



VANESSA FERRAZ SUZUKI BANHESSE

**EFEITO DA ATORVASTATINA NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENFERMAGEM

VANESSA FERRAZ SUZUKI BANHESSE

**EFEITO DA ATORVASTATINA NA CICATRIZAÇÃO
DE FERIDAS EM RATOS**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena De Melo Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Enfermagem e Trabalho.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA FERRAZ SUZUKI BANHESSE
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. MARIA HELENA DE MELO LIMA.**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B225e Banhesse, Vanessa Ferraz Suzuki, 1983-
Efeito da atorvastatina na cicatrização de feridas em
ratos / Vanessa Ferraz Suzuki Banhesse. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Maria Helena de Melo Lima.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Enfermagem.

1. Cicatrização de feridas. 2. Enfermagem. 3.
inibidores de HMG-CoA redutases. 4. Citocinas. I. Lima,
Maria Helena de Melo, 1966-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of atorvastatin on wound healing in rats

Palavras-chave em inglês:

Wound Healing

Nursing

Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors

Cytokines

Área de concentração: Enfermagem e Trabalho

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Maria Helena de Melo Lima [Orientador]

Maria Esméria Corezola do Amaral

Eliana Pereira de Araújo

Data da defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Enfermagem

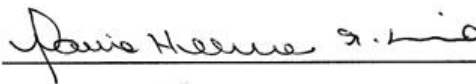
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

VANESSA FERRAZ SUZUKI BANHESSE

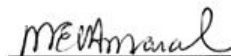
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA HELENA DE MELO LIMA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARIA HELENA DE MELO LIMA



2. PROF(A). DR(A). MARIA ESMÉRIA COREZOLA DO AMARAL



3. PROF(A). DR(A). ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO



Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de julho de 2013

A Deus, o meu Refúgio e Fortaleza eternos,

aos meus pais Luiz Fernando e Valéria

e ao meu amado esposo Edgar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por tudo que Ele possibilitou na minha vida até hoje, por todos os momentos de luta e dificuldade, por todas as alegrias e vitórias, a Deus toda Honra, Louvor e Glória!

Aos ratos que, involuntariamente, doaram suas vidas para que esta pesquisa e tantas outras fossem possíveis.

Ao meu esposo Edgar, pelo apoio, suporte, amor e carinho, também pelos muitos finais de semana nos quais me acompanhou nos experimentos, e porque viveu comigo as dificuldades e conquistas deste trabalho.

Aos meus pais Luiz Fernando e Valéria, que me ensinaram os valores que tenho e me orientaram no caminho do Senhor Jesus, aos irmãos Danielle e Luiz Fernando, aos meus avós Mercedes, Jubel, Maria e Kazuma (*in memoriam*), tias Rosangela e Mariângela; agradeço a todos vocês pelo incentivo e apoio que sempre me deram para que eu estudasse.

A **Professora Maria Helena de Melo Lima**, pela oportunidade, pelas orientações, apoio e paciência, o meu 'Muito Obrigada'!

Ao **Professor Mario J. A. Saad**, pelo exemplo profissional, porque me abrigou em seu laboratório e me permitiu utilizar toda estrutura que gerou este trabalho.

Aos **Professores Lício Velloso e Eliana Araújo**, porque num momento de grande dificuldade, me receberam em seu laboratório e me deram grande suporte.

À **Professora Maria Esméria C. Amaral**, pelo exemplo pessoal, pela atenção e carinho que sempre teve comigo.

Ao Professor **André Schenka**, pelas aulas de histomorfometria e por toda ajuda no trabalho e ao **Professor Stephen Hyslop**, pelas aulas de farmacologia e desenho experimental.

À Flávia, cooperadora e companheira nas lutas e conquistas deste trabalho. À Lélia L. F. Abreu, que me ensinou os procedimentos e tratamentos com os animais. Ao Danilo e à Jessica, que me ajudavam nos procedimentos com eles.

À Sandra Regina Brambilla (Sandrinha), que me ensinou os fundamentos de histologia, à Juliana A. Camargo, que me acompanhou, me orientou nas colorações e até mesmo nas extrações e à Ana Flavia M. Pessoa. À Andrea M. Caricilli, que me ensinou e me acompanhou

na técnica de Western Blot; à Dioze Guadagnini, por me mostrar o método ELISA e ao Nilton Sergio de Aquino, que providenciava o fenofibrato e a atorvastatina para os tratamentos.

Ao **Prof. José Barreto Campelo Carneiro**, pelo exemplo pessoal e aos seus alunos, sempre dispostos a ajudar: Maria Carolina S. Mendes (Carol), obrigada pela amizade e dicas; Carlos K. Katashima, que à noite, ainda trabalhando no laboratório, parou para me ensinar a usar o espectrofotômetro; Daiane Sofia Paulino, Guilherme Z. Rocha e Gustavo Pimentel, pelas dicas e apoio nos procedimentos do laboratório.

