (crítica) (ICC/C) é caracterizada pela dor em repouso, úlceras isquêmicas ou gangrena isquêmica, e envolve alterações micro e macrovasculares, incluindo a perda da densidade capilar e disfunções endoteliais (VEMULAPALLI; PATEL; JONES, 2015). Dentre essas manifestações clínicas, a mais grave é a isquemia crônica (crítica) (IC/ICC), que pode levar a perda de membros ou até mesmo a morte, se não tratada a tempo (MASCARENHAS *et al.*, 2014).

1.3 Complicações da DAP no diabético

Pacientes com DAP e DM tem chances aumentadas de evoluir para estágios mais severos da doença mais rapidamente. Além disso, a DAP é de duas a quatro vezes mais comum em pessoas com DM do que em pessoas não diabéticas, sendo que estes ainda apresentam maiores taxas de amputação (SUMPIO, 2012).

A isquemia decorrente da DAP é causada pela redução do fluxo sanguíneo para os membros inferiores com prejuízo para a perfusão dos tecidos. Essa isquemia pode levar à necrose do tecido muscular e fibrose; podendo, ainda, desencadear uma resposta vascular (vasodilatação e angiogênese) e inflamatória (LI *et al.*, 2015).

A resposta angiogênica leva ao crescimento de novos vasos sanguíneos, e é um componente essencial para o reparo tecidual, como suporte de nutrientes e de oxigênio. Tanto a angiogênese (formação de capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes) quanto a vasculogênese (mobilização de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea) contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos durante a reparação tecidual (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Essa resposta é mediada principalmente pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é um mediador da neovascularização com papel crucial na formação de vasos sanguíneos e da hipóxia tecidual induzindo a angiogênese (CHOU *et al.*, 2001). Em camundongos diabéticos, há redução da neovascularização após isquemia que está associada aos níveis baixos de VEGF (HOWANGYIN; SILVESTRE, 2014).

A inflamação é uma resposta imune necessária à manutenção da homeostase tecidual frente a uma variedade de condições nocivas ao tecido, como ocorre durante as infecções ou lesões no tecido, permitindo assim a sobrevivência do organismo (MEDZHITOV, 2010). O processo inflamatório envolve interações entre vários tipos celulares e a produção de diversos mediadores químicos. O primeiro passo importante para iniciar a resposta inflamatória é o aumento do aporte sanguíneo para o local da inflamação e o aumento da permeabilidade da parede vascular que irá permitir a passagem do plasma e de grandes moléculas através do endotélio, possibilitando a entrega de mediadores solúveis para o local da inflamação (CALDER, 2014). Esses mediadores químicos são produzidos por

células residentes no tecido, como macrófagos e mastócitos, em resposta a diversos estímulos como ocorre nas infecções, traumas, cicatrização de feridas, reações imunológicas e necrose. Esses diferentes estímulos iniciais desencadeiam a resposta inflamatória através da secreção de mediadores pró-inflamatórios, e de citocinas, como a histamina e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (MEDZHITOV, 2008). Sendo assim, os leucócitos circulantes são requeridos a migrar para os locais onde há lesão tecidual e infecção com o objetivo principal de eliminar o alvo da inflamação primária e contribuir para o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2010).

No tecido inflamado, ocorre o recrutamento de leucócitos estimulados, principalmente, pelas quimiocinas, que são citocinas com propriedades quimiotáticas. A quimiocina CXCL1 (quimiocina motivo CXC ligante 1), por exemplo, estimula principalmente o recrutamento de neutrófilos para o local que, ao serem ativados, secretam o conteúdo dos seus grânulos e exercem importante função no combate a patógenos (SHIREMAN, 2007). Ocorre também o recrutamento de monócitos, principalmente pela quimiocina CCL-2\MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), que diferenciam-se em macrófagos ao transmigrarem para o tecido (HASKÓ; PALCHER, 2012).

A migração de leucócitos (Figura 3) para o local de lesão ou infecção é regulada pela cascata de adesão de leucócitos, que é iniciada por rolamento dependente de selectinas, seguida pela ativação de leucócitos induzidas pelas quimiocinas e adesão mediada por integrinas. Finalmente, ocorre a migração transendotelial dos leucócitos, principalmente através das junções do endotélio (MITROULIS *et al.*, 2015).

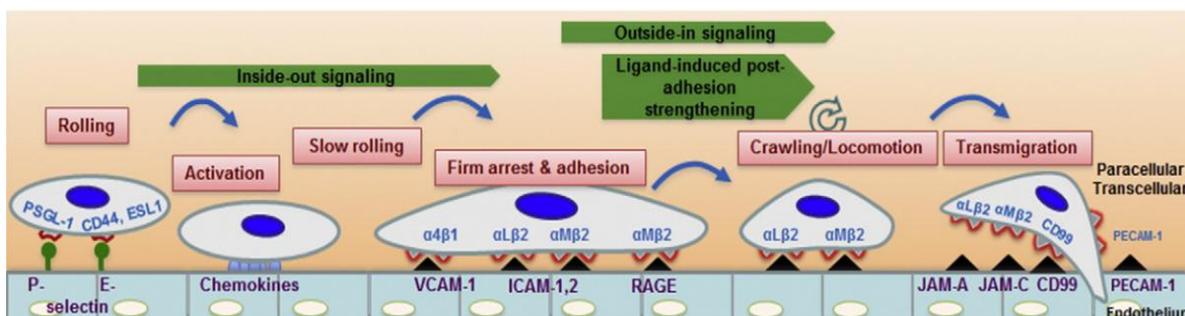


Figura 3: Migração de leucócitos. A resposta inflamatória é desencadeada por mediadores pró-inflamatórios que recrutam os leucócitos para o sítio inflamatório. A migração de leucócitos inicia-se pelo rolamento de leucócitos dependente de selectinas, seguida pela ativação de leucócitos, que levam a um rolamento lento e facilita a adesão e o aprisionamento de leucócitos e a diapedese. Fonte: MITROULIS *et al.*, 2015.

Esses eventos propiciam o aparecimento de lesões cutâneas no diabético que são conhecidas como feridas diabéticas. Essas feridas diabéticas que acometem os membros inferiores, especialmente os pés, dos pacientes são consideradas como preditivos de morbimortalidade e incapacidade, sendo, inclusive, a principal causa de hospitalização nesses pacientes (TUTTOLOMONDO; MAIDA; PINTO, 2015). De fato, cerca de 15% dos pacientes com diabetes irá desenvolver úlceras nas extremidades inferiores e, destes pacientes, alguns podem requerer amputação do membro (ELSHARAWY; NAIM; GREISH, 2012; KORZON-BURAKOWSKA; DZIEMIDOK, 2011).

1.4 Lesões cutâneas no diabético

Os fatores desencadeadores dessas lesões cutâneas no diabético são a neuropatia e a isquemia, provocada pela oclusão de alguma artéria, que podem ocorrer isoladamente ou associados na neuro-isquemia (Figura 4). A infecção é geralmente uma consequência. A neuropatia devido à perda da sensação protetora deixa os pés vulneráveis a lesões causadas por excesso de pressão, lesões mecânicas ou térmicas. Já a neuropatia motora altera a biomecânica e, gradualmente, a anatomia do pé. Esses desarranjos levam à deformidades dos pés e à limitação da mobilidade articular (LEPÄNTALO *et al.*, 2011).

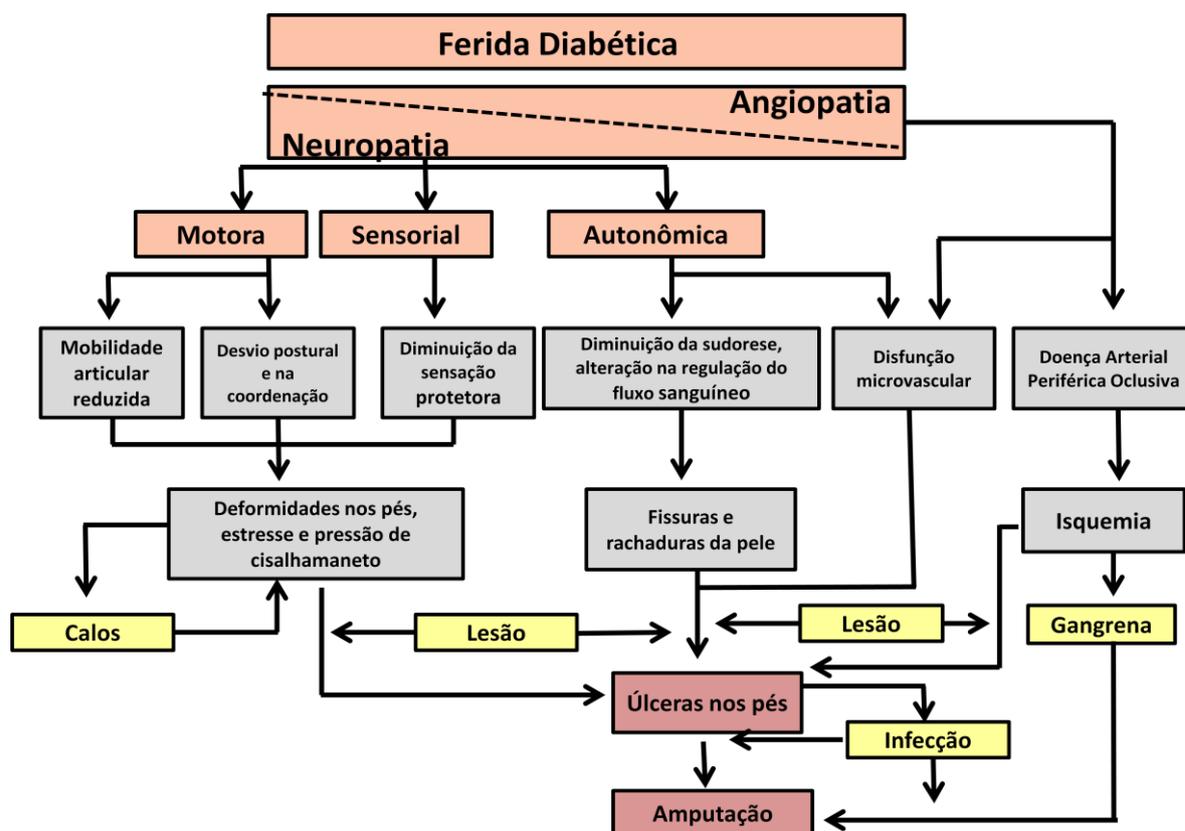


Figura 4: Figura ilustrativa da via da úlcera diabética. O Diabetes é um importante fator de risco para a DAP oclusiva, podendo levar a uma diminuição do fluxo sanguíneo (isquemia) para os membros inferiores com consequente gangrena que pode evoluir para úlceras nos pés e até mesmo amputação de membro. Adaptado de Lepântalo *et al.*, 2011.

Os pacientes diabéticos representam um risco aumentado para a isquemia, sendo demonstrado em um recente estudo europeu realizado com pacientes diabéticos e com úlceras que pelo menos metade dessas úlceras tiveram origem neuro-isquêmica ou isquêmica (GERSHATER *et al.*, 2009). Além disso, foi relatado que a isquemia é um fator que contribui em 90% dos casos de amputação maior nos diabéticos (LEPĂNTALO *et al.*, 2011).

O grande problema no aparecimento de úlceras nos diabéticos relaciona-se ao processo de cicatrização, pois geralmente em indivíduos saudáveis, lesões menores cicatrizam bem. Porém, a presença do diabetes/doença vascular pode afetar negativamente o processo de cicatrização e levar às chamadas feridas crônicas (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

As feridas crônicas frequentemente entram em um estado de inflamação patológica devido a um processo de cura adiado, incompleto ou descoordenado (GUO; DIPIETRO, 2010). Aproximadamente 70% das feridas crônicas são causadas pela isquemia, secundária ao DM, estase venosa e pressão (MENKE *et al.*, 2014), sendo, em sua maioria, nas extremidades inferiores (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Os pacientes diabéticos são mais propensos a desenvolver úlceras nos pés que não cicatrizam e que representam uma complicação séria do diabetes. Essas úlceras precedem 84% das amputações dos membros inferiores dos diabéticos (GUO; DIPIETRO, 2010) e representam um relevante fardo clínico e socioeconômico.

Existem mais de 100 fatores fisiológicos que podem contribuir para que a cicatrização dessa lesão seja deficiente nos pacientes diabéticos como, por exemplo, a deficiência na produção do fator de crescimento, da resposta angiogênica, da função dos macrófagos, acumulação de colágeno, função da barreira epidérmica, quantidade de tecido de granulação, migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, número de nervos epidérmicos e cicatrização óssea (BREM; TOMIC-CANIC, 2007).

Outro fator prejudicial na cicatrização e que sempre acompanha as úlceras diabéticas é a hipóxia prolongada, que pode ser decorrente tanto da perfusão insuficiente quanto da angiogênese insuficiente. A hipóxia é prejudicial para a cicatrização das úlceras, pois ela pode amplificar a resposta inflamatória inicial, prolongando dessa forma a lesão e aumentando os níveis de ROS (GUO; DIPIETRO, 2010).

Em resposta à hipóxia, ocorre a ativação do fator de transcrição chamado de fator induzido por hipóxia (HIF-1 α). O HIF-1 α é constantemente expresso e degradado durante a normóxia, mas é estabilizado em condições de hipóxia. Diversos estudos tem demonstrado sua contribuição na patogênese de várias doenças cardiovasculares, especialmente em doenças isquêmicas, sugerindo que o controle da angiogênese e a arteriogênese pela modulação da via do HIF-1 α poderia ser uma estratégia valiosa em pacientes com doenças isquêmicas (HASHIMOTO; SHIBASAKI, 2015).

A hiperglicemia é ainda outro fator que prejudica o processo de cicatrização por aumentar o estresse oxidativo, quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante (GUO; DIPIETRO, 2010). Altos níveis de metaloproteases (MMP) são uma característica de úlceras do pé diabético, e os níveis de MMP em fluido de feridas crônicas são quase 60 vezes maior que em feridas agudas. Este aumento da atividade da protease leva à destruição dos tecidos e inibe os processos de reparação normais (GUO; DIPIETRO, 2010).

Nas feridas diabéticas, diversas funções celulares também estão desreguladas, tais como a imunidade de células T deficiente, os defeitos na quimiotaxia leucocitária, capacidade de fagocitose e bactericida, e disfunções de fibroblastos e das células epidérmicas. Estes defeitos são responsáveis pela depuração bacteriana inadequada e atrasada em indivíduos com diabetes (GUO; DIPIETRO, 2010). A figura 5 ilustra os mecanismos da cicatrização da ferida em pessoas saudáveis versus em pessoas com diabetes.