À Carla Bueno, Fernanda Pace, Juliana Leite, Juliana Vecina, Luciene Lenhare, Patricia Dias e ao Vagner Ramon (Mestrão), por todo apoio e ajuda; em especial, meu agradecimento ao Vagner, pelo exemplo de luta.

Às alunas da **Professora Patrícia Prada**: Paula, Laís, Gisele e Thayana e ao Sr. Luiz Janeri, Sr. Jósimo Pinheiro, ao Bruno Carvalho, Thiago Araújo, Alexandre Oliveira e Natália Tobar, pelas dicas e ajudas nos procedimentos do laboratório.

Aos colegas e amigos no Laboratório de Sinalização Celular (Labsincel), coordenado pelo **Prof. Licio Velloso**, pelo apoio e carinho com que me receberam: Albina, Ariadne, Bruna, Carina, uma das pessoas mais simpáticas que já conheci; Carla, Daniela Razzolli, que me ajudou muito com a histologia; Erika Anne, pelas conversas e por estar sempre disposta a ajudar; Ermilo, Fabiana (Fabi), Gabriela Freitas (Gabi), Gerson, Gustavo A. dos Santos, Joseane, Letícia, Livia, Lorena (Lo), Lucas Nascimento, Márcio Cruz, Mariana Freschi, Nathalia Dragano, Rodrigo Moura e Vanessa Lazari.

Aos profissionais do Núcleo de Medicina Experimental e do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), que sempre ajudaram, cuidando dos animais e dando todo suporte para os experimentos: Adriana, Antonio, Ângelo, Érika, José Carlos, Marino e Regina.

À CAPES, pelo apoio e financiamento deste projeto.

E, por fim, agradeço a todos que conheci e que também, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

*“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; a Ele seja a glória,
eternamente.” [Romanos 11:36]*

*“Adquire sabedoria, adquiere inteligência e não te esqueças nem te apartes
das palavras da minha boca.” [Provérbios 4:5]*

(Bíblia Sagrada)

RESUMO

RESUMO

A cicatrização de feridas em pele é um processo biológico complexo e dinâmico, que envolve eventos como inflamação, proliferação, e remodelamento. Estudos recentes mostraram que estatinas, por meio de efeitos pleiotrópicos independentes da ação hipolipemiante, são novas opções terapêuticas para tratamento de diferentes patologias por suas ações anti-inflamatórias, antioxidantes, sobre vasodilatação, neoangiogênese e na redução da disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi investigar a ação da atorvastatina no reparo tecidual em lesões agudas em animais saudáveis. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: placebo (P); atorvastatina tópica (AT); atorvastatina oral (AO); atorvastatina tópica e oral (ATO). Sob anestesia, a lesão na região dorsal foi confeccionada com *punch* de 8mm. As lesões foram fotografadas nos dias 0, 1, 3, 7, 10 e 14 pós-lesão e amostras destas extraídas nos dias 1, 3, 7 e 14, para análise da expressão de proteínas PI3K, Akt, GSK-3, eNOS, VEGF, TGF- β , ERK, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Na avaliação macroscópica, houve melhora significativa quanto à redução das áreas das lesões nos grupos AT, AO e ATO em relação ao placebo. Na avaliação da expressão de proteínas, no 1º dia houve aumento da expressão PI3K, Akt, GSK-3, eNOS e IL-10 nos grupos AT e AO, em relação ao placebo. No 3º dia, houve aumento da expressão das proteínas PI3K, Akt, GSK-3 e IL-10 e no 7º dia, houve aumento da expressão da PI3K, Akt, GSK-3, IL-10, eNOS, VEGF e ERK em todos os grupos tratados com atorvastatina, em relação ao placebo. No 1º, 3º e 7º, houve redução na expressão das citocinas IL-6 e TNF- α em todos os tratados em relação ao placebo. Concluímos que atorvastatina acelera o reparo tecidual em modelo de lesões agudas em ratos e modula a expressão das proteínas nas vias de crescimento celular e citocinas.

Descritores: Cicatrização de Feridas; Enfermagem; Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases