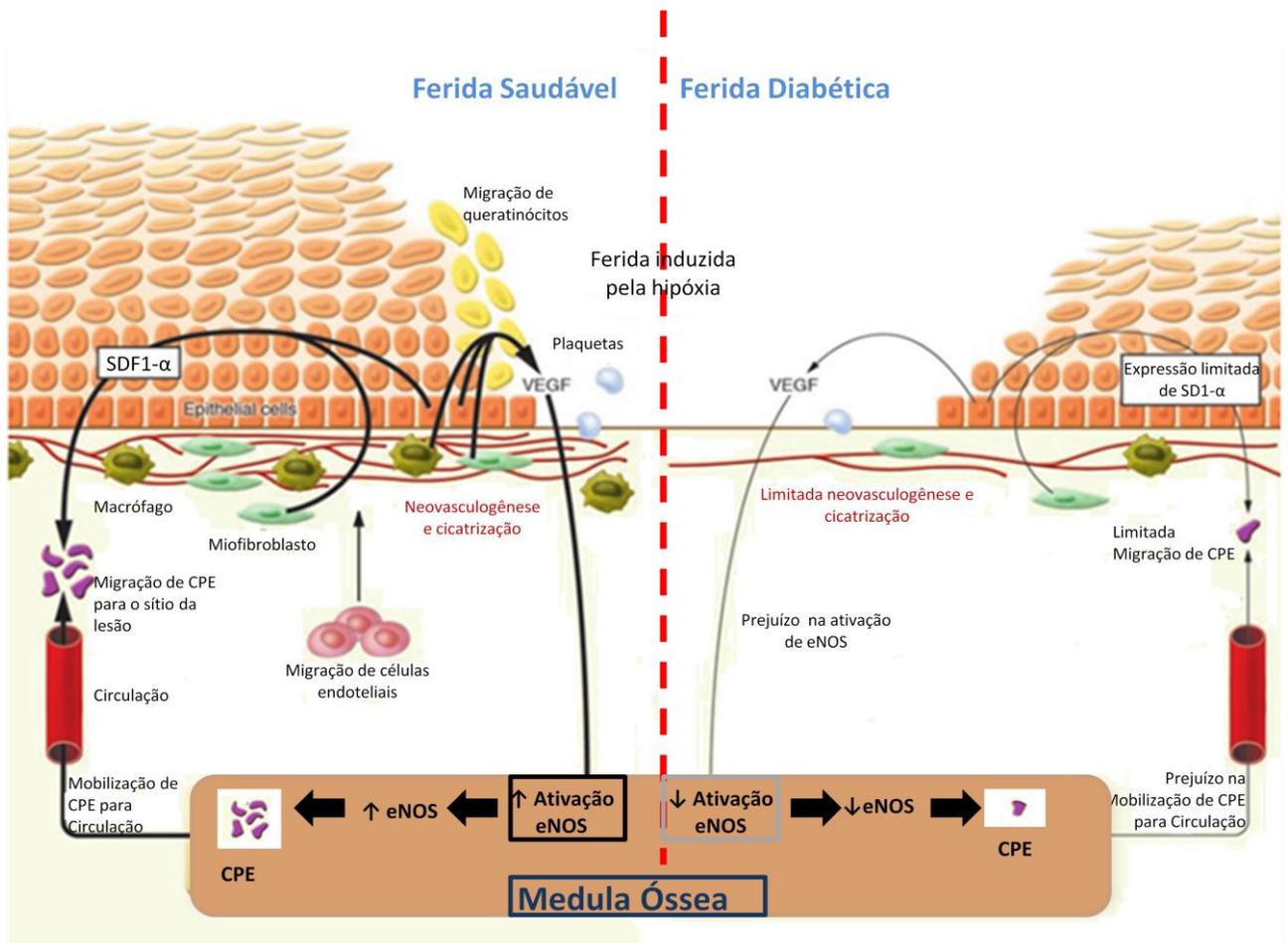


Figura 5: Mecanismos de cicatrização de feridas em pessoas saudáveis (esquerda) versus em pessoas com diabetes (direita). Em indivíduos saudáveis, o processo de cicatrização da ferida é guiada e mantida através da integração de sinais múltiplos (na forma de citocinas e quimiocinas) liberada pelos queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e plaquetas. Em indivíduos diabéticos há deficiência na produção de citocinas e quimiocinas, prejuízo na mobilização de células progenitoras endoteliais (CPE), limitada neovascularização e limitada ativação de eNOS. Fonte: Brem & Tomic-canic, 2007.

Um estudo recente, (DINH *et al.*, 2012) demonstrou que a inflamação sistêmica está associada ao desenvolvimento das úlceras diabéticas e também na falha da cicatrização dessas feridas. Esse trabalho demonstrou que nas feridas diabéticas há um aumento do infiltrado de células inflamatórias no grupo diabético, se comparado ao grupo controle. Também comparou os pacientes diabéticos que cicatrizaram completamente a ferida com os que não cicatrizaram. O grupo em que houve falha na cicatrização apresentou concentrações significativamente maiores de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator estimulador da colônia de granulócitos (G-CSF), proteína quimiotática de monócitos (CCL-2MCP-1) e do fator ativador do plasminogênio.

Até o momento, os estudos têm focado, principalmente, em avaliar cicatrização de feridas na pele de diabéticos e possíveis tratamentos com células tronco e fatores pró-angiogênicos, mas os estudos com a pele íntegra ainda são escassos e não relacionam o DM com a isquemia. Em um estudo pioneiro (TELLECHEA; KAFANAS, 2013), os pesquisadores investigaram alterações que ocorriam na pele de diabéticos e mostraram através da imunohistoquímica que há aumento de células inflamatórias nos pacientes e em diferentes modelos experimentais se comparados ao controle. Porém, até o momento, nenhum estudo foi realizado para avaliar os efeitos da hiperglicemia associada à isquemia na pele íntegra.

Portanto, esse trabalho visa compreender algumas alterações que ocorrem na pele íntegra, antes da formação de úlceras, na pele do membro posterior isquêmico em modelo experimental de diabetes e isquemia. Esses estudos são importantes para subsidiar possíveis métodos diagnósticos que detectem essas alterações em fases iniciais do processo inflamatório. Existem diversos métodos diagnósticos que visam avaliar a severidade da insuficiência arterial como o ultrassom, a angiotomografia, a angiografia por ressonância magnética e a angiografia convencional digital (SUMPIO, 2012). Entretanto, o uso desses métodos para o diagnóstico de prejuízo vascular decorrente da isquemia é, em sua maioria, baseado em alterações hemodinâmicas que ocorrem nas artérias, e os critérios aplicados para os membros inferiores dos pacientes que não são diabéticos ainda não são suficientes para prever a cicatrização de lesões nos pés diabéticos (LEPÄNTALO *et al.*, 2011).

O diagnóstico incorreto ou tardio das complicações do pé diabético pode aumentar o risco de sérias complicações, incluindo perda da função e amputação (SUMPIO, 2012). Sabe-se pela literatura que os métodos utilizados em Medicina Nuclear (MN) apresentam vantagens em relação aos procedimentos convencionais no que diz respeito ao diagnóstico precoce. Isto deve-se ao fato de que as técnicas nucleares de imagens necessitam apenas de alterações fisiológicas, como aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo, não necessitando de alterações anatômicas. Neste sentido, o emprego de leucócitos radiomarcados será utilizado neste trabalho com o propósito de verificar a possibilidade de detectar precocemente alterações no local da isquemia.

1.5 Medicina Nuclear/ Farmácia Nuclear

De acordo com a Sociedade Brasileira de Medicina Nuclear, a Medicina Nuclear (MN) é uma especialidade médica que utiliza de métodos seguros, usualmente indolores, não invasivos e relativamente de baixo custo para fornecer informações que outros exames diagnósticos não conseguiriam. A MN permite uma avaliação funcional através de uma maior ou menor captação dos compostos pelo tecido e pode fornecer informações diagnósticas de forma precoce em diferentes doenças.

Estas informações são obtidas através de imagens de um equipamento denominado câmara cintilográfica, sendo aplicadas no diagnóstico de inflamação e infecção. E a Farmácia Nuclear é a responsável por estudar os aspectos da química de compostos radioativos, bem como o comportamento desses compostos no organismo, denominados radiofármacos (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

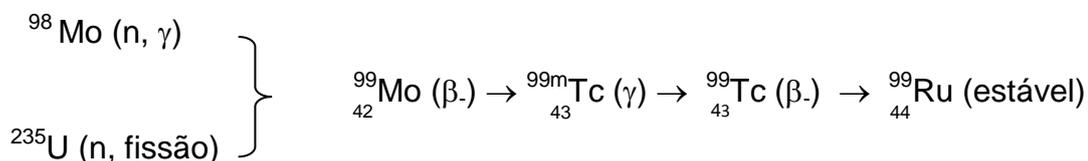
Os radiofármacos são preparações farmacêuticas que possuem um componente não radioativo (um carreador ou ligante) e um componente radioativo (ou radionuclídeo). Apresentam especificidade por algum órgão ou função fisiológica ou fisiopatológica e não possuem atividade farmacológica. Podem ser administrados oralmente ou por inalação, mas a grande maioria é administrada por via intravenosa. Sua grande aplicação é em Medicina Nuclear diagnóstica, correspondendo a 95% dos procedimentos em MN. (ARAÚJO *et al.*, 2008).

1.5.1 Técnico-99m

A descoberta do isótopo radioativo técnico-99m (^{99m}Tc) foi feita por Perrier e Segrè em 1937, num ciclotron, na Universidade da Califórnia, em Berkeley. O elemento recebeu o nome Técnico, que vem da palavra grega *technetos* que significa artificial, devido ao fato de ter sido o primeiro elemento produzido pelo homem (JONGE; PAUWELS, 1996).

O isótopo metaestável técnico (^{99m}Tc) é originado da desintegração de um elemento radioativo o molibdênio-99 (^{99}Mo), isótopo este proveniente da fissão nuclear do urânio (^{235}U) e do bombardeamento do Molibidênio (^{98}Mo) (estável) por

nêutrons em um reator nuclear (THRALL; ZIESSMAN, 2003); esquematicamente escreve-se:



O tecnécio-99m é produzido por um gerador que consiste de uma coluna de vidro onde o radionuclídeo ${}^{99}\text{Mo}$, denominado de *pai*, com o tempo de meia-vida física ($T_{1/2}$) de 66h, encontra-se fortemente adsorvido em uma resina de alumina (Figura 6). Ocorre então um processo de desintegração radioativa com emissão de radiação β_- , no qual o ${}^{99}\text{Mo}$ sofre transmutação e dá origem aos átomos de tecnécio-99m, denominado de radionuclídeo *filho*. Esses átomos são eluídos do gerador com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), nas concentrações de 10^{-6} a 10^{-8}M (BANERJEE *et al.*, 2001).



Figura 6. Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m

Fonte: IPEN/ CNEN-SP

Os Radiofármacos marcados com ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ são os mais utilizados para diagnóstico por imagem, em função das propriedades físicas e químicas ideais do radioisótopo como tempo de meia vida ($T_{1/2}$) de apenas 6,02h, decaimento por radiação γ , com fótons de 140 keV. Além disso, apresenta ampla disponibilidade, baixo custo e baixo índice de reações adversas (TSOPELAS, 2015; (MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO;

BUCHPIGUEL, 2001). Também possui fácil colimação e boa penetração tecidual devido ao fato de a energia emitida pelo ^{99m}Tc estar exatamente dentro da eficiência dos detectores de iodeto de sódio das câmaras cintilográficas atuais (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

1.5.2 O papel da Medicina Nuclear no diagnóstico de processos inflamatórios usando leucócitos radiomarcados

Durante o processo inflamatório ocorrem alterações locais e sistêmicas como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e formação de exsudato. Esses eventos são seguidos por eventos celulares como quimiotaxia, marginação de leucócitos e diapedese. Devido a todas essas mudanças fisiológicas que ocorrem, há acúmulo de leucócitos no local da inflamação, o que possibilita a aquisição de imagens cintilográficas. Sendo assim, as imagens são dependentes de alterações moleculares e não de alterações morfológicas. Dessa forma, o método cintilográfico é capaz de detectar processos inflamatórios na fase inicial, quando ainda não há alterações morfológicas, diferentemente de outros métodos diagnósticos como Raios X, Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética (BECKER; MELLER, 2001). Além disso, a MN permite a imagem do organismo como um todo, e não apenas de partes dele, como os outros métodos diagnósticos (BECKER; MELLER, 2001).

O acúmulo de captação e a localização dos radiofármacos nos locais de infecção e inflamação pode ser explicado tanto por mecanismos específicos como por mecanismos inespecíficos. Os mecanismos não específicos ocorrem pelo aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e ao processo de transudação. Dentre os radiofármacos não específicos encontram-se o Citrato de $^{67}\text{Gálio}$, lipossomas radiomarcados e imunoglobulinas radiomarcadas. E os mecanismos específicos envolvem vasodilatação e hiperemia com interações entre o radiofármaco e o alvo específico. São exemplos de radiofármacos específicos os leucócitos radiomarcados com ^{111}In ou ^{99m}Tc e citocinas radiomarcadas (GOLDSMITH; VALLABHAJOSULA, 2009)

O uso de leucócitos autólogos radiomarcados com ^{111}In ou ^{99m}Tc é considerado o “padrão ouro” para imagens de infecção/inflamação pois os leucócitos

radiomarcados apresentam alta especificidade como consequência de uma migração ativa para os tecidos inflamados. (GOLDSMITH; VALLABHAJOSULA, 2009)

O Radiofármaco ^{99m}Tc -HMPAO (hexametilpropilenoamino oxima) é amplamente utilizado para a marcação de leucócitos *in vitro* em razão de suas propriedades físicas favoráveis. Devido ao seu caráter altamente lipofílico, o complexo ^{99m}Tc -HMPAO consegue atravessar a membrana dos leucócitos, ficando no interior das células (BANERJEE *et al.*, 2001).

O etilenodicisteínato de dietila (ECD) ^{99m}Tc é outro radiofármaco que também pode ser utilizado para a marcação de leucócitos. O ECD apresenta características similares ao HMPAO como caráter lipofílico, estabilidade e pequeno tamanho. Ambos são metabolizados dentro da célula e apresentam boa extração e boa taxa de retenção. Se comparados, o ECD apresenta duas vantagens em relação ao HMPAO: maior estabilidade *in vitro* e uma depuração dos tecidos extra cerebrais mais rápida. O ECD tem sido amplamente utilizado para imagens do fluxo cerebral (ASENBAUM *et al.*, 1998) e no presente trabalho foi utilizado para marcação de leucócitos uma vez que, o HMPAO encontrava-se indisponível no Brasil.

Leucócitos autólogos radiomarcados tem sido utilizados em casos de infecção do “pé diabético”, como diagnóstico de osteomelite (FILIPPI *et al.*, 2009). Entretanto, não existe relato na literatura com relação ao emprego deste procedimento na avaliação das alterações que ocorrem na pele devido a DAP associada ao DM. Como descrito anteriormente, o método que utiliza leucócitos radiomarcados para a obtenção de imagens tem sido amplamente utilizado em situações clínicas envolvendo processos inflamatórios e infecciosos (GOLDSMITH; VALLABHAJOSULA, 2009). Assim, é razoável pensar que a utilização desse método, juntamente com outras técnicas empregadas nesse trabalho, possa contribuir para a compreensão dos eventos fisiopatológicos presentes na área afetada pela isquemia associada ao DM.

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes *mellitus* (DM) é um problema de saúde pública por ser uma pandemia que acomete crianças, jovens, adultos e idosos. É uma doença crônica multifatorial, caracterizada pelos altos níveis de glicemia em jejum e com uma previsão de aumento alarmante para os próximos anos, devido principalmente ao estilo de vida moderno, com o aumento do sedentarismo e da obesidade. O DM é caracterizado pelo alto risco de desenvolvimento de complicações vasculares e, dentre elas deve-se dar atenção especial a isquemia de membros inferiores que pode levar ao aparecimento das úlceras diabéticas isquêmicas.

Essas úlceras diabéticas isquêmicas são de extrema relevância por apresentarem prejuízo na cicatrização e por isso, muitas vezes, se tornarem crônicas devido a defeitos multifatoriais (BARCELOS, *et al.*, 2009). Além disso, apresentam alta incidência, são a principal causa de internação dentre os pacientes diabéticos e, podem resultar na amputação dos membros inferiores. Desta forma, representam um alto impacto na vida do indivíduo, da sociedade e dos sistemas de saúde.

Apesar da importância do tema, até o momento, não existe na literatura um modelo experimental que avalie a atividade inflamatória na pele íntegra de membros posteriores isquêmicos em animais diabéticos. Assim, o presente trabalho tem como proposta investigar as alterações que ocorrem na pele, buscando entender melhor os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo. Desta forma, espera-se com estes resultados buscar novos conhecimentos para minimizar ou até mesmo evitar o aparecimento de lesões mais graves, como é o caso das úlceras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações que ocorrem na pele dos membros posteriores de camundongos após oclusão da artéria femoral (OAF) em modelo experimental de diabetes tipo 1.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética de aparecimento de atividade inflamatória na pele por meio das dosagens de biomarcadores enzimáticos, tais como N-acetil-B-D-glicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO);
- Quantificar o número (total e diferencial) de leucócitos no sangue;
- Avaliar a cinética de produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na pele por ELISA;
- Avaliar a morfologia da pele dos animais dos grupos controles (não diabético) e experimentais (diabético);
- Padronizar a técnica de isolamento de leucócitos do sangue periférico e também o processo de marcação de leucócitos com o radiofármaco ^{99m}Tc -ECD;
- Realizar imagens cintilográficas utilizando leucócitos radiomarcados e analisá-las quantitativamente por meio da determinação da contagem de radioatividade nas regiões de interesse (ROI), obtendo valores da relação alvo/não alvo;
- Avaliar por meio de estudo *ex vivo* a captação dos ^{99m}Tc -ECD-leucócitos na pele e no membro posterior isquêmico.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Balb/C com idade entre 6 a 8 semanas e pesando cerca de 25 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso à ração e água. A eutanásia ocorreu por deslocamento da cervical após sedação/anestesia ou através da exsanguinação seguida de perfusão com PBS. O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), Protocolo nº 298/2014.

4.2 Método de obtenção do grupo diabético e do grupo controle

A indução do diabetes ocorreu por injeções de STZ, de acordo com o protocolo utilizado por Barcelos *et al*, 2009. Com 8 semanas de idade, os animais do grupo estreptozotocina receberam por via intraperitoneal, durante cinco (05) dias consecutivos doses de estreptozotocina (50mg/kg). Após 14 dias da última dose, ou seja, no décimo nono dia, realizou-se o teste de glicosúria (presença de glicose na urina) utilizando-se fitas reagentes (Alamar Tecno Científica). Após a realização do teste, os animais que apresentaram glicosúria positiva foram selecionados para os experimentos. Os animais que receberam injeções intraperitoneais apenas de veículo (tampão citrato-fosfato) foram considerados controles não diabéticos. No 19º dia, os animais diabéticos e não diabéticos foram submetidos à isquemia unilateral do membro posterior (Figura 7). É importante destacar que o grupo diabético é diabético e isquêmico e o grupo controle apenas isquêmico, sendo portanto a diferença entre eles apenas a presença do DM.

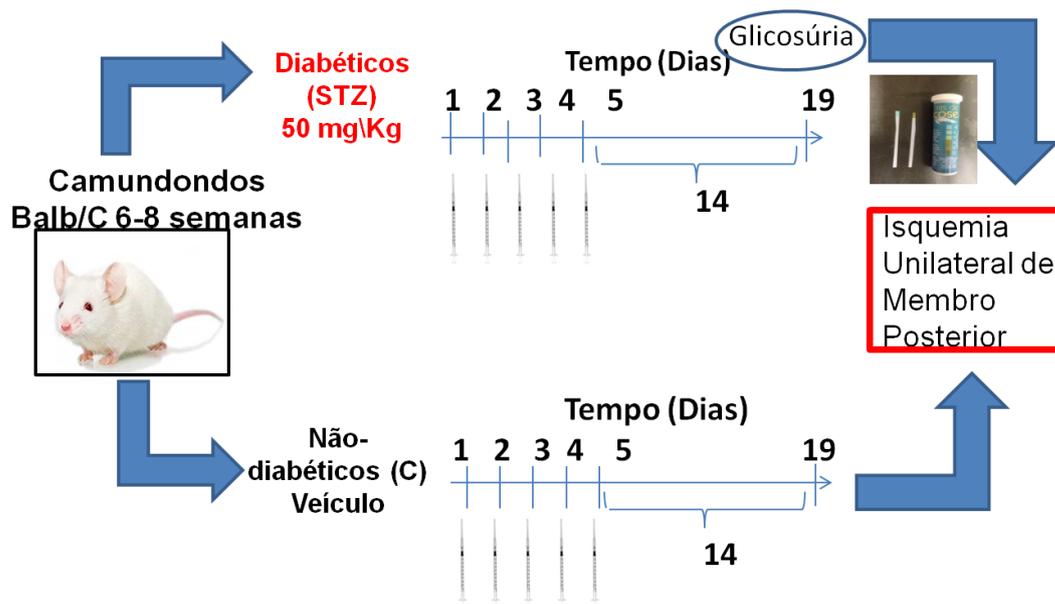


Figura 7: Método de obtenção do grupo diabético (STZ) e do grupo controle (C).

4.3 Isquemia de membros posteriores em camundongos

O modelo experimental de isquemia de membro posterior utilizado foi o modelo de oclusão unilateral permanente da artéria femoral (OAF) comum esquerda, adaptado de Maddedu *et al.* (2006; 2008). Para o procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos à tricotomia e à assepsia da região inguinal do membro posterior esquerdo. Em seguida, a artéria femoral foi exposta, dissecada até a região da artéria poplítea, amarrada por três nós, sendo dois na femoral e um na poplítea (fio de nylon 6-0). Ademais, a região entre os nós, juntamente com os ramos das artérias colaterais, foi eletrocoagulada (eletrocoagulador Deltronix, Brasil). Finalmente, as incisões foram suturadas com fio de nylon 5-0. Após a oclusão das artérias, foi novamente feita a assepsia do local e os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até a completa recuperação (Figura 8).

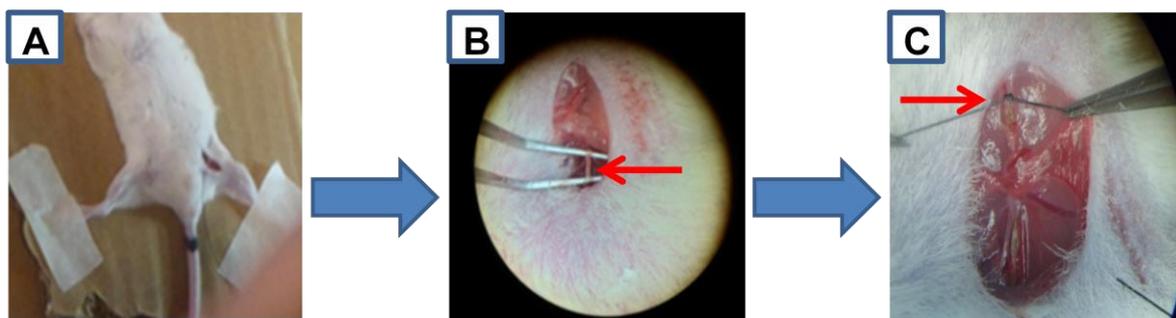


Figura 8: Modelo Experimental de Isquemia de Membro posterior. A-Tricotomia e assepsia da região inguinal. B- Exposição da Artéria Femoral. C- Nó proximal da artéria femoral.

4.4 Avaliação da recuperação hemodinâmica pós-isquêmica por imagem de perfusão por Laser Doppler

O equipamento de imagem de perfusão por Laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra) é utilizado para o monitoramento não-invasivo (e sem contato físico) da circulação sanguínea, permitindo a avaliação do fluxo sanguíneo na microcirculação (Figura 9). A técnica permite o acompanhamento de alterações no fluxo de uma área ao longo do tempo ou a avaliação de diferenças no fluxo entre mais de uma área.

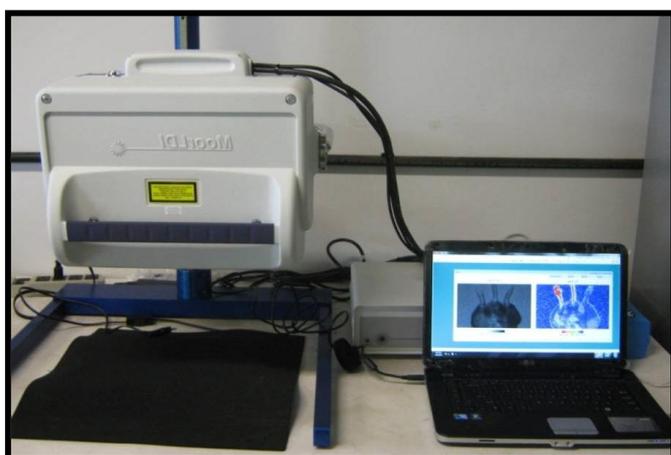


Figura 9: Equipamento de imagem de perfusão por laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra). Laboratório de Angiogênese e Células Tronco/UFMG

A técnica baseia-se no princípio de Doppler em que a luz de um laser monocromático incide sobre o tecido onde é, então, dispersa pelas hemácias em movimento e, como consequência, a frequência é ampliada. A luz é então fotodetectada e processada de forma a construir um mapa codificado de cores do fluxo sanguíneo. A mudança de frequência média Doppler é proporcional à

velocidade média das hemácias. A variação de frequência é transformada em voltagem que vai de 0 a 10V. O valor de perfusão 0V é calibrado com 0% de perfusão e o de 10V como 100% de perfusão. Quando o procedimento de escaneamento da área de interesse é finalizado, a perfusão do tecido é codificada em um mapa de cores. Pouca ou nenhuma perfusão é apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão em vermelho.

No presente estudo, os animais tiveram os membros posteriores (esquerdo e direito) depilados e, posteriormente, escaneados por um laser (830) antes (condição basal) da oclusão da artéria femoral (OAF), imediatamente após a OAF e nos tempos de 0, 1, 3 e 7 dias após a OAF, conforme demonstrado na Figura 10. O resultado foi obtido a partir do cálculo da razão entre o membro posterior isquêmico (esquerdo) e o membro posterior contralateral não isquêmico (direito). Os animais foram mantidos à temperatura constante de 37°C por 5 minutos antes e durante as mensurações.

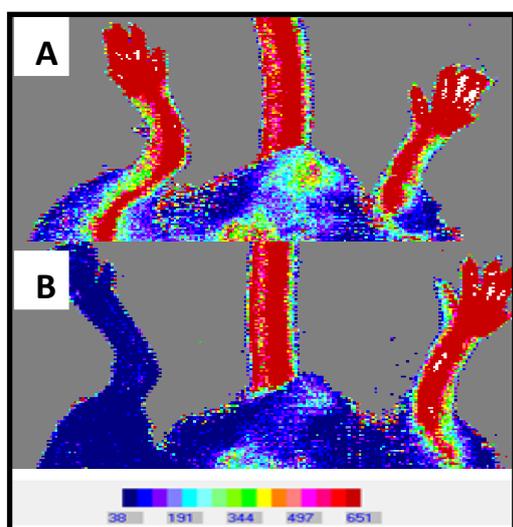


Figura 10: Escala de cores que codificam o fluxo sanguíneo nas imagens de perfusão por laser Doppler. Quanto mais vermelho maior é o fluxo sanguíneo e quanto mais azul menor é o fluxo sanguíneo. Imagens representativas dos membros posteriores A-antes da OAF e B-imediatamente após a OAF do membro esquerdo.

4.5 Contagem Total dos Leucócitos

A contagem de células em câmara de Neubauer, também conhecida como hemocítômetro, é um método manual tradicional que permite estimar o número de células por mililitro de suspensão. A câmara de Neubauer é um tipo especial de lâmina de microscópio composta por duas câmaras de contagens separadas por uma depressão transversal. Cada câmara contém uma superfície espelhada

quadriculada de dimensão 3x3 mm. A contagem total do número de células é realizada nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes. Portanto, as células que se encontravam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas (Figura 11). Para determinação do número de células obtido, foram retirados 5 µL de sangue da cauda do animal que foi diluída em 45 µL de solução de Turk (ácido acético 2% com azul de metileno) que tem a função de lisar hemácias. A Solução (células + Turk) foi homogeneizada e 10 µL desta foram colocados em um lado da câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (Olympus, Philippines), no aumento de 40x. Foram feitas duas contagens e a média do número de células foi calculada. A equação utilizada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1 \text{ mL} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de células}}{4}; \text{ onde:}$$

FD: Fator de diluição (40x);

10^4 : Fator de correção da Câmara de Neubauer;

1 mL: Volume da amostra;

Nº de células: Média do número de células contadas.

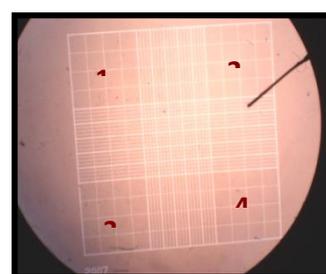
4



A



B



C

Figura 11: Contagem celular em câmara de Neubauer. Suspensão celular misturada com os corantes sendo adicionada a câmara **(A)**, a análise foi feita em microscópio óptico no aumento de 40X **(B)**, as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, indicados pelos números **(C)**.

4.6 Contagem diferencial dos Leucócitos

Para a contagem diferencial dos leucócitos também foram retirados 5 μL de sangue da cauda dos animais. Com esse volume de sangue foi realizado um esfregaço sanguíneo em uma lâmina de vidro com um auxílio de outra lâmina, com ângulo de 45° com a face superior. Foi feito um ligeiro movimento para trás, até encostar na gota de sangue, e então esperou-se alguns segundos até que a lâmina se difundisse por capilaridade (Figura 12). Após esse processo, arrastou-se a lâmina para frente para a realização do esfregaço. Esperou-se até que esse esfregaço secasse e este então foi corado com a coloração rápida (Panótico).

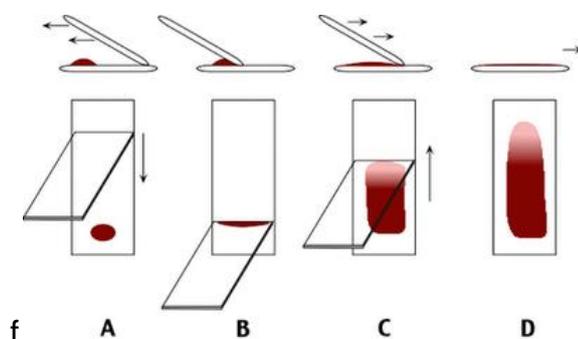


Figura 12: Preparo do esfregaço sanguíneo. **A-** Uma gota de sangue foi colocada em uma lâmina de vidro. **B-** Com o auxílio de outra lâmina, foi feito um ângulo de 45° com a face superior da lâmina e com um ligeiro movimento para trás, até encostar na gota de sangue, deixou-se que a gota se difundisse uniformemente, ao longo de toda borda por capilaridade. **C-** A lâmina foi arrastada para frente, formando o esfregaço. **D-** Esperou-se o esfregaço secar.

A coloração rápida consiste em três corantes sequenciais que facilitam a visualização das células brancas de defesa. A coloração rápida é composta pelo reagente 01, solução de triarilmetano 0,1%, reagente 02, solução de xantenos 0,1% e o reagente 03, solução de tiazina 0,1%. As lâminas foram submersas em cada um dos reagentes com um movimento para cima e para baixo durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada). Entre um reagente e outro esperou-se até que o reagente escorresse bem e, após o reagente 03, lavou-se a lâmina com água corrente.