Linha de pesquisa: Processo de Cuidar em Saúde e Enfermagem



ABSTRACT

ABSTRACT

Wound healing in skin is a complex and dynamic biological process, involving events such as inflammation, proliferation, and remodeling. Recent studies have shown that statins, through pleiotropic effects independent of its lipid lowering action, are new therapeutic options for the treatment of different diseases for their anti-inflammatory and antioxidant actions, on vasodilation and neoangiogenesis and reduction of endothelial dysfunction. The aim of this study was to investigate the effect of atorvastatin in tissue repair after acute injury in healthy animals. The animals were divided into four groups: placebo (P); topical atorvastatin (AT); oral atorvastatin (AO); topical and oral atorvastatin (ATO). Under anesthesia, a lesion in the dorsal region in the animal was made with 8mm punch. The lesions were photographed on days 0, 1, 3, 7, 10 and 14 post-injury and the samples drawn on days 1, 3, 7 and 14 for protein expression analysis of PI3K, Akt, GSK-3, eNOS VEGF, TGF- β , ERK, IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . At macroscopic examination, there was significant improvement in the reduction of the lesion areas in groups AT, AO and ATO relative to placebo. Evaluating the expression of proteins on day 1, there was an increased expression of PI3K, Akt, GSK-3, eNOS and IL-10 in AT and AO groups, when compared to placebo. At day 3, there was increased expression of PI3K, Akt, GSK-3 and IL-10 and in the day 7, there was increased expression of PI3K, Akt, GSK-3, IL-10, eNOS, VEGF and ERK in all atorvastatin-treated groups versus placebo. In the days 1, 3 and 7, there was a reduction in the expression of IL-6 and TNF- α in all atorvastatin-treated versus placebo. We conclude that atorvastatin accelerates tissue repair in a model of acute lesions in rats and modulates expressions of proteins in cell growth pathways and cytokines.

Keywords: Wound Healing; Nursing; Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors; Statins

Research line: Process of Care in Nursing and Health

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografias representativas das feridas nos dias 0, 1, 3, 7, 10 e 14.....	38
Figura 1a	Percentagem da área ferida (dia x) / área inicial (dia 0) x 100.....	39
Figura 2	Expressão da PI3K nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização	41
Figura 3	Fosforilação da Akt nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização	42
Figura 4	Fosforilação da GSK-3 nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização	43
Figura 5	Fosforilação da ERK nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização.....	45
Figura 6	Expressão do VEGF nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização.	46
Figura 7	Expressão da eNOS nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização.....	47
Figura 8	Expressão do TGF- β nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização.....	48
Figura 9	Expressão da IL-1 β nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização.....	50
Figura 10	Expressão da IL-6 nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização	51
Figura 11	Expressão da TNF- α nos dias 1º, 3º, 7º e 14º da cicatrização	52
Figura 12	Expressão da IL-10 nos dias 1, 3 e 7 da cicatrização	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt – serina/treonina quinase ou proteína quinase B

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPC – células endoteliais progenitoras

ERK – quinases reguladoras da sinalização extracelular

FPP - farnesil-pirofosfato

GGPP - geranylgeranyl-pirofosfato

GSK-3 - enzima glicogênio sintase quinase-3

IL-1 β – interleucina-1-beta

IL-6 – interleucina-6

IL-10 – interleucina-10

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IRS-1 – substrato-1 do receptor de insulina

MAPK- quinase ativadora da atividade mitogênica

NO - óxido nítrico

PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase

TGF- β – fator de crescimento transformador – beta

TNF- α – fator de necrose tumoral – alfa

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Estatinas e a cicatrização da pele	20
1.2 A Atorvastatina.....	24
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS.....	28
3.1 Reagentes e anticorpos	28
3.2 Soluções utilizadas nos experimentos	28
3.3 Animais.....	30
4 MÉTODOS	32
4.1 Procedimentos com animais.....	32
4.2 Immunoblotting.....	33
4.3 Análise estatística dos resultados.....	34
4.4 Aspectos éticos	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Planimetria.....	37
5.2 Atorvastatina na expressão das proteínas PI3K, Akt e GSK-3	40
5.3 Atorvastatina na expressão das proteínas ERK 1,2, VEGF, eNOS e TGF- β	44
5.4 Atorvastatina na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10	49
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO.....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	80



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização é complexo e regulado por mecanismos celulares e bioquímicos que interagem entre si para restabelecer o tecido lesionado⁽¹⁾. Este processo é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento⁽²⁾. Estas fases não ocorrem isoladamente, mas se sobrepõem entre si^(3, 4).

A coagulação ocorre imediatamente após o trauma e forma um ‘tampão’ hemostático ou crosta hemato-fibrinosa, constituído de plaquetas, fatores de crescimento, substâncias vasoativas, proteínas adesivas e proteases que desencadeiam as fases subsequentes^(2, 3, 5).

Os leucócitos – polimorfonucleares e monócitos – circulantes na corrente sanguínea chegam ao sítio da lesão e os monócitos se convertem em macrófagos. Estes se subdividem em duas populações, uma delas sob ação de citocinas pro-inflamatórias e a outra sob ação de citocinas anti-inflamatórias^(3, 4). Os macrófagos também produzem fatores de crescimento e citocinas^(2, 6) que atraem mais células para o sítio da lesão.

Para que as células entrem no tecido lesionado, ocorre a vasodilatação. Este fenômeno é ativado pela histamina⁽¹⁾, uma amina vasoativa produzida por mastócitos⁽⁷⁾ e pela serotonina e bradicininas⁽⁸⁾. Os sinais característicos de inflamação – dor, calor, rubor e edema são provocados pela ação destas aminas vasoativas^(1, 8, 9).

A fase inflamatória é de extrema importância para o reparo tecidual. É modulada por moléculas da superfamília do fator de crescimento transformante (TGF), em especial o TGF-beta (TGF- β ; TGF- β 1; TGF- β 2; TGF- β 3)^(1, 5, 6, 9), por quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1)^{(1),(10)}, interleucina 6 (IL-6)⁽¹¹⁾, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^(6, 12) e pelo óxido nítrico (NO)⁽¹³⁾. O TGF- β é quimiotático para neutrófilos e monócitos, células recrutadas para iniciar a resposta inflamatória⁽⁵⁾.

Pelo estímulo destas moléculas, os macrófagos atuam primeiramente na fagocitose de microrganismos e partículas^(1, 2, 8, 14) e tardiamente participam na angiogênese, produção de colágeno, formação de tecido de granulação⁽⁸⁾ e reepitelização^(1, 2, 8, 11). Já os mastócitos, além de promoverem a vasodilatação, também auxiliam na atividade antimicrobiana dos macrófagos e produzem TNF- α ^(2, 7).

Com o aumento das populações celulares e o consumo de oxigênio destas, há áreas de hipóxia na lesão. Algumas citocinas produzidas em condições de hipóxia são o TNF- α ⁽¹⁵⁾, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e TGF- β ^(1, 15, 16) sendo que estes dois fatores de crescimento são produzidos por macrófagos apenas em situação de hipóxia⁽⁸⁾.

O TNF- α e o TGF- β estimulam a produção de VEGF e este ativa a produção de NO⁽¹³⁾. A produção e atividade do NO são mais destacadas na fase inflamatória, com maior expressão por volta do segundo dia de cicatrização. Suas ações principais são o estímulo para proliferação e prevenção de apoptose em células endoteliais⁽¹⁷⁾.

O TGF- β 1 é ativado por NO e a produção deste é suprimida em *feedback* negativo pelo mesmo TGF- β 1 que atua inibindo a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Ao produzir NO, a iNOS modula negativamente a atração de monócitos para a ferida e a produção de duas citocinas pro-inflamatórias, a IL-1 e a IL-6, sendo que altas concentrações de NO levam os macrófagos a reduzir a produção destas citocinas⁽¹⁷⁾.

Deste modo, os macrófagos conduzem a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa^(1, 3, 8). Eles expressam a iNOS, aumentando a produção de NO que regula parte da reepitelização, síntese de colágeno, angiogênese e o fechamento da ferida. Concomitantemente a esta redução das citocinas pró-inflamatórias^(1, 18), há o aumento das citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e da atividade do TGF- β 1⁽¹¹⁾.

Na fase proliferativa ocorre a neoangiogênese, produção de colágeno pelos fibroblastos e intensa migração celular⁽¹⁹⁾, especialmente de queratinócitos, que promovem a formação do tecido de granulação e reepitelização. Nesta fase, o VEGF é o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial^(10, 20, 21). A produção de VEGF é estimulada por TNF- α ^(1, 13, 22) em queratinócitos e fibroblastos⁽¹⁴⁾. Por volta do terceiro dia de cicatrização, o VEGF estimula o aumento do número de células endoteliais e as estimula a produzir NO através da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)⁽¹³⁾.

Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenases^(5, 6, 9) e fator ativador do plasminogênio⁽¹⁾. Estas duas substâncias permitem a migração das células endoteliais em direção à região da ferida, o que favorece a formação do tecido de granulação, ao abrir espaço para os novos vasos que se formarão e, lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras de colágeno^(3, 10, 20), o que permite à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa.

Por fim, tem-se a fase de remodelamento, responsável pela reorganização e contração da ferida, com a substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso e recomposição celular da epiderme⁽⁶⁾. O balanço entre contração e reepitelização é dependente dos queratinócitos e está relacionado à profundidade, localização da ferida e presença de infecção^(3, 23, 24).

1.1 Estatinas e a cicatrização da pele

As estatinas são agentes hipolipemiantes, que exercem os seus efeitos através da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima fundamental na síntese do colesterol, levando a uma redução do colesterol tecidual e um

consequente aumento na expressão dos receptores LDL⁽²⁵⁾. Exercem efeitos independentes da diminuição do colesterol sérico, conhecidos como pleiotrópicos⁽²⁶⁾.

Estes efeitos incluem ação reguladora na função endotelial^(26, 27), aumento da estabilidade em placas ateroscleróticas⁽²⁶⁾, diminuição do estresse oxidativo^(28, 29), da inflamação e da resposta trombogênica^(26, 30, 31). As estatinas possuem também efeitos extra-hepáticos benéficos no sistema imune^(32, 33) e sistema nervoso central⁽³⁴⁾. Muitos destes efeitos pleiotrópicos são mediados pela inibição de isoprenóides, os quais servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular^(25, 26, 35).