Uma vez confeccionadas e coradas as lâminas, esperou-se que estas secassem ao ar. Foi realizada a diferenciação morfológica das células em

neutrófilos, linfócitos e monócitos, com o auxílio do microscópio ótico. Foram contadas um total de cem células e o valor expresso em porcentagem.

4.7 Avaliação da atividade do N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) – Presença de macrófagos

A avaliação da atividade da enzima NAG foi utilizada como índice da presença de macrófagos na pele. A pele do membro posterior isquêmico foi retirada com auxílio de tesoura e bisturi. O processamento consistiu na homogeneização da pele (previamente coletada e pesada nos dias 0, 1, 3 e 7 dias após a OAF) com homogeneizador de tecidos em solução salina 0,9%/ Triton x-100 0,1% v/v. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático. Para o ensaio enzimático, as amostras foram diluídas em tampão citrato/fosfato, pH 4,5. Em seguida, adicionou-se o substrato P-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida (Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato, pH 4,5, e incubou-se por 10 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi interrompida através da adição de tampão glicina 0,2 M, pH 10,6. A leitura da absorbância foi realizada em 400nm em um leitor de ELISA (Thermo Scientific).

4.8 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) – Presença de neutrófilos

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice da presença de neutrófilos na pele. Para o isolamento da enzima, a pele do membro posterior isquêmico (previamente coletada e pesada nos dias 0,1, 3, 7 após OAF) foi retirada com auxílio de tesoura e bisturi. Foi então homogeneizada com o homogeneizador de tecido em tampão fosfato pH 4,7 e centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e então foi adicionado NaCl 0,2% p/v ao precipitado remanescente; após incubação, foi adicionado NaCl 1,6% glicose 5% p/v e as amostras foram novamente centrifugadas. O precipitado remanescente foi ressuspendido em brometo de hexadeciltrimetilamonio 0,5% diluído em tampão fosfato, pH 5,4. Após homogeneização as amostras foram submetidas ao processo de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Para o ensaio enzimático, às amostras foi adicionado o substrato TMB diluído em DMSO seguindo-se um período de incubação. Após esse período, foi adicionado H₂O₂ 0,003% e as

amostras foram novamente incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida através da adição de H₂SO₄ 4M. A leitura da absorbância foi realizada em 450nm em um leitor de ELISA (Thermo Scientific).

4.9 Dosagem de citocinas

Para avaliar a expressão de citocinas (e quimiocinas), fragmentos de pele do membro posterior foram ressuspensos em 1,0 mL/ 100 mg de solução Tampão de extração de citocinas (PBS contendo inibidor de proteases: PMSF 0,1mM, cloreto de benzetônio 0,1mM, EDTA 10mM e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10000 rotações por minuto (rpm) e os sobrenadantes coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem. Os kits para citocinas foram obtidos da R&D System® e as instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas para as dosagens de CXCL1/KC, CCL2/MCP-1 e VEGF pelo método de ELISA.

4.10 Análises histopatológicas

Na ocasião da eutanásia, a pele do membro posterior isquêmico e não isquêmico foi coletada e fixada em uma solução de formaldeído 10%. Após um tempo mínimo de 24 horas de fixação, as amostras foram submetidas às etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia (5 µm - Micrótomo OLYMPUS, Alemanha) e as fatias de tecido foram coradas com Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma).

Após a preparação das lâminas, foi feita, sob objetiva de 20 e 40X em microscópio óptico (Olympus, Philippines), a análise qualitativa do infiltrado inflamatório. Foi realizado um escore inflamatório, considerando leve (+), moderado (++) e intenso (+++). As análises histopatológicas foram realizadas com auxílio do programa Image ProPlus, versão 4,0.

4.11 Isolamento dos Leucócitos do Sangue Total

O isolamento dos leucócitos totais foi realizado através do corte do plexo braquial dos camundongos. O sangue coletado foi colocado em um tubo de fundo cônico (Falcon) de 15,0 mL estéril contendo 3,0 mL do anticoagulante EDTA e o

volume foi completado com uma solução de lise de hemácias ACK (da expressão *Ammonium-Chloride-Potassium*). Após três minutos homogeneizando o tubo Falcon, este foi centrifugado a 1600 rpm durante dez minutos a 4°C e. O sobrenadante foi desprezado, o volume foi completado novamente com ACK e o procedimento repetido a fim de lisar mais hemácias e obter um sedimento mais puro. Após desprezar novamente o sobrenadante, foi acrescentado 13,0mL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 1600 rpm durante dez minutos a 4°C mais uma vez. Ao sedimento obtido, foi acrescentado 500µL de PBS, obtendo-se dessa forma uma suspensão de leucócitos, conforme mostrado na Figura 13.

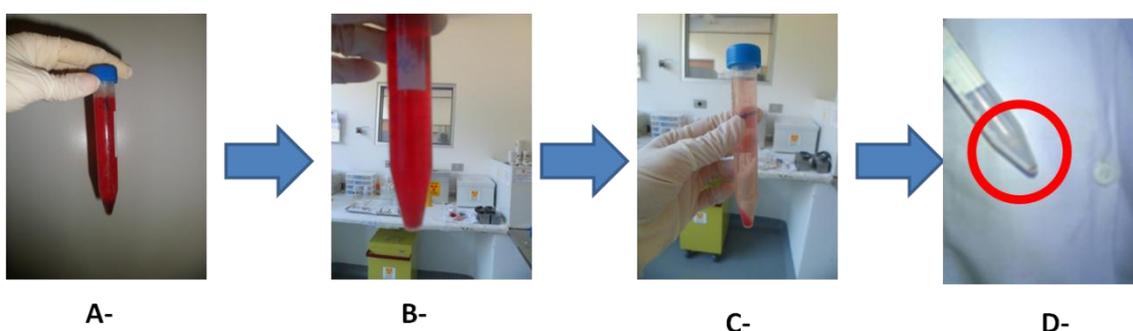


Figura 13: Procedimento para isolamento de leucócitos totais do sangue periférico. A- Sedimento concentrado de leucócitos formado após a primeira centrifugação do sangue coletado com solução de ACK. **B-** Segunda centrifugação do sangue com solução de ACK. **C-** Centrifugação do sangue com PBS. **D-** Sedimento formado de leucócitos.

4.12 Análise da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de exclusão do corante azul de Tripano durante a contagem celular na câmara de Neubauer. Por este método, as células mortas coram-se de azul já que sua membrana torna-se permeável ao corante, enquanto que a membrana das células viáveis não. Desta maneira, ao visualizar as células ao microscópio, observam-se as células mortas coradas em azul e as vivas transparentes. Para calcular o percentual de células viáveis, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer. O valor obtido foi multiplicado por 100 e, dessa forma, a viabilidade é dada em porcentagem.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totais}} \times 100$$

É importante destacar que a viabilidade celular deve ser maior que 85%, mostrando que o procedimento utilizado para o isolamento dos leucócitos totais foi executado da maneira correta.

4.13 Marcação do Etilenodicisteína Dietil Éster (ECD) com ^{99m}Tc

Um frasco com 1,0 mg de ECD fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) foi colocado em uma blindagem de chumbo. A este frasco foi adicionado 1,0 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9% estéril), 1,0 mL da solução contendo tampão fosfato de sódio e uma solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) contendo 1295 MBq (35 mCi) de atividade, conforme instruções contidas na bula. A solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) foi obtida de uma segunda eluição recente do gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m.

4.14 Marcação de leucócitos com ^{99m}Tc -ECD

O método utilizado para a marcação de leucócitos com ^{99m}Tc -ECD baseou-se na descrição de MARTIN-COMIN *et al.*, (2002) com modificações. No recipiente contendo os leucócitos previamente isolados, adicionou-se por gotejamento 2,0 mL de solução de ^{99m}Tc -ECD contendo 1073 MBq (29 mCi) de atividade. Após cinco minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de EDTA 2,2% e incubou-se as células por 15 minutos a 37°C. As células então foram centrifugadas a 1200rpm durante cinco minutos.

Para a determinação do rendimento da marcação, retirou-se uma alíquota de 10 μL do sobrenadante e 10 μL do sedimento. As alíquotas foram contadas em um Calibrador de dose CRC-15R (Capintec - U.S.A).

4.15 Imagens Cintilográficas com ^{99m}Tc -ECD-leucócitos

Após 1 e 3 dias da OAF, alíquotas de 3700 MBq (100 μCi) dos leucócitos radiomarcados (0,1 mL) foram injetadas na veia da cauda dos animais. Esses animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/Kg) e cetamina (60

mg/Kg), colocados em decúbito dorsal sob uma gama-câmara equipada com um colimador de baixa energia (Figura 14). Após 3h da injeção dos ^{99m}Tc -ECD-leucócitos foram obtidas imagens estáticas planares (10 minutos) usando uma matriz de 256X256 pixels (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria), Figura 14.



Figura 14: Gama-câmara para animais.

Fonte: Lab. de Radioisótopos/UFMG

As imagens foram analisadas determinando-se as contagens da radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento em torno do membro posterior isquêmico (alvo). Este ROI foi automaticamente copiado para o membro contralateral não isquêmico (não alvo), Figura 15. A relação alvo/não alvo foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Relação alvo/não alvo} = \frac{\text{contagem total alvo}}{\text{contagem total não alvo}}$$

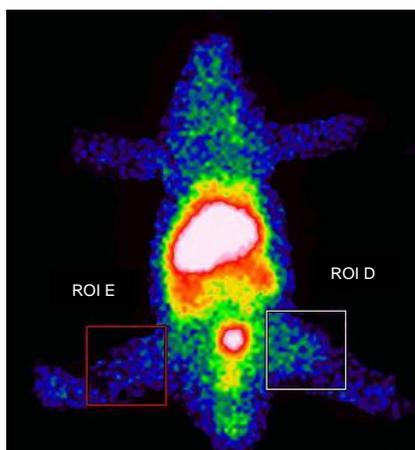


Figura 15: Imagem Representativa das Regiões de interesse (ROIs).

Fonte: Lab. de Radioisótopos/UFMG

4.16 Estudo ex vivo da pele do membro posterior

Após a obtenção da imagem cintilográfica de 3h, ainda sobre o efeito da anestesia, realizou-se nos animais dos grupos controle e diabético uma incisão torácica de forma que o coração estivesse com livre acesso para realização da perfusão no animal. Uma vez realizada a exposição do coração, foi feita uma pequena incisão no átrio direito para extravasamento do sangue e o tampão fosfato salina (PBS: 0,1M; pH 7,4) foi infundido no ventrículo esquerdo. Para a infusão do PBS no coração, a pressão foi controlada mimetizando a pressão arterial média do animal. O objetivo desse procedimento foi realizar uma lavagem de maneira a garantir que os leucócitos circulantes fossem eliminados do animal e que permanecessem apenas aqueles que se infiltraram nos tecidos. Sendo assim, foi realizada eutanásia por exsanguinação seguida de perfusão com PBS.

Em seguida, a pele do membro posterior e o membro posterior dos animais foram retirados, pesados e a radioatividade foi determinada utilizando o contador de poço Wizard (Turku, Finlândia), Figura 16. Utilizou-se padrões de dose para corrigir o decaimento físico do ^{99m}Tc e para calcular o percentual de dose injetada por grama de tecido (% DI/g), conforme a fórmula representada abaixo.

$$\% \text{ DI/g} = \frac{\text{cpm} * (\text{pele ou membro/g})}{\text{cpm do padrão}} \times 100$$

*cpm = contagem por minuto



Figura 16: Contador de radiação gama – Wizard (Turku/Finlândia)

Fonte: Lab. de Radioisótopos/UFMG

4.17 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados da cinética após a OAF foram analisados utilizando-se o teste de análise de variância de dois fatores (ANOVA de duas vias), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para o restante dos dados, imagens cintilográficas e imagem *ex vivo* da pele do membro posterior isquêmico, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram feitas utilizando-se o Graph Pad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da isquemia tecidual de membros posteriores

Para promover a isquemia tecidual de membros posteriores, realizou-se a OAF unilateral (membro posterior esquerdo) em camundongos Balb/C diabéticos e não diabéticos. Para confirmar a redução do fluxo sanguíneo após a OAF, utilizou-se a técnica de Imagem de Perfusão por Laser Doppler – LDPI (da expressão inglesa *Laser Doppler perfusion imaging*). Como demonstrado na figura 17, a cinética de avaliação de fluxo sanguíneo revelou que, imediatamente após a OAF, houve uma redução do fluxo sanguíneo do membro posterior, que se manteve ao longo de todo o experimento, levando a um quadro de isquemia tecidual deste membro. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos.

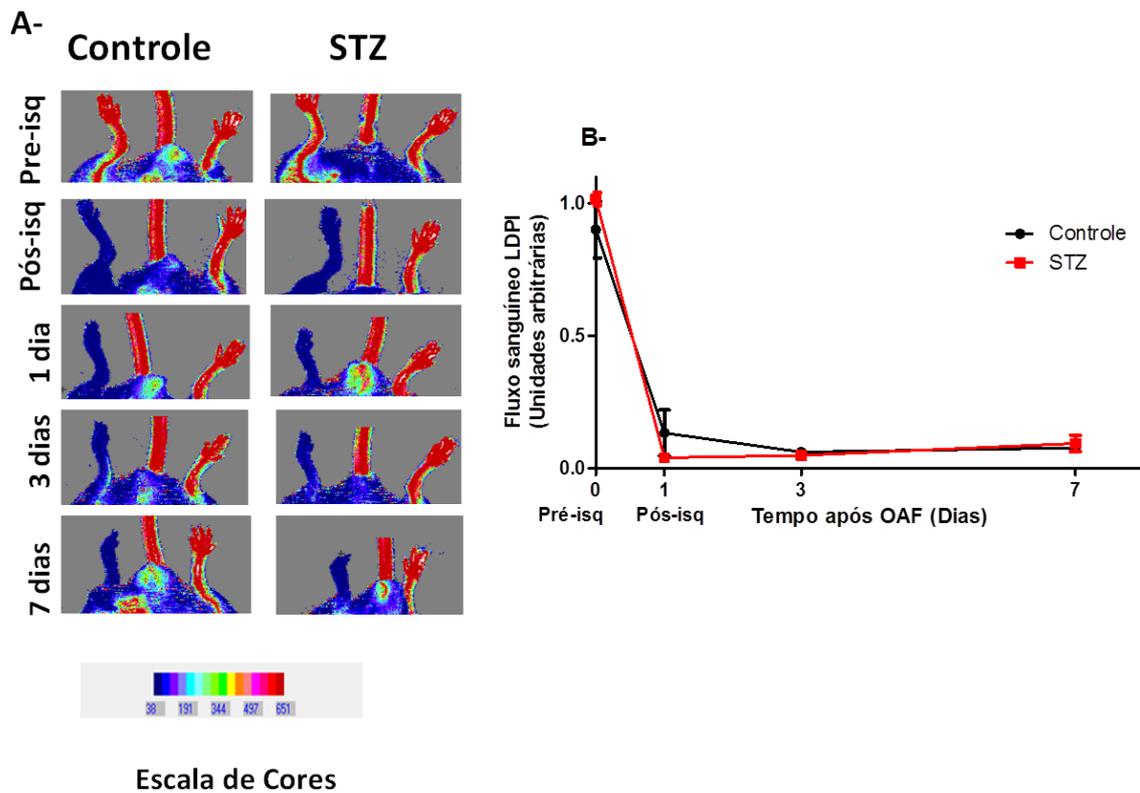


Figura 17: Avaliação do Fluxo Sanguíneo de membro posterior através da imagem de perfusão por laser Doppler. (A) Imagens representativas do fluxo sanguíneo no membro isquemiado de camundongos diabéticos e não diabéticos por LDPI (*Laser Doppler perfusion imaging*), antes (pré-isquêmico), imediatamente após (pós-isquêmico) e 7 dias após OAF. A cor azul escura indica pouca ou nenhuma perfusão sanguínea e a vermelha indica perfusão sanguínea máxima. **(B)** Cinética de avaliação do fluxo sanguíneo no membro isquemiado nos tempos de 1, 3 e 7 dias após a OAF. Os valores foram obtidos pela razão entre a medida do fluxo sanguíneo do membro isquêmico pelo não-isquêmico. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ camundongos por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.2 Avaliação da inflamação na pele

Após a OAF, o sangue, bem como a pele isquêmica do membro posterior foram coletados nos dias 0, 1, 3 e 7 para avaliar a inflamação. O componente inflamatório em camundongos diabéticos e não diabéticos foi determinado pela contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico, pela estimativa da presença de neutrófilos e macrófagos na pele isquêmica, através da análise da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente. Além disso, avaliou-se a concentração das principais quimiocinas envolvidas no recrutamento destas células CXCL1 (neutrófilo) e CCL2 (macrófago) e avaliação histopatológica de cortes da pele de membro isquêmico corados com H&E.