A farmacocinética e a permeabilidade tecidual das estatinas são diferentes⁽³⁶⁾, podendo dividir-se em grupos, as estatinas lipofílicas como a sinvastatina e atorvastatina, e as hidrofílicas, pravastatina e rosuvastatina. Em estudos recentes, as estatinas têm sido utilizadas para tratar grande variedade de desordens dermatológicas, como urticária, psoríase, acne⁽³⁷⁾.

Os diversos grupos de estatinas apresentam diferentes potenciais para a inibição da enzima HMG-CoA redutase em outras células que não apenas hepatócitos, sendo que estatinas lipofílicas têm maior facilidade em penetrar as células vasculares do que as estatinas hidrofílicas⁽³⁶⁾. A diferente permeabilidade tecidual, associada a um metabolismo específico, influencia em alguns dos efeitos periféricos das estatinas⁽³⁶⁾, ainda que estas possam ter efeitos pleiotrópicos idênticos.

Ao inibirem a síntese de ácido mevalônico as estatinas reduzem a síntese de isoprenóides como o farnesil-pirofosfato (FPP) e o geranilgeranil-pirofosfato (GGPP), intermediários na cascata de reações que resulta na formação de colesterol. Estes dois isoprenóides promovem a isoprenilação de proteínas com ligações lipofílicas e a sua ativação na membrana celular^(38, 39).

Duas das famílias de proteínas que necessitam desta isoprenilação para funcionarem adequadamente são Ras e Rho, que são pequenas proteínas G, chamadas GTPases. Esta classe de proteínas está envolvida na transmissão de sinais celulares alterando-as de um estado inativo, quando ligadas a uma guanosina difosfato (GDP), para um estado ativo, quando ligadas a uma guanosina trifosfato (GTP).

As estatinas, ao inibirem a isoprenilação das proteínas Ras e Rho levam à inativação e à acúmulo destas proteínas no citoplasma, e estas alterações contribuem para alguns dos efeitos pleiotrópicos destes medicamentos⁽⁴⁰⁾, como a modulação do sistema imune^(32, 41). Exemplos de atuação no sistema imune: inibem migração e adesão de monócitos, possuem propriedades anti-inflamatórias, com produção de citocinas anti-inflamatórias⁽⁴²⁾ e supressão de citocinas pro-inflamatórias⁽⁴¹⁾.

O funcionamento das GTPases permite a regulação de diferentes processos celulares imprescindíveis à cicatrização^(38, 39), como o crescimento, morfogênese, migração e cinética celulares, por meio da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) também estudada com p44/p42 MAPK ou ERK 1,2⁽⁴³⁾.

As estatinas também atuam na função endotelial por mecanismos dependentes e independentes do colesterol. O mecanismo dependente do colesterol resulta na diminuição deste na corrente sanguínea, melhorando a atividade vasomotora endotélio-dependente⁽⁴⁴⁾. Por outro lado, estudos têm demonstrado que as estatinas melhoram a função endotelial antes mesmo de haver uma diminuição significativa do colesterol sérico^(44, 45).

Estes efeitos sobre a função endotelial têm sido relacionados com o aumento do NO^(46, 47) por meio da fosforilação da eNOS^(27, 48) nas células endoteliais, que ocorre por diversos mecanismos, entre eles, a ativação da proteína serina-treonina quinase Akt⁽⁴⁹⁾ pela via de

sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)^(49, 50), que é essencial à cicatrização ao promover a sobrevivência celular^(43, 51).

O efeito das estatinas sobre a Akt parece ser específico das células endoteliais, uma vez que não se verifica a ativação da Akt nas células musculares lisas cardíacas⁽²⁷⁾. Apesar de doses elevadas de estatinas promoverem o aumento de NO, estudos em animais revelaram que estatinas em dose elevadas inibem a isoprenilação de outras proteínas tendo efeitos tóxicos sobre as células endoteliais e inibindo a angiogênese^(49, 52, 53).

Estudos também demonstram que as estatinas podem estar vinculadas ao aumento das células endoteliais progenitoras (EPC), através da via PI3K/Akt (Figura A1), aumentam a mobilização, proliferação, migração e sobrevivência das EPC que provêm da medula óssea^(25, 54, 55). A eNOS fosforilada pela Akt promove a migração de EPC induzidas pelo VEGF^(50, 56, 57).

Estas células aumentam a neovascularização induzida pela isquemia, aceleram a reendotelização dos vasos após lesão e melhoram a função cardíaca após a isquemia. A via PI3K/Akt promove a sobrevivência de células endoteliais⁽¹³⁾ e síntese de proteínas, além da migração celular e formação da estrutura capilar para promover a angiogênese⁽⁵⁸⁾. A Akt tem a capacidade de fosforilar proteínas (Figura A2) que regulam a proliferação celular⁽²⁷⁾, a síntese proteica⁽⁵⁹⁾, síntese lipídica⁽⁶⁰⁾ e a síntese de glicogênio^(61, 62).

A enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) é uma enzima multifuncional e é fosforilada pela Akt⁽⁴⁹⁾. A fosforilação em resíduos de serina inativa a GSK-3 em suas subunidades α e β . A inibição desta enzima em macrófagos promove aumento de IL-10 e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6 nos monócitos em seres humanos⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

Em tecido neural e em macrófagos, detectou-se que a produção de NO é dependente da GSK-3⁽⁶⁴⁾. E há crosstalk entre as vias de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 e Ras/ERK⁽⁶⁶⁾. Exemplos

disso são: a quimiotaxia fagocítica⁽⁶⁶⁾, a fosforilação inibitória da GSK-3 por meio da ERK ativada pelo TGF- β 1, promovendo a conversão de fibroblastos em miofibroblastos no tecido pulmonar⁽⁶⁷⁾. As estatinas, ao regular as atividades destas proteínas, podem atuar na modulação do sistema imune, sobre as citocinas e populações celulares, promovendo melhor reparo da lesão.

1.2 A Atorvastatina

É uma estatina sintética, classificada como estatina de segunda geração, bastante lipofílica, de alta ligação com proteína, meia-vida longa de até 36h e com metabólitos ativos. É metabolizada pelo citocromo P450, sendo 90% da metabolização no fígado^(48, 68). Algumas destas propriedades permitem o uso da atorvastatina para o tratamento de afecções dermatológicas e de feridas. O uso de atorvastatina em doses baixas ativa as proteínas PI3K, a Akt e a Ras, estabilizam o RNA mensageiro (mRNA) da eNOS e atuam de modo proangiogênico. Porém, em altas doses, a estatina pode ser antiangiogênica^(31, 56).

O efeito anti-inflamatório⁽⁶⁹⁾ está entre seus efeitos mais promissores para a cicatrização, com a inibição da produção de células T, indução de apoptose e de proliferação celular⁽⁶⁸⁾ e conversão do perfil celular para expressão de citocinas⁽³²⁾. Deste modo, há maior produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10⁽⁴²⁾, supressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) e de vias de sinalização intracelulares específicas, como a inibição na via da Rho, que aumenta a expressão da iNOS, a produção de NO e a vasodilatação⁽⁶⁸⁾.

Considerando os aspectos acima levantados, este estudo tem o objetivo de investigar o possível benefício do tratamento oral e tópico da atorvastatina em um modelo murino com lesões cutâneas.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar o tratamento com atorvastatina oral, tópico e combinado (tópico + oral) em lesões cutâneas de ratos.

Investigar a ação da atorvastatina:

- na via de sobrevivência celular, por meio da expressão das proteínas PI3K (p110), Akt e GSK-3
- na via de crescimento celular e da angiogênese, por meio da expressão das proteínas MAPK/ERK 1,2, TGF- β , eNOS e VEGF
- na expressão de citocinas IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α durante o processo de cicatrização.

MATERIAIS

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes e anticorpos

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio, poliacrilamida e membrana de nitrocelulose (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Metanohidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT) e demais reagentes utilizados foram da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Os anticorpos utilizados foram: anti-PI3K p110, anti-p-Akt policlonais, anti-p-ERK 1,2, anti-eNOS/NOS3, anti-VEGF, anti-TNF- α e anti-IL-1 β da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA); anti-p-GSK-3 α/β policlonais e anti-TGF- β , da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) e anti-IL-6 e anti-IL10, da Abcam (Cambridge, UK).

3.2 Soluções utilizadas nos experimentos

- Tampão para extrato total

Utilizado na extração total de tecidos. Contém: TRIS base 100mM, EDTA 10mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 10mM, fluoreto de sódio (NaF) 100mM, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 10mM, água deionizada.

- Tampão de Laemmli

Para estocar o material extraído e para aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10% e água deionizada

- Solução tampão para eletroforese em gel (SDS-PAGE)

Utilizada para a realização da eletroforese das proteínas extraídas no gel SDS-PAGE. A solução foi diluída em 1:4. Contém: TRIS base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M e SDS 0,4%.

- Solução tampão para transferência

Utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: TRIS base 25mM, glicina 129mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Estocada a 4°C.

- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução ("resolving")

Utilizada para o preparo do SDS-PAGE, gel de resolução. É um tampão composto de: EDTA 4mM, SDS 2% e TRIS base 0,75M. O pH da solução ajustado com ácido clorídrico.

- Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento ("stacking")

Utilizada no preparo do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4mM, SDS 2% e TRIS base 50mM. O pH foi ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

- Solução basal

Solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, com cloreto de sódio 0,12M, TRIS base 0,01M, *Tween* 20 0,05%.

- Solução bloqueadora

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém: solução de leite em pó desnatado 5% (Molico®).

- Solução para anticorpos

Solução em que se diluem os anticorpos específicos. Contém: 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal.