Conforme demonstrado na Figura 18, a contagem total de células do sangue periférico revelou que o grupo diabético (STZ) apresenta uma redução no número de células circulantes, evidenciado principalmente no 3º dia após OAF ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo controle (não diabético). Ainda, no grupo diabético não observou-se o pico no terceiro dia após a OAF, conforme observado no grupo controle. Em relação a contagem diferencial de neutrófilos no sangue, observou-se diferenças significativas entre os grupos apenas no dia 0 (antes da OAF) quando comparado ao grupo controle, entretanto não houve diferença em relação aos monócitos em nenhum dos tempos analisados (Tabela 2).

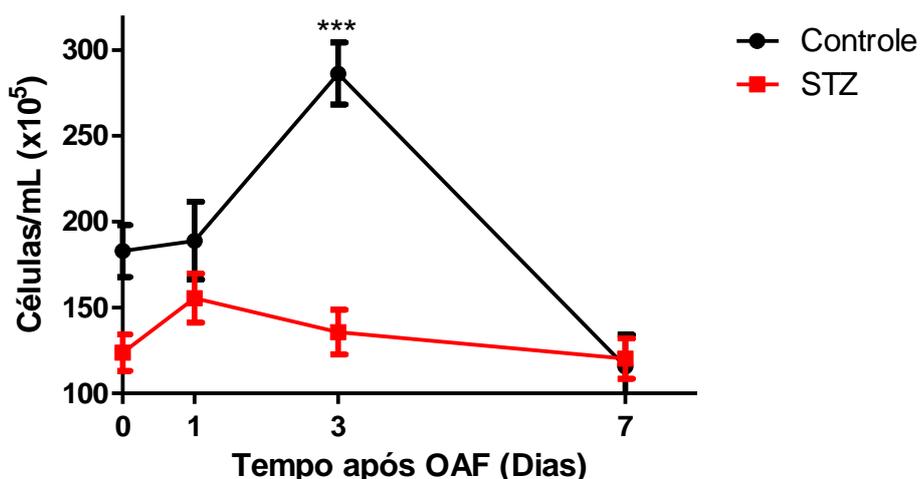


Figura 18: Contagem total de leucócitos do sangue periférico diluídos na solução de Turk e contados na Câmara de Neubauer. A contagem total de leucócitos do sangue foi avaliada nos tempos 0, 1, 3 e 7 dias após a OAF. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., n=5 camundongos por grupo, ANOVA de duas vias, ***p<0,001.

	Neutrófilos		Monócitos	
	Controle	STZ	Controle	STZ
Dia 0	29,40 \pm 1,57**	40,33 \pm 2,33	3,67 \pm 0,50	4,20 \pm 1,07
Dia 1	25,33 \pm 2,67	31,50 \pm 0,50	7,67 \pm 1,36	6,00 \pm 1,15
Dia 3	41,00 \pm 1,53	39,20 \pm 4,04	4,00 \pm 1,05	3,20 \pm 0,80
Dia 7	19,50 \pm 1,85	31,75 \pm 5,98	6,25 \pm 0,85	5,40 \pm 0,93

Tabela 2: Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico. O esfregaço foi confeccionado e corado pelo corante rápido Panótico®. A contagem foi realizada nos dia 0, 1, 3 e 7 dias após a OAF. A porcentagem de neutrófilos no sangue apresentou diferença significativa entre os grupos apenas no dia 0, **p<0,01, e em relação aos monócitos não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dias analisados. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., n=5 camundongos por grupo, teste t de Student.

A avaliação histopatológica qualitativa dos cortes da pele do membro isquemiado de camundongos diabéticos revelou um infiltrado de leucócitos de leve (+) a intenso (+++), enquanto que o grupo controle apresentou um leve infiltrado inflamatório (+) logo no primeiro dia após a OAF. Esse padrão foi, entretanto, invertido no terceiro dia após a OAF, quando observou-se reduzido infiltrado inflamatório na pele dos animais diabéticos (Tabela 3 e Figura 19).

Controle		Diabético	
1 dia após OAF	3 dias após OAF	1 dia após OAF	3 dias após OAF
+	+++	+++	+

Tabela 3: Escore Inflamatório. O escore foi realizado através da análise qualitativa de lâminas de pele de membro posterior isquêmico em modelo experimental de DM1, coradas com H&E e analisadas em microscópio ótico na objetiva de 40X.

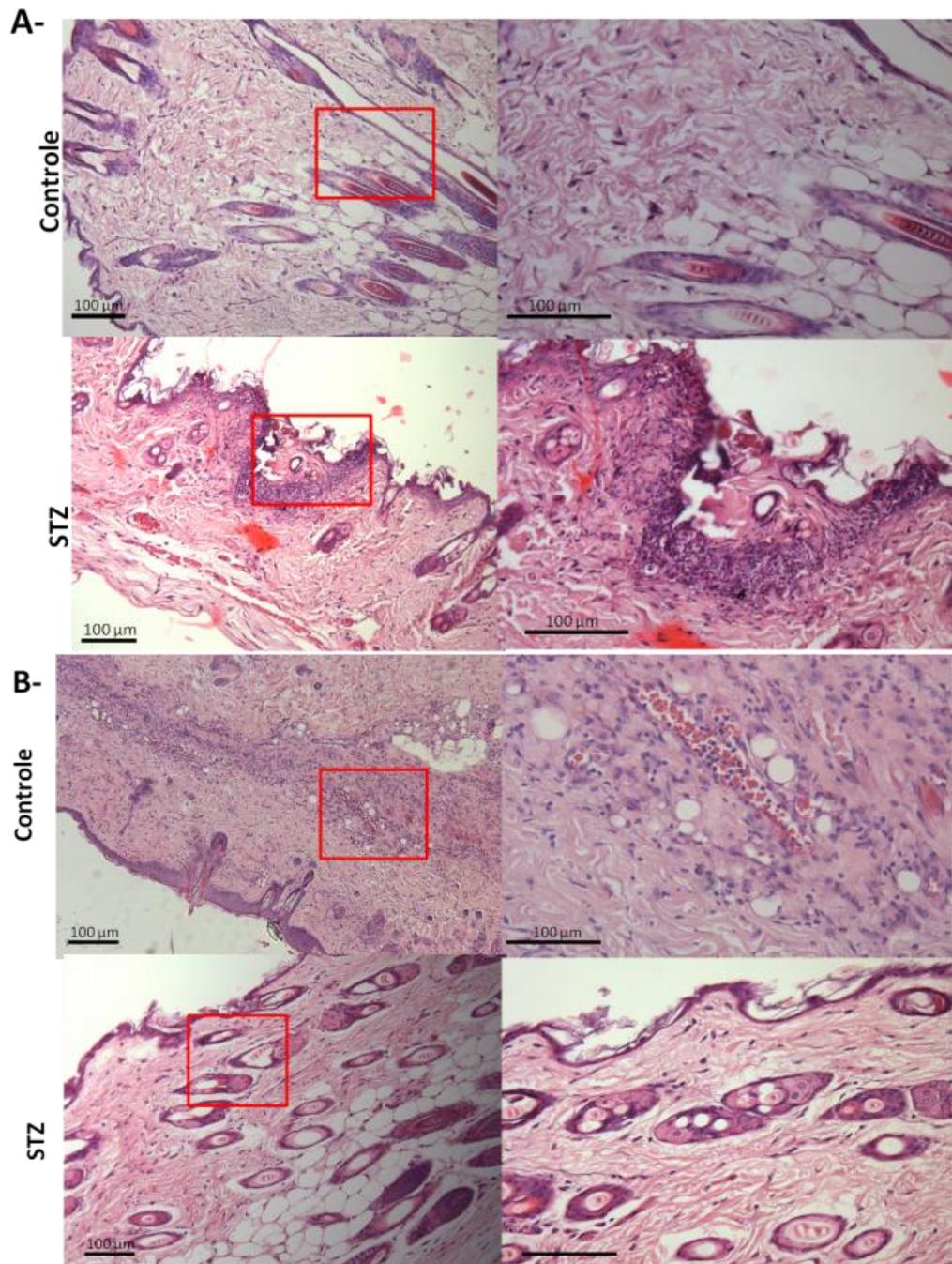


Figura 19: Cortes histopatológicos corados por H&E. Imagens representativas dos cortes nos aumentos de 20 e 40x. Imagens mostram o infiltrado de células inflamatórias **(A)** 1 dia após a OAF e **(B)** 3 dias após a OAF.

Observa-se pela Figura 20-A, que a cinética da atividade do MPO, representando o infiltrado de neutrófilos, no grupo controle revelou no 1º dia, uma redução significativa ($p < 0,05$) do infiltrado de neutrófilos, quando comparado ao grupo diabético. Ainda, no grupo controle, ocorreu um aumento do infiltrado de neutrófilos, atingindo um pico no 3º dia que se mantém até o 7º dia após OAF ($p < 0,001$). Em contraste, o grupo diabético, apresentou níveis reduzidos de MPO nos tempos 3 ($p < 0,001$) e 7 ($p < 0,001$) após a OAF, quando comparados ao grupo controle. Com relação à concentração da quimiocina CXCL-1 (principal quimiocina recrutadora de neutrófilos) avaliada na pele do membro posterior isquemiado dos camundongos, observou-se que no grupo diabético há um aumento na concentração desta quimiocina, atingindo um pico significativo no 1º dia, que posteriormente diminui no 3º dia ($p < 0,001$) e mantém até o 7º dia após a OAF (Figura 20-B).

Observa-se pela Figura 20-C, representando o infiltrado de macrófagos, que no dia 0 e no 3º dia após a OAF ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), a pele do membro posterior dos animais diabéticos apresentou aumento significativo de infiltrado de macrófagos, quando comparado ao controle. Com relação à quimiocina CCL2 (principal quimiocina recrutadora de macrófagos), observa-se também aumento significativo no dia 0 e no 3º dia após a OAF na pele dos animais diabéticos ($p < 0,05$), Figura 20-D.

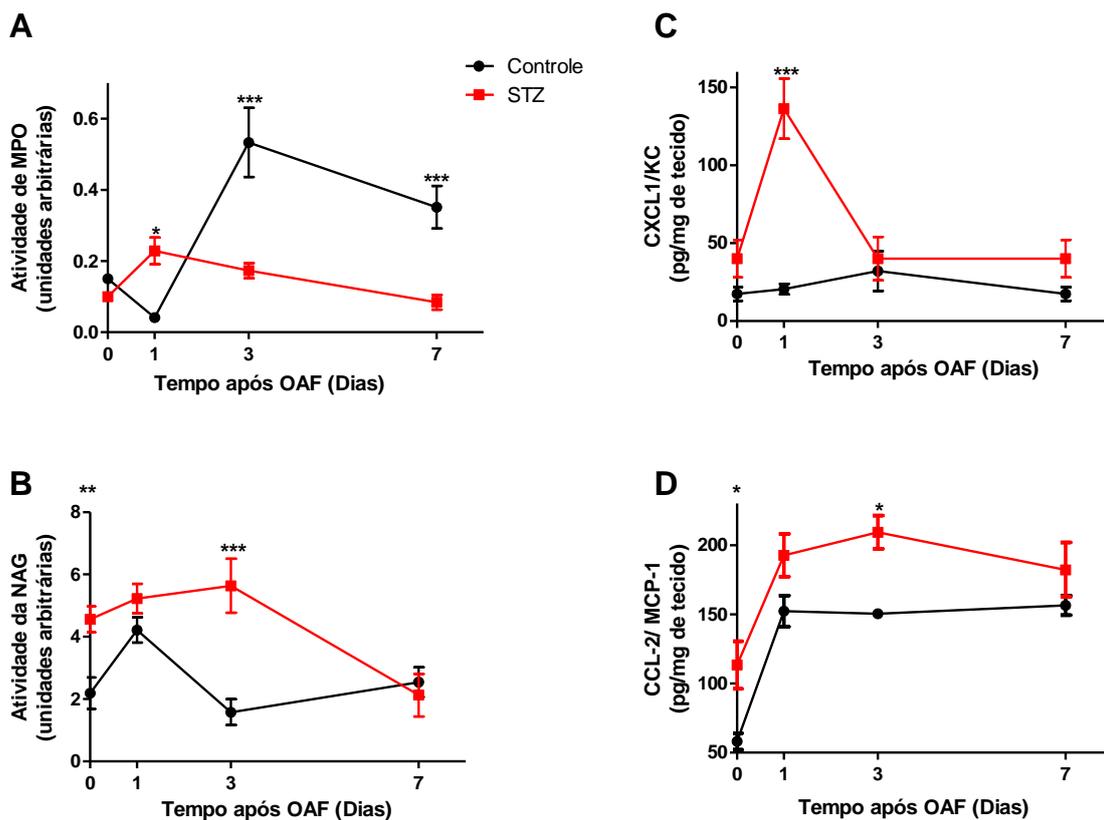


Figura 20: Cinética do Infiltrado de neutrófilos e macrófagos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos. (A) Detecção enzimática de neutrófilos pela avaliação da atividade do MPO e (B) detecção enzimática de macrófagos pela avaliação do NAG nos tempos 1, 3 e 7 dias após a OAF. A principal quimiocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos, CXCL1 (C), assim como a principal quimiocina responsável pelo recrutamento macrófagos, CCL2 (D), foram detectadas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ camundongos por grupo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. Controle, ANOVA de duas vias.

5.3 Avaliação dos níveis de VEGF na pele

A cinética do VEGF revelou que o grupo diabético apresenta uma menor concentração de VEGF se comparado ao grupo controle, durante todo experimento. No primeiro dia após a OAF, o grupo controle apresentou um pico na concentração de VEGF e esta concentração continuou alta até o sétimo dia. O grupo diabético também apresentou um pico no primeiro dia, mas este foi significativamente menor do que o controle (** $p<0,01$) no primeiro dia, assim como nos dias 3 e 7 (** $p<0,01$), conforme mostrado na Figura 21.