- Solução de atorvastatina

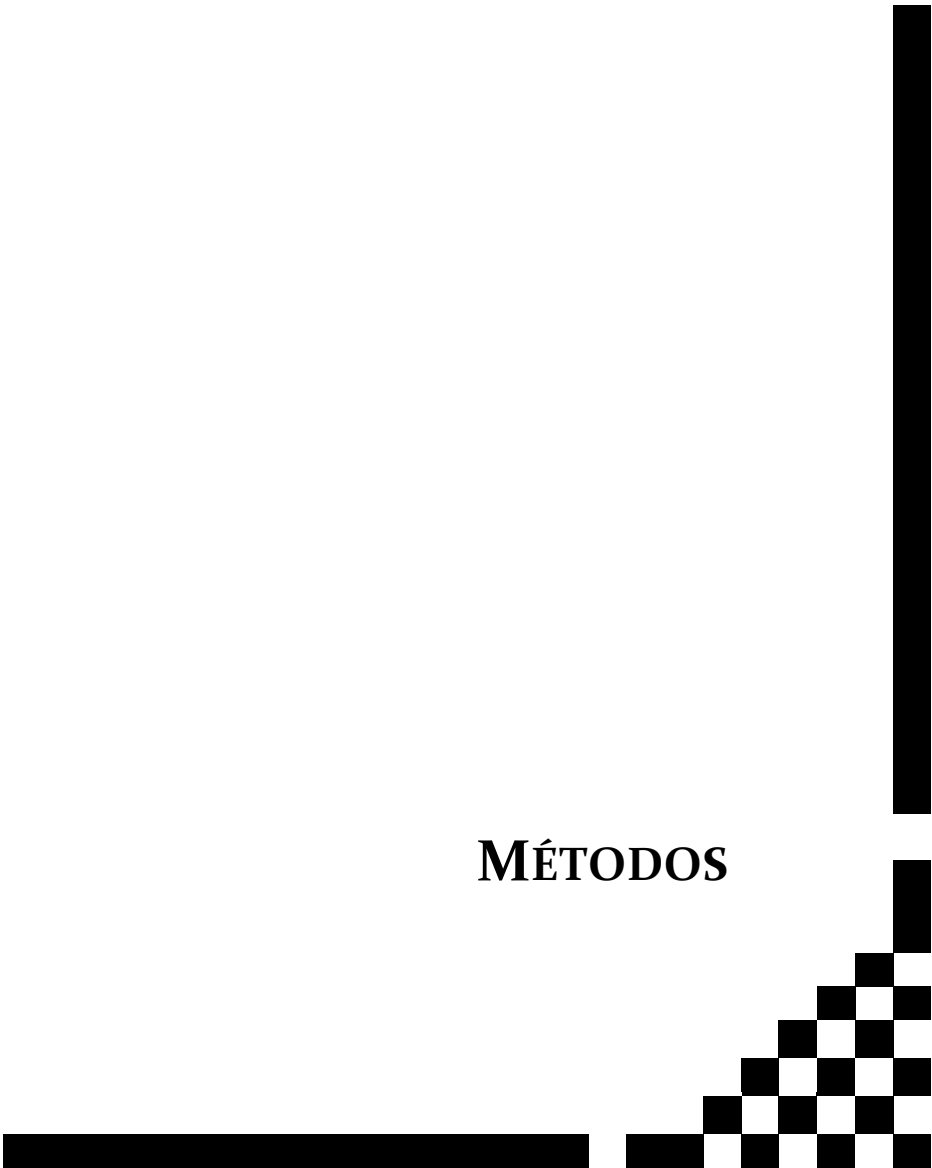
Para a diluição da atorvastatina em pó: o preparo da solução para tratamento oral, por gavagem, foi feito com a proporção de 0,1 mL de Etanol absoluto para 9,9mL de solução salina 0,9%. Em 10mL de solução, diluiu-se 200mg de atorvastatina, para que cada animal recebesse 6,0 mg em 0,3mL⁽⁷⁰⁾.

- Creme com atorvastatina a 5%

Para aplicação tópica de atorvastatina, utilizamos a base de creme idêntica ao creme usado no tratamento placebo, e adicionamos 5g de atorvastatina em pó importada do laboratório Dr. Reddy's®, India, para cada 100g de creme.

3.3 Animais

Ratos Wistar machos foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp com três semanas de idade. Os animais ração comercial (Nuvilab CR-1, da Nuvital) e água *ad libitum* e foram mantidos em caixas individuais sob condição padronizada de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.



MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Procedimentos com animais

A anestesia para os procedimentos com os animais foi realizada com a mistura de cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e Cloridrato de Xilasina (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil), na proporção de 80mg de cloridrato de cetamina para 8mg de xilasina, e a dose aplicada foi de 0,2 mL da mistura/100g de peso corporal do animal.