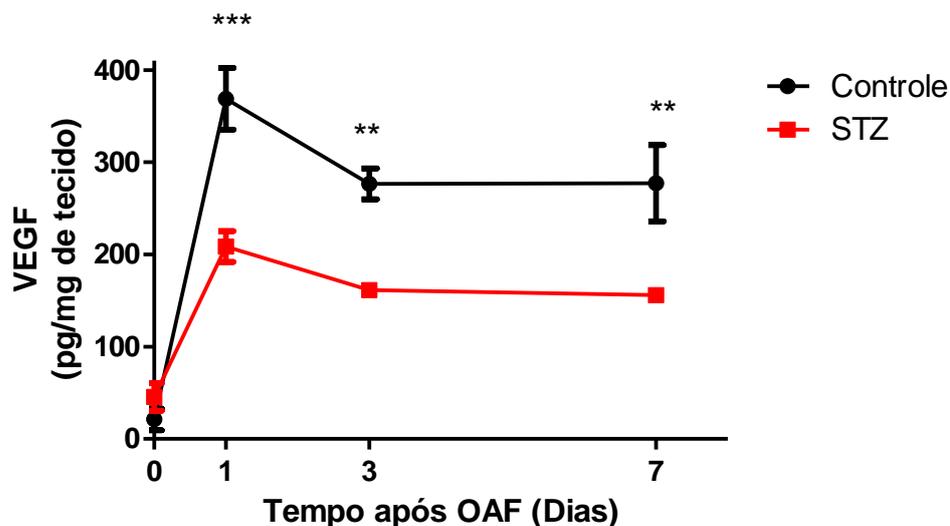


Figura 21: Concentração de VEGF na pele do membro posterior isquêmico. Determinação da concentração do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) nos tempos 0, 1, 3 e 7 após a OAF. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., n=5 camundongos por grupo, ***p<0,001, **p<0,01, ANOVA de duas vias.

5.4 Emprego de leucócitos radiomarcados

Os leucócitos radiomarcados (^{99m}Tc -ECD-Leucócitos) foram utilizados para avaliar a atividade inflamatória nos membros posteriores de animais diabéticos (STZ) e não diabéticos (Controle), por meio de imagens cintilográficas e por estudo *ex vivo*.

5.4.1 Imagens Cintilográficas

As imagens cintilográficas foram realizadas com o objetivo de avaliar a captação dos leucócitos radiomarcados na região de interesse. As imagens foram obtidas por gama-câmara 3h após a injeção dos ^{99m}Tc -ECD-leucócitos, 1 e 3 dias após a oclusão da artéria femoral (OAF). As imagens representativas (Figura 22) mostraram alta captação de radioatividade no fígado e baço e discreta captação nos pulmões, o que está de acordo com a biodistribuição fisiológica dos leucócitos radiomarcados.

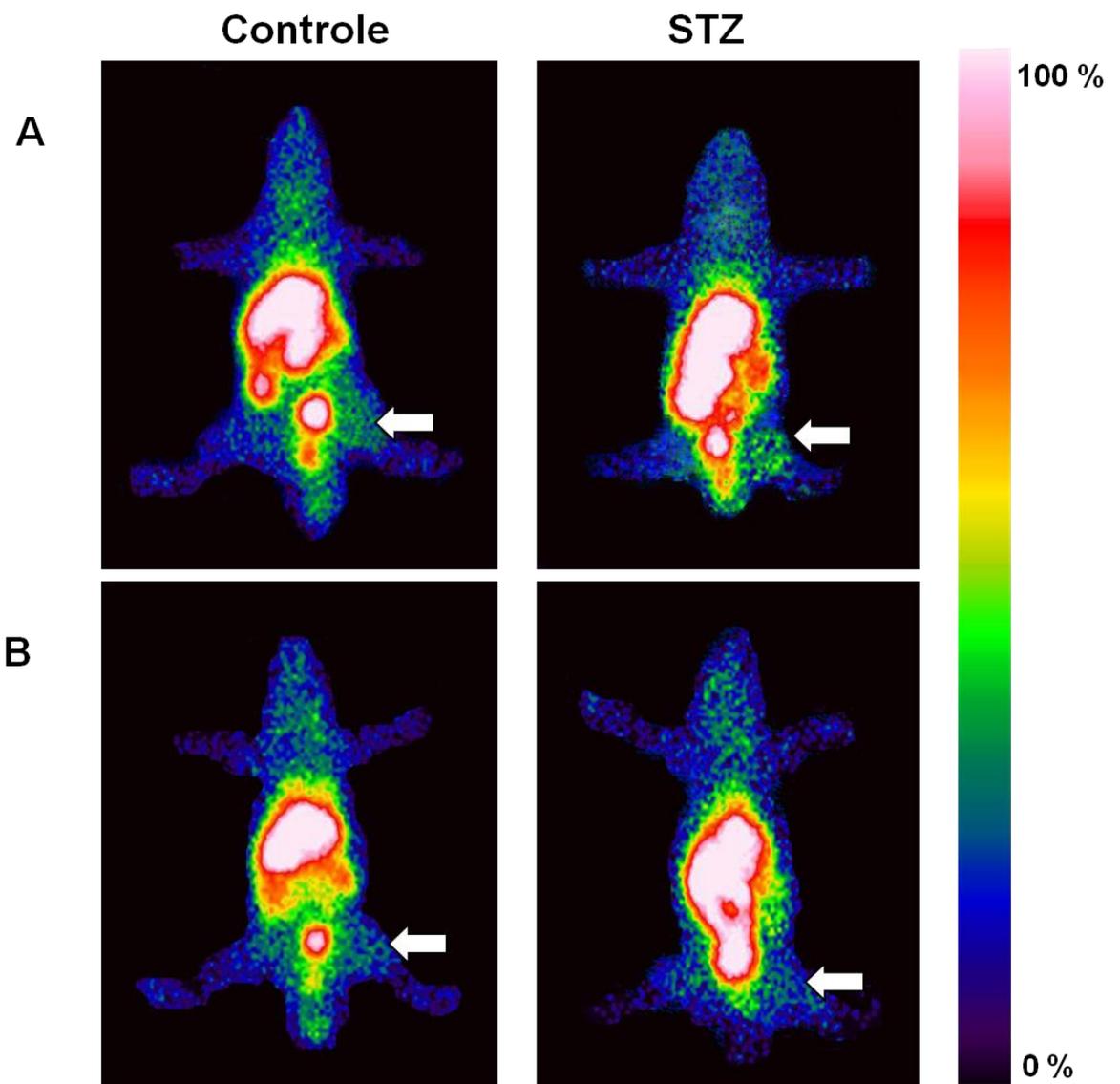


Figura 22: Imagens cintilográficas (visão anterior) de camundongos controle e STZ 3 h após a injeção de ^{99m}Tc -ECD-Leucócitos (n=5). A – 1 dia após a isquemia. B – 3 dias após OAF. Os locais da isquemia estão indicados pelas setas, n=5 animais por grupo.

Observa-se também que, há um aumento de captação dos ^{99m}Tc -ECD-leucócitos nos membros dos animais que tiveram a OAF dos grupos controles (controle isquêmico) e STZ (STZ isquêmico) quando comparados com os membros contralaterais (não isquêmico) (Figura 23). Em nenhum dos grupos de animais investigados foi observado captação da radiação pela glândula tireóide, indicando que a ^{99m}Tc -ECD-leucócitos são viáveis e possuem estabilidade *in vivo*.

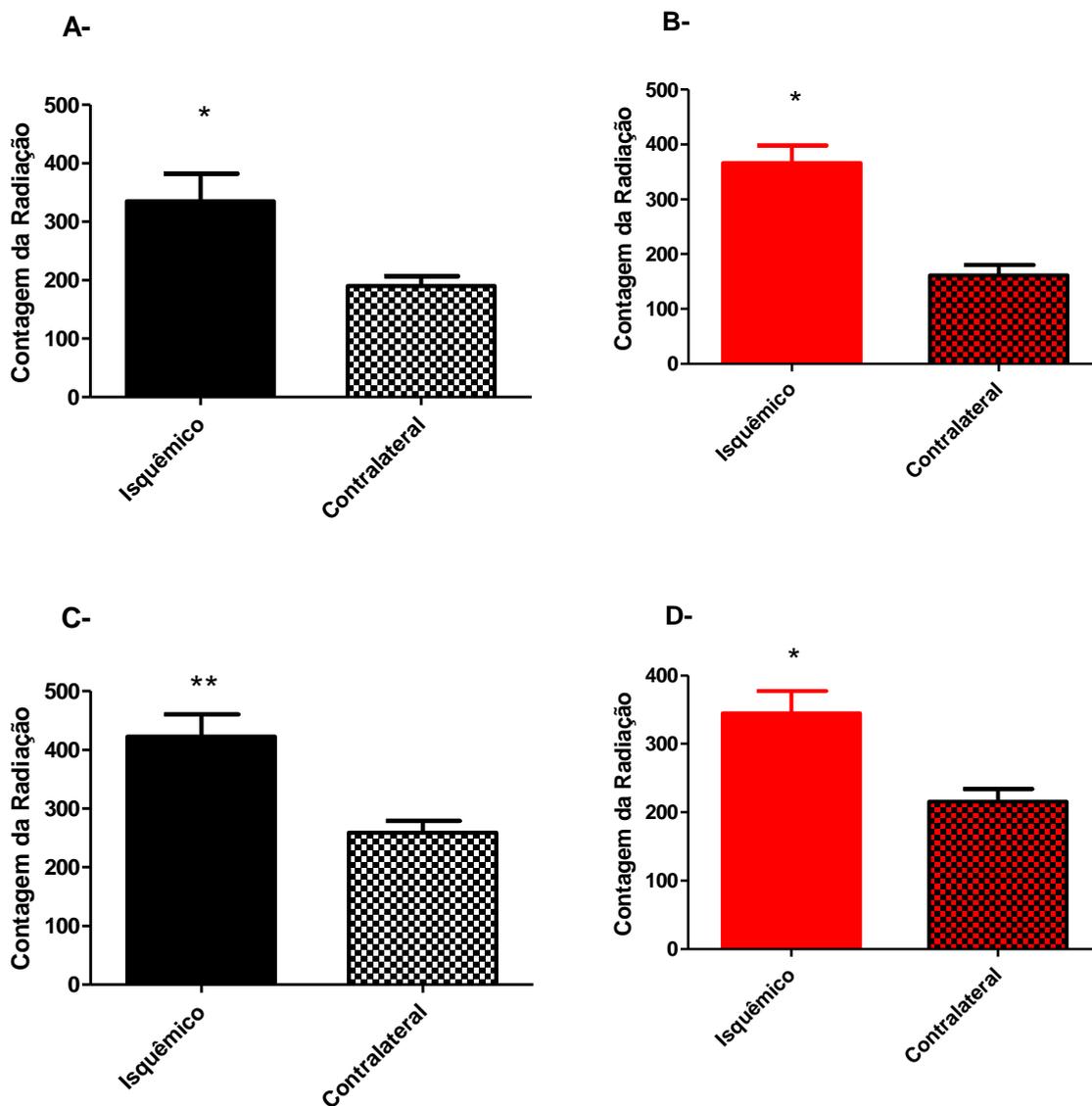


Figura 23: Contagem da radiação dos $^{99m}\text{Tc-ECD-Leucócitos}$ nos membros posteriores com OAF e sem OAF nos grupos controle e STZ, 3 horas após a injeção. A- Grupo Controle: contagem da radiação 1 dia após a OAF. B- Grupo Diabético: contagem da radiação 1 dia após a OAF. C- Grupo Controle: contagem da radiação 3 dias após a OAF. D- Grupo Diabético: contagem da radiação 3 dias após a OAF. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ camundongos por grupo, $p<0,01$, $*p<0,05$, teste t de Student.**

Para a comparação entre os grupos, realizou-se a análise quantitativa das imagens cintilográficas, através da relação alvo (membro isquêmico) e não alvo (membro não isquêmico). Esta relação mostrou valores de $1,58 \pm 0,12$ e $1,55 \pm 0,15$ para o controle e o grupo STZ, respectivamente, no tempo de 1 dia após e OAF. Não houve diferença significativa entre os grupos investigados. Após 3 dias da OAF essa relação foi de $1,67 \pm 0,20$ e $1,42 \pm 0,12$ para o grupo controle e diabético, respectivamente. Também não foram observadas diferenças significativa entre os grupos, Figura 24.

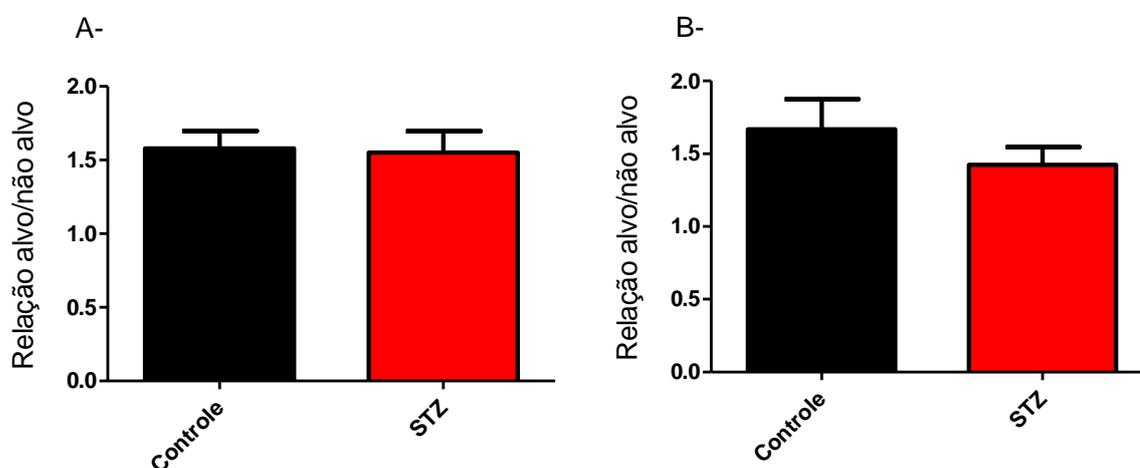


Figura 24: Relação alvo/não alvo dos membros posteriores após oclusão da artéria femoral em modelo experimental de Diabetes Tipo 1, 3 horas após a injeção de $^{99m}\text{Tc-ECD}$ -leucócitos. **A-** Contagem obtida 1 dia após a OAF. **B-** Contagem obtida 3 dias após a OAF. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ camundongos por grupo, teste t de Student. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.4.2 Estudo *ex vivo* da pele do membro posterior isquêmico

Após a perfusão no animal, retirou-se a pele do membro posterior e o próprio membro posterior (composto de músculo e osso) para avaliar a captação dos leucócitos radiomarcados com $^{99m}\text{Tc-ECD}$, entre os grupos controle e diabéticos 1 e 3 dias após a OAF, como mostra a Figura 25. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre a pele do membro posterior isquêmico 1 e 3 dias após a OAF nos grupos controle e STZ. O mesmo ocorrendo no membro posterior isquêmico sem a pele 1 e 3 dias após a OAF nos grupos controle e STZ.

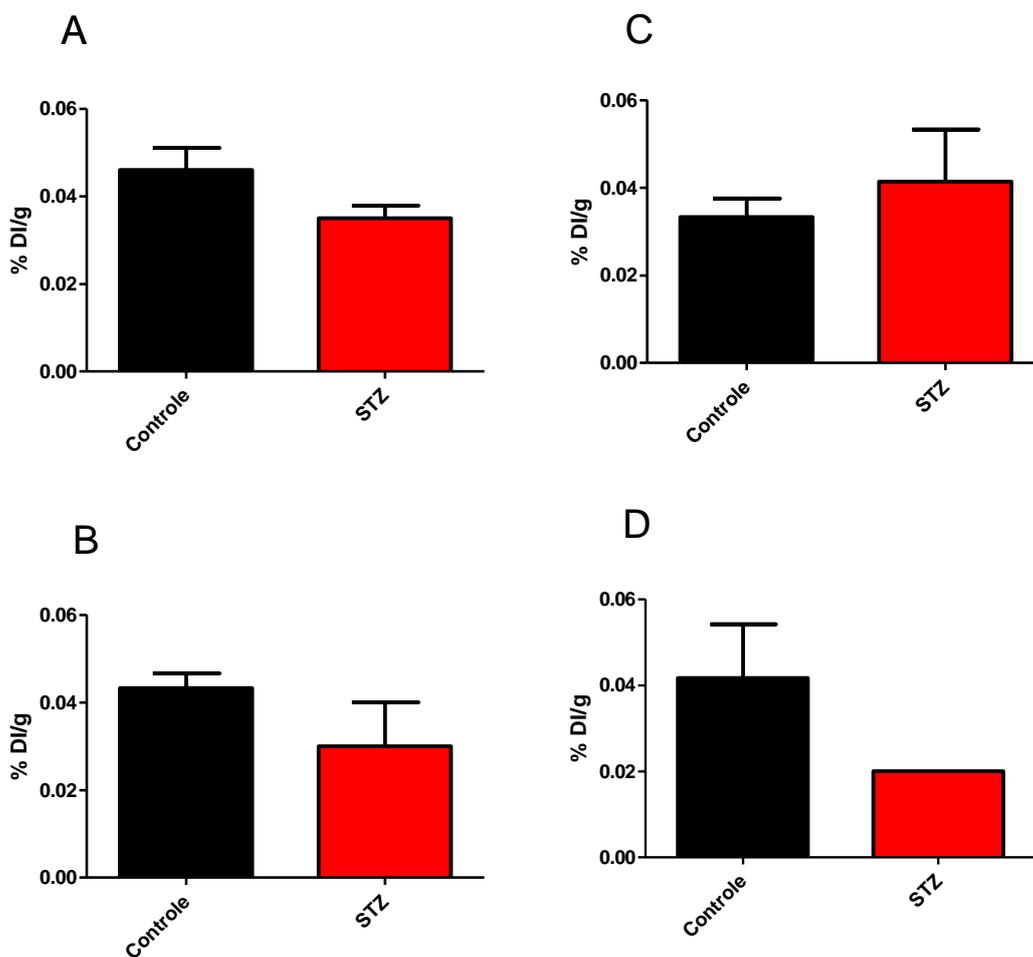


Figura 25: Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos controle e STZ. A- Pele do membro posterior isquêmico 1 dia após a OAF. **B-** Pele do membro posterior isquêmico 3 dias após a OAF **C-** Membro posterior isquêmico sem a pele 1 dia após a OAF. **D-** Membro posterior isquêmico sem a pele 3 dias após a OAF. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., n=5 camundongos por grupo, teste *t* de Student.

Ainda, para avaliar se houve diferença significativa entre os dias analisados, comparou-se a porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) entre os dias 1 e 3 após a OAF, como mostrado na Figura 26, mas não houve diferença significativa entre os dias.

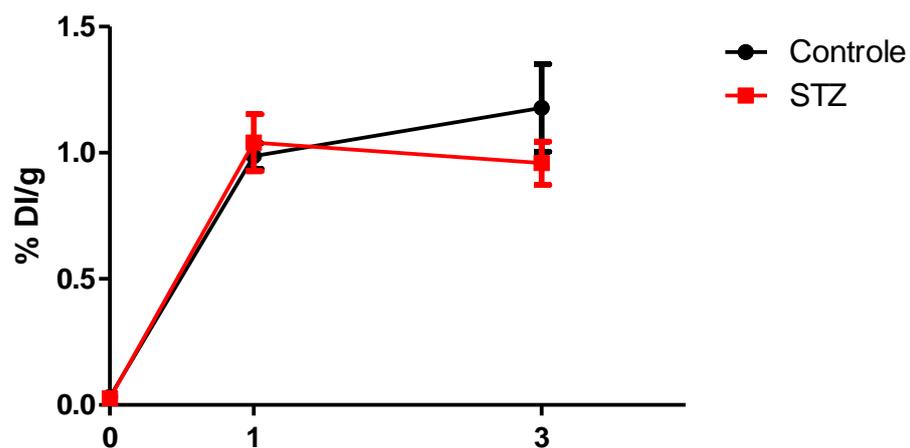


Figura 26: Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos controle e STZ entre os dias 0, 1 e 3 após a OAF. Não houve diferença estatística entre os dias. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., n=5 camundongos por grupo, Anova.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve um aumento na prevalência do diabetes *mellitus* em todo o mundo e projeta-se que esta incidência continuará aumentando (O'LOUGHLIN *et al.*, 2010). Dentre as principais causas de morte relacionadas ao DM, cerca de 50% são decorrentes de doenças cardiovasculares (HOWANGYIN; SILVESTRE, 2014a). O DM é considerado fator de risco maior para a doença aterosclerótica oclusiva das extremidades inferiores, a Doença Arterial Periférica, fazendo com que os pacientes diabéticos sejam mais suscetíveis a eventos isquêmicos, seguidos de ulceração da pele e amputação do membro inferior (THIRUVOIPATI, 2015).

Embora a maioria dos estudos tenham como alvo a avaliação da cicatrização da ferida diabética já instalada (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; GUO; DIPIETRO, 2010), a avaliação da pele íntegra diabética associada à isquemia de membro não tem sido relatada. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar as alterações que ocorrem na pele de membros isquêmicos de camundongos diabéticos, especialmente decorrentes da resposta inflamatória, com a finalidade de entender as alterações morfofuncionais que ocorrem e que podem levar a surgimento de feridas cutâneas. Além do entendimento do processo de cicatrização de feridas, também torna-se necessário a compreensão da fisiologia da pele íntegra, que sofre influência tanto do DM quanto da isquemia.

A pele representa a interface entre o organismo e o ambiente, exercendo não apenas função de barreira mecânica, como também é responsável pela primeira linha de defesa imunológica contra agentes infecciosos. Entretanto, reações imunológicas desreguladas podem causar doenças inflamatórias na pele (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). Sendo assim, é de fundamental importância compreender uma pele saudável e doente antes do surgimento das feridas, uma vez que, esse pode ser o início para futuras intervenções terapêuticas ou preventivas de lesões. O modelo experimental utilizado é inovador, pois propõe pela primeira vez avaliar a pele íntegra de animais diabéticos após indução da isquemia, buscando investigar precocemente as alterações que ocorrem na pele de um membro isquêmico.

A isquemia tem sido apontada como fator contribuinte para 90% dos casos de amputações em DM, sendo que um mau controle da glicose pode acelerar as manifestações da DAP. A cada 1% de aumento na hemoglobina glicada (HbA1c) corresponde a um aumento de 25-28% no risco relativo para a DAP, com prejuízo na perfusão dos membros inferiores dos pacientes diabéticos (LEPÄNTALO *et al.*, 2011).

No presente trabalho, a avaliação do fluxo sanguíneo no modelo de isquemia de membro posterior induzido pela oclusão unilateral da artéria femoral (OAF) foi realizada pela imagem de perfusão por Laser Doppler, que é a ferramenta de escolha em estudos pré-clínicos (KHAN, 2006). Imediatamente após a OAF houve a redução do fluxo sanguíneo para valores próximos a zero no membro isquêmico, que permaneceu durante todo o experimento tanto no grupo controle quanto no diabético. Esse dado demonstra que ambos os grupos estavam submetidos às mesmas condições de ausência de fluxo sanguíneo para os membros posteriores, bem como sugere que a principal variável do nosso estudo era a presença ou não do diabetes. Vale salientar que, nos dois grupos ocorreu autoamputação do membro posterior após o 7º dia da OAF, o que inviabilizou a ampliação do período experimental para além de 7 dias.

Esse dado vai também de acordo com a literatura, que diz que animais da linhagem Balb/C tem uma pior recuperação da perfusão sanguínea em modelos experimentais de isquemia de membros posteriores, quando comparados aos animais da linhagem C57/BL6 (DOKUN *et al.*, 2015). Em um estudo comparativo, MARQUES *et al.* (2014) mostraram que camundongos Balb/C apresentam uma concentração significativamente menor da citocina pró-angiogênica VEGF e da formação de novos vasos colaterais em relação ao C57/BL6 nos implantes de esponja introduzidos na cavidade peritoneal. Acreditamos que a isquemia e a resposta inflamatória tenham sido muito intensas para o modelo experimental utilizado, de modo que, caso seja empregado outra linhagem, como o C57/BL6, a resposta poderia ser diferente.

Evidências experimentais sugerem que defeitos na regulação do VEGF estão associadas com distúrbios nos processos de cicatrização de feridas, assim como altos níveis de glicose no sangue, atraso no infiltrado celular, isquemia local, bem

como a diminuição do colágeno e da sua organização (ALTAVILLA *et al.*, 2001). De fato, nossos resultados mostram que o grupo diabético possui uma menor concentração de VEGF quando comparado ao grupo controle durante toda a cinética do experimento. Corroborando esse achado, um estudo realizado em pacientes diabéticos, mostrou que estes apresentam um *down regulation* do receptor de VEGF nos ventrículos quando comparados a pacientes não diabéticos, sugerindo que a formação de vasos colaterais em diabéticos é prejudicada (CHOU *et al.*, 2001).

A limitação do modelo experimental utilizado, se dá pelo fato do não desenvolvimento da ferida diabética isquêmica de maneira espontânea, não sendo possível afirmar que mesmo nas condições propícias (DM e DAP), ocorreria a abertura da ferida. Não há modelo experimental em que ocorra a abertura de ferida espontaneamente. Nos modelos experimentais existentes, estas são confeccionadas e, portanto, esse modelo foi escolhido como primeiro passo para estudar as alterações na pele íntegra. Como ainda não há na literatura estudos a respeito, os períodos de tempo (isto é, horas/dias após a OAF) escolhidos para as análises após a OAF foram baseados no tempo de fechamento das feridas diabéticas isquêmicas em modelo experimental desenvolvido por BARCELOS, *et al.* (2009).

O processo fisiológico de cicatrização de feridas ocorre em fases que se superpõe, mas que são didaticamente divididas em: inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Durante a fase inflamatória, ocorre migração de leucócitos, na qual ocorre primeiramente um recrutamento de neutrófilos e posteriormente um recrutamento de monócitos, que se diferenciarão em macrófagos sob o estímulo de algumas substâncias como o interferon- γ (IFN- γ) (ISAAC *et al.*, 2010).

A isquemia, mesmo na ausência de lesão, desencadeia respostas moleculares e celulares que irão determinar o remodelamento do tecido isquêmico. A isquemia leva a hipóxia, sendo que a principal via de sinalização envolve a ativação do fator de induzido pela hipóxia (HIF). Além disso, a isquemia também desencadeia resposta inflamatória, na qual vários tipos de células inflamatórias são recrutadas para o local da isquemia, onde estas desempenham papel ativo no remodelamento vascular e tecidual (SILVESTRE; SMADJA; LÉVY, 2013). No caso de pacientes diabéticos, ocorre prejuízo nesses processos em decorrência de uma menor capacidade em lidar com a hipóxia. Há menor produção de HIF e de VEGF, e

consequentemente menor capacidade de formar novos vasos para suprir a demanda de oxigênio e responder a lesão com células inflamatórias (HOWANGYIN; SILVESTRE, 2014).

Sendo assim, para avaliar o componente inflamatório, foi determinada a contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue periférico, a concentração das principais quimiocinas envolvidas no recrutamento destas células CXCL1 (neutrófilo) e CCL2 (macrófago). Também foram estimadas a presença de neutrófilos e macrófagos na pele isquêmica, através da análise da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente, e foi realizada a avaliação histopatológica de cortes da pele de membro isquêmico corados com H&E.

A contagem total de leucócitos do sangue periférico do grupo diabético mostrou-se significativamente menor em relação ao grupo controle apenas no 3º dia, e diferença entre os grupos apenas no dia 1 após a OAF entre os neutrófilos. Por outro lado, um estudo recente realizado com pacientes diabéticos do tipo 2 (entre 40 e 74 anos) associou a inflamação com o desenvolvimento das complicações diabéticas. Este trabalho mostrou que os pacientes diabéticos apresentaram uma contagem de leucócitos totais significativamente maior do que o grupo controle e também uma contagem maior de granulócitos, se comparado ao outro grupo, que era não diabético, sugerindo que a ativação crônica do sistema imune desempenha um papel importante na patogênese e progressão do DM2 (PLACZKOWSKA *et al.*, 2014). Talvez essa diferença seja observada em função da diferença do tipo de diabetes, na qual, talvez, a ausência da insulina possa interferir. Ou ainda pode ser decorrente da presença ou ausência da isquemia, que não foi avaliada.

No tecido inflamado, os mediadores químicos, como a quimiocina CXCL1, estimulam o recrutamento para o local. Estes, por sua vez, possuem grânulos que contêm principalmente a enzima MPO (MÓCSAI, 2013). O MPO tem sido comumente utilizado para determinação indireta da acumulação de neutrófilos (MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985). O mesmo ocorre com os macrófagos, que são também atraídos por mediadores químicos, principalmente pelo CCL2 e contém altas concentrações da enzima NAG (BARCELOS, L. S. *et al.*, 2004), e vem sendo utilizado como marcador indireto da acumulação de macrófagos ativados (CAROLLO *et al.*, 2001).

Ao avaliar a pele dos animais nos diferentes dias após a isquemia, observou-se através de cortes histopatológicos corados por H&E que o grupo diabético apresenta um aumento do infiltrado inflamatório no 1º dia após a OAF, e que regride no 3º dia, e no grupo controle, esse aumento ocorreu apenas no 3º dia após a OAF. Essa diferença pode ser decorrente de um estado prévio já pró-inflamatório do diabético, em decorrência da hiperglicemia causando disfunção do endotélio (ALTABAS, 2015), mas que não consegue responder adequadamente a uma inflamação aguda, pois não se mantém durante o experimento.

Uma vez demonstrado que há aumento no infiltrado inflamatório na pele, decidiu-se investigar quais eram as células responsáveis por essa resposta. Sendo assim, analisamos o infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Observamos que há um pico na concentração da principal quimiocina recrutadora de neutrófilos, CXCL1, no 1º dia após a OAF e que este pico coincide com o pico de infiltração de neutrófilos (MPO) que ocorre no mesmo dia. Aparentemente, este precisa de menos estímulo quimiotático para o recrutamento de neutrófilos, pois, mesmo com concentrações não tão altas de CXCL1 em termos relativos quando comparados aos animais diabéticos, há grande quantidade desse tipo celular na pele dos animais do grupo controle no dia 3 e 7 após a OAF.

No mesmo sentido, mas para avaliar o infiltrado de macrófagos, observou-se que o grupo diabético apresenta maior concentração da principal quimiocina recrutadora dessa célula (CCL2) no tempo 0 e no 3º dia após a OAF, indo de acordo com a análise do conteúdo de macrófagos (NAG) que tem um aumento significativo nos dias 0 e 3 após a OAF, se comparado ao grupo controle. Nos outros dias (1 e 7), tanto a concentração de CCL2 quanto do NAG, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Relacionando nossos dados com o que há na literatura sobre o papel de neutrófilos e macrófagos no processo de cicatrização de feridas, observamos alguns pontos importantes. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar na ferida e desempenham papel importante nos estágios iniciais de cicatrização. Concomitantemente, os monócitos entram na ferida e se diferenciam em macrófagos que exerce função no processo de cicatrização, produzindo fatores que estimulam a angiogênese e a fibroplasia (formação do tecido de granulação). Uma redução do

número de macrófagos leva a um fechamento da ferida atrasado, diminuição da formação do tecido de granulação e da angiogênese, bem como a diminuição dos fatores de crescimento como o VEGF e o TGF- β (KOH; DIPIETRO, 2011).

Em concordância com o que ocorre na ferida, na pele íntegra do membro isquêmico dos animais diabéticos observou-se que no 1º dia após a OAF ocorreu realmente um aumento do infiltrado de neutrófilos, porém no grupo controle esse aumento só ocorreu no 3º dia após a OAF. Em relação ao infiltrado de macrófagos, observou-se de maneira interessante que no grupo diabético há aumento significativo do infiltrado de macrófagos no 3º dia após a OAF.

Uma vez entendidas essas alterações, o propósito inicial era sugerir um método que pudesse avaliar precocemente essas alterações inflamatórias que ocorrem na pele do diabético através de leucócitos radiomarcados. O uso de leucócitos radiomarcados têm sido amplamente utilizados em processos inflamatórios e infecciosos, sendo que suas indicações clínicas mais importantes são febre de origem desconhecida, doença inflamatória intestinal, osteomielite, e acompanhamento de pacientes com prótese vascular ou ortopédica (GOLDSMITH; VALLABHAJOSULA, 2009). No entanto, para detectar alterações inflamatórias na pele de animais diabéticos ainda não tinha sido utilizado.

O DM, assim como a OAF, levam a uma resposta inflamatória com alterações sistêmicas como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e diapedese, com conseqüente acúmulo dos leucócitos no local da lesão tecidual (GOLDSMITH; VALLABHAJOSULA, 2009). O acúmulo desses leucócitos pode ser mensurado através de leucócitos radiomarcados com ^{99m}Tc -ECD que emitem radiação que é detectada pela gama câmara e poderia servir como método precoce a abertura da ferida, uma vez que, o acúmulo dessas células poderia predizer em que momento ocorreria um processo inflamatório mais evidente.

Avaliou-se, portanto, a captação dos leucócitos radiomarcados 1 e 3 dias após a OAF pelo método nuclear. Em nenhum dos grupos de animais investigados foi observado captação da radiação pela glândula tireóide, indicando que a ^{99m}Tc -ECD-leucócitos são viáveis e possuem estabilidade *in vivo*. Observou-se pelas imagens cintilográficas que há uma captação significativamente maior da radiação

no órgão alvo (membro posterior isquêmico) em relação ao seu contralateral (membro posterior não isquêmico) nos grupos investigados (controle e diabético). Entretanto, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos dias analisados. Apesar de ser esperado que o grupo diabético tivesse uma captação da radiação maior do que o grupo controle, ainda assim pode-se afirmar que o método utilizado é válido uma vez que ele conseguiu detectar alterações no membro isquêmico.

Dessa forma, os leucócitos radiomarcados podem ser utilizados como método precoce a alterações decorrentes da isquemia, que no caso dos diabéticos pode levar a abertura da ferida diabética isquêmica. E ainda, sugere-se que tempos mais recentes, como por exemplo 6h e 12h, possam ser investigados para verificar a possibilidade de identificação dessas alterações em estágios ainda mais iniciais.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que:

- O grupo diabético apresenta menor número de leucócitos circulantes se comparado ao controle após a OAF, mas não apresenta diferenças entre o número de neutrófilos e macrófagos;
- O infiltrado de neutrófilos na pele de membros isquêmicos apresenta pico no grupo diabético 24 horas após a OAF e no grupo controle este pico ocorre no 3º dia após a OAF;
- O infiltrado de macrófagos na pele de membros posteriores de camundongos apresenta-se maior no grupo diabético nos dias 0 e 3 após a OAF;
- A concentração do fator pró-angiogênico VEGF na pele de membros isquêmicos é significativamente menor no grupo diabético em relação ao controle;
- Os leucócitos radiomarcados podem ser utilizados como método precoce a alterações decorrentes da isquemia

Como **conclusão geral**, observa-se que o perfil inflamatório na pele de membros isquêmicos de animais diabéticos e do controle não-diabético são diferentes uma vez que, a cinética demonstrou que o aumento do infiltrado inflamatório na pele ocorre em momentos e em intensidades diferentes.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação do estresse oxidativo
- Avaliação dos parâmetros de hipóxia (HIF-1 α)
- Avaliação da atividade inflamatória por meio da Microscopia Intravital
- Realização de imagens cintilográficas em tempos precoces (6h e 12h)

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTABAS, V. Diabetes , Endothelial Dysfunction , and Vascular Repair : What Should a Diabetologist Keep His Eye on ? *International Journal of Endocrinology*, v. January, p. 1–15, 2015.

ALTAVILLA, D. *et al.* Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*, v. 50, n. 3, p. 667–674, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*, v. 36 Suppl 1, n. October 2012, p. S11–66, jan. 2013.

ARAÚJO, E. B. DE *et al.* Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2008.

ASENBAUM, S. *et al.* Imaging of Cerebral Blood Flow with Technetium- 99m-HMPAO and Technetium-99m-ECD : A Comparison. *J Nucl Med*, 1998.

ATKINSON, M. A; CHERVONSKY, A. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia*, v. 55, n. 11, p. 2868–77, nov. 2012.

BANERJEE, S. *et al.* Evolution of Tc-99m in Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. XXXI, n. 4, p. 266–277, 2001.

BARCELOS, L. S. *et al.* Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circulation research*, v. 104, n. 9, p. 1095–102, 8 maio 2009.

BARCELOS, L. S. *et al.* Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflammation Research*, v. 53, n. 10, p. 576–584, 2004.

BARDINI, G.; ROTELLA, C. M.; GIANNINI, S. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications. *The review of diabetic studies: RDS*, v. 9, n. 2-3, p. 82–93, 2012.

BECKER, W.; MELLER, J. The role of nuclear medicine in. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. December, 2001.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 5, p. 1219–1222, 2007.

CALAFIORE, R.; BASTA, G. Stem cells for the cell and molecular therapy of type 1 diabetes mellitus (T1D): the gap between dream and reality. *Am J Stem Cells*, v. 4, n. 1, p. 22–31, 2015.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 20 ago. 2014.

CAROLLO, M. *et al.* Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *British journal of pharmacology*, v. 134, n. 6, p. 1166–1179, 2001.

CHATZIGEORGIU, A. *et al.* The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In vivo*, v. 23, p. 245–258, 2009.

CHEN, X. *et al.* Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats. *Experimental dermatology*, v. 19, n. 12, p. 1088–95, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701629>>. Acesso em: 9 jun. 2015.

CHOU, E. *et al.* Decreased Cardiac Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Insulin-Resistant. *Circulation*, v. 105, p. 373–380, 2001.

CORNELL, S. Continual evolution of type 2 diabetes : an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and Clinical Risk management*, v. 11, p. 621–632, 2015.

DINH, T. *et al.* Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes*, v. 61, n. 11, p. 2937–2947, 2012.

DOKUN, A. O. *et al.* ADAM12: A Genetic Modifier of Pre-clinical Peripheral Arterial Disease. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, p. ajpheart.00803.2014, 2015.

ELSHARAWY, M. A.; NAIM, M.; GREISH, S. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, v. 14, n. 3, p. 288–93, mar. 2012.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation. *State of the art review*, v. 6, n. 265, 2014.

FILIPPI, L. *et al.* Diabetic foot infection: usefulness of SPECT/CT for 99mTc-HMPAO-labeled leukocyte imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 50, n. 7, p. 1042–1046, 2009.

FRYKBER, R. G. *et al.* A Supplement to : of DIABETIC DISORDERS A CLINICAL. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, v. 45, n. 5, p. 1–68, 2006.

GAO, F.; ZHENG, Z. M. Animal Models of Diabetic Neuropathic Pain. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 122, p. 100–106, 2014.

GERSHATER, M. A *et al.* Complexity of factors related to outcome of neuropathic and neuroischaemic/ischaemic diabetic foot ulcers: a cohort study. *Diabetologia*, v. 52, n. 3, p. 398–407, mar. 2009.

GOLDSMITH, S. J.; VALLABHAJOSULA, S. Clinically proven radiopharmaceuticals for infection imaging: mechanisms and applications. *Seminars in nuclear medicine*, v. 39, n. 1, p. 2–10, jan. 2009.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, v. 89, n. 3, p. 219–29, mar. 2010.

HARTGE, M. M.; UNGER, T.; KINTSCHER, U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, v. 4, n. 2, p. 84–88, 2007.

HASHIMOTO, T.; SHIBASAKI, F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Frontiers in pediatrics*, v. 3, n. April, p. 33, jan. 2015.

HASKÓ, G.; PALCHER, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 32, n. 4, p. 865–869, 2012.

HOWANGYIN, K. Y.; SILVESTRE, J. S. Diabetes mellitus and ischemic diseases: Molecular mechanisms of vascular repair dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 34, n. 6, p. 1126–1135, 2014.

ISAAC, C. *et al.* Physiological wound healing. *Rev Med*, v. 89, n. 04, p. 125–131, 2010.

JONGE, F. A. A. DE; PAUWELS, E. K. J. Review article Technetium , the missing element. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 23, n. 3, 1996.

KHAN, N. A. Does the Clinical Examination Predict Lower Extremity Peripheral Arterial Disease ? QUESTION TO ANSWER WITH. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 295, n. 5, p. 6–8, 2006.

KHARROUBI, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 6, p. 850, 2015.

KING, A. J. F. The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, v. 166, n. 3, p. 877–94, jun. 2012.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, n. July, p. e23, 2011.

KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, C. G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine*, v. 2012, n. Figure 1, p. 918267, jan. 2012.

KORZON-BURAKOWSKA, A.; DZIEMIDOK, P. Diabetic foot – the need for comprehensive multidisciplinary approach. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 18, n. 2, p. 314–317, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–26, fev. 2008.

LEPÄNTALO, M. *et al.* Chapter V: Diabetic foot. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, v. 42 Suppl 2, p. S60–74, dez. 2011.

LI, H. *et al.* Therapeutic angiogenesis in ischemic muscles after local injection of fragmented fibers with loaded traditional Chinese medicine. *Nanoscale*, 2015.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 9, p. 2045–51, set. 2012.

LIU, X. F. *et al.* Biological factors in plasma from diabetes mellitus patients enhance hyperglycaemia and pulsatile shear stress-induced endothelial cell apoptosis. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, v. 6, n. 5, p. 511–22, 2014.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes - Part II: Cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascular Pharmacology*, v. 54, n. 3-6, p. 75–79, 2011.

MAKDISSE, M. *et al.* Original Article A Risk Score for Predicting Peripheral Arterial Disease in Individuals 75 Years or Older. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 17, p. 555–561, 2007.

MAKDISSE, M. *et al.* Prevalence and Risk factors Associated with Peripheral Arterial Disease in the Hearts of Brazil Project. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, p. 402–414, 2008.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radioármacos de Tecécio-99^m e seus controles de qualidade *. *Radiol Bras*, v. 34, n. 4, p. 233–239, 2001.

MARQUES, S. M. *et al.* Genetic strain differences in the development of peritoneal fibroproliferative processes in mice. *Wound Repair and Regeneration*, v. 22, n. 3, p. 381–389, 2014.

MARTIN-COMIN, J. *et al.* Hank's balanced salt solution: an alternative resuspension medium to label autologous leukocytes. *Experience in inflammatory bowel disease*. [S.l.: s.n.], 2002.

MASCARENHAS, J. V. *et al.* Peripheral Arterial Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 43, n. 1, p. 149–166, mar. 2014.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771–6, 19 mar. 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MENKE, N. B. *et al.* Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, v. 25, n. 1, p. 19–25, 2014.

MINISTERIO DA SAUDE. *Portal da Saúde. Dia Mundial da Diabetes*. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/PORTAL/SAUDE/AREA.CFM?ID_AREA=1739>. Acesso em: 21 nov. 2013.

MITROULIS, I. *et al.* Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*, v. 147C, p. 123–135, mar. 2015.

MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of experimental medicine*, v. 210, n. 7, p. 1283–99, 2013.

MULLANE, K. M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *Journal of Pharmacological Methods*, v. 14, n. 3, p. 157–167, 1985.

NAPOLITANO, M.; MEGNA, M.; MONFRECOLA, G. Insulin Resistance and Skin Diseases. *TheScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 479354, 2015.

NG, E. L. *et al.* Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in older adults in an Australian emergency department. *Vascular*, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2014.

O'LOUGHLIN, A. *et al.* Review paper: basic concepts to novel therapies: a review of the diabetic foot. *The international journal of lower extremity wounds*, v. 9, n. 2, p. 90–102, 2010.

PANENI, F. *et al.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European heart journal*, v. 34, n. 31, p. 2436–43, ago. 2013.

PANICO, A. *et al.* Advances in peripheral arterial disease endovascular revascularization. *Cardiology clinics*, v. 33, n. 1, p. 89–98, mar. 2015.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, v. 14, n. 5, p. 289–301, 2014..

PLACZKOWSKA, S. *et al.* Associations between basic indicators of inflammation and metabolic disturbances *. *Postepy Hig Med Dosw*, v. 68, p. 1374–1382, 2014.

QUONDAMATTEO, F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? *Cell and tissue research*, v. 355, n. 1, p. 1–21, jan. 2014.

REIS, J. S. *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, 2008.

ROBERTS, A. C.; PORTER, K. E. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, v. 10, n. 6, p. 472–82, 2013.

RODRÍGUEZ, S. A. *et al.* Diabetes mellitus. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, v. 11, n. 17, p. 995–1002, out. 2012.

SHIREMAN, P. K. The Chemokine System in Arteriogenesis and Hind Limb Ischemia. *J Vasc Surg*, v. 45, n. Suppl A, p. A–48– A56, 2007.

SILVESTRE, J.-S.; SMADJA, D. M.; LÉVY, B. I. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiological reviews*, v. 93, n. 4, p. 1743–802, 2013.

SOUZA, C. F. DE *et al.* Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 56, n. 5, p. 275–284, 2012.

SUMPIO, B. E. Contemporary evaluation and management of the diabetic foot. *Scientifica*, v. 2012, p. 435487, jan. 2012.

TELLECHEA, A. *et al.* Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. *Int J Low Extrem Wounds*, v. 12, n. 1, p. 4–11, 2013.

THIRUVOIPATI, T. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 7, p. 961, 2015.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. . *Medicina Nuclear*. [S.l: s.n.], 2003.

TRICHES, C. *et al.* Complicações macrovasculares do diabetes melito: peculiaridades clínicas, de diagnóstico e manejo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 6, 2009.

TSOPELAS, C. Radiotracers used for the scintigraphic detection of infection and inflammation. *TheScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 676719, jan. 2015.

TUTTOLOMONDO, A.; MAIDA, C.; PINTO, A. Diabetic foot syndrome: Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes. *World journal of orthopedics*, v. 6, n. 1, p. 62–76, 18 jan. 2015.

VALDIVIELSO, P.; RAMÍREZ-BOLLERO, J.; PÉREZ-LÓPEZ, C. Peripheral arterial disease, type 2 diabetes and postprandial lipidaemia: Is there a link? *World journal of diabetes*, v. 5, n. 5, p. 577–85, 15 out. 2014.

VEMULAPALLI, S.; PATEL, M. R.; JONES, W. S. Limb ischemia: cardiovascular diagnosis and management from head to toe. *Current cardiology reports*, v. 17, n. 7, p. 611, jul. 2015.

WU, J.; YAN, L.-J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes. Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, v. 8, p. 181–188, 2015.