Com oito semanas de idade e peso médio de 250g, os animais foram submetidos à excisão de pele, com *punch* de 8mm de formato circular, na linha mediana na região dorsal. Cada animal recebeu a seguir do procedimento da ferida 60 mg.Kg⁻¹ de dipirona sódica oral⁽⁷⁰⁾. Estudos que avaliaram a dor no pós-operatório demonstraram que os ratos que receberam analgésico nesta fase apresentaram redução do quadro de dor e desconforto, recuperação mais rápida e aumento na ingestão de comida⁽⁷¹⁾.

Durante o experimento, os animais foram mantidos acondicionados em caixas individuais, com ração e água *ad libitum* e a cada 250 ml de água, trocada diariamente, continha 25mg de dipirona sódica. Eles foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo P: tratamento oral placebo e creme tópico placebo.

Grupo AT: tratamento oral placebo e creme tópico com atorvastatina.

Grupo AO: tratamento oral com atorvastatina e creme tópico placebo.

Grupo ATO: tratamento oral com atorvastatina e creme tópico com atorvastatina

O tratamento oral, com solução de atorvastatina, foi realizado através do método de gavagem, dose de 6,0 mg de atorvastatina/kg de peso do animal/dia. O tratamento tópico feito

com o creme com atorvastatina 5%⁽³⁰⁾ em quantidade suficiente para cobrir inteiramente a ferida. Ambos os tratamentos foram mantidos até o dia da extração dos tecidos.

Diariamente, foi realizada a limpeza da lesão com soro fisiológico 0,9% e estas foram cobertas com creme enriquecido de atorvastatina ou seu placebo em quantidade suficiente para que cubra totalmente a lesão e nenhuma outra cobertura foi utilizada.

Para o acompanhamento do processo de cicatrização: as lesões foram fotografadas com máquina digital da marca Sony CyberShot® W510 de 12.1 megapixels, nos dias 0, 1, 3, 7, 10, 14. As medidas de área das lesões foram feitas digitalmente, com auxílio do software ImageJ, versão 1.45, do National Institute of Health (NIH, USA). A fórmula abaixo foi utilizada para calcular a taxa de regressão das feridas a partir das áreas obtidas com as fotos.

$$\frac{\text{Área da ferida (dia x)}}{\text{Área da ferida (dia 0)}} \times 100$$

Nos procedimentos de extração, os ratos foram anestesiados com a mistura de cetamina e xilasina. A ferida circular ou a cicatriz era retirada com margem de 2 a 3 mm de borda da lesão. Os animais foram sacrificados com uma sobrecarga da mistura de anestésicos, na dosagem de 0,6 mg/100g de peso do animal.

4.2 Immunoblotting

A eletroforese foi efetuada em cuba de minigel Mini-PROTEAN® III Cell da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. Aas proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de

eletrotransferência do minigel da BioRad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana solução bloqueadora de leite desnatado por duas horas à temperatura ambiente, e depois lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos para subsequente incubação com anticorpo específico.

A incubação foi feita durante a noite, a 4°C por 16 horas, sob agitação constante e, novamente, as membranas foram lavadas com solução basal em quatro sessões de dez minutos. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase.

A seguir, as membranas foram submetidas à solução de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA), por cerca de três minutos, sob agitação manual constante, e posteriormente, foram expostas ao filme de RX (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) com uso de intensificador (Cronex Lightning Plus intensifying screens – DuPont, Washington, USA) por cerca de vinte minutos. Após a primeira revelação, dependendo da qualidade da imagem obtida, novas exposições ao filme de RX foram realizadas em intervalos de tempos maiores e menores do que o primeiro. Uma vez identificadas as bandas das auto-radiografias, procedeu-se à leitura por densitometria óptica, quantificando suas áreas, utilizando-se o software UN-SCAN-IT®.

4.3 Análise estatística dos resultados

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, sendo indicado o número de amostras independentes. Para análise estatística, utilizou-se o software GraphPad Prism®. Os grupos foram comparados utilizando One-way ANOVA com o pós-teste Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.4 Aspectos éticos

A qualificação da equipe que forneceu abrigo e alimentação, realizou procedimentos experimentais, cuidados perioperatórios, tratamento, analgesia e destino dos animais após o fim dos experimentos seguem as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Unicamp, protocolo de aprovação número 2584-1. (Figura **A3**)

RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Planimetria

Na avaliação macroscópica foi realizado o acompanhamento das lesões por meio de fotografias. Nas Figura 1 e Figura 1a, apresentamos a visão macroscópica da regressão das lesões. A área total da ferida no dia 0 foi representada como 100%.

Houve diferença estatística ($p < 0,001$) do placebo para os três grupos tratados com atorvastatina nos dias 1, 3, 7 e 10. No 14º Dia, porém, houve diferença estatística apenas entre o grupo placebo e o grupo AO, sendo que as menores áreas de feridas dentre os tratados foram observadas no grupo AO.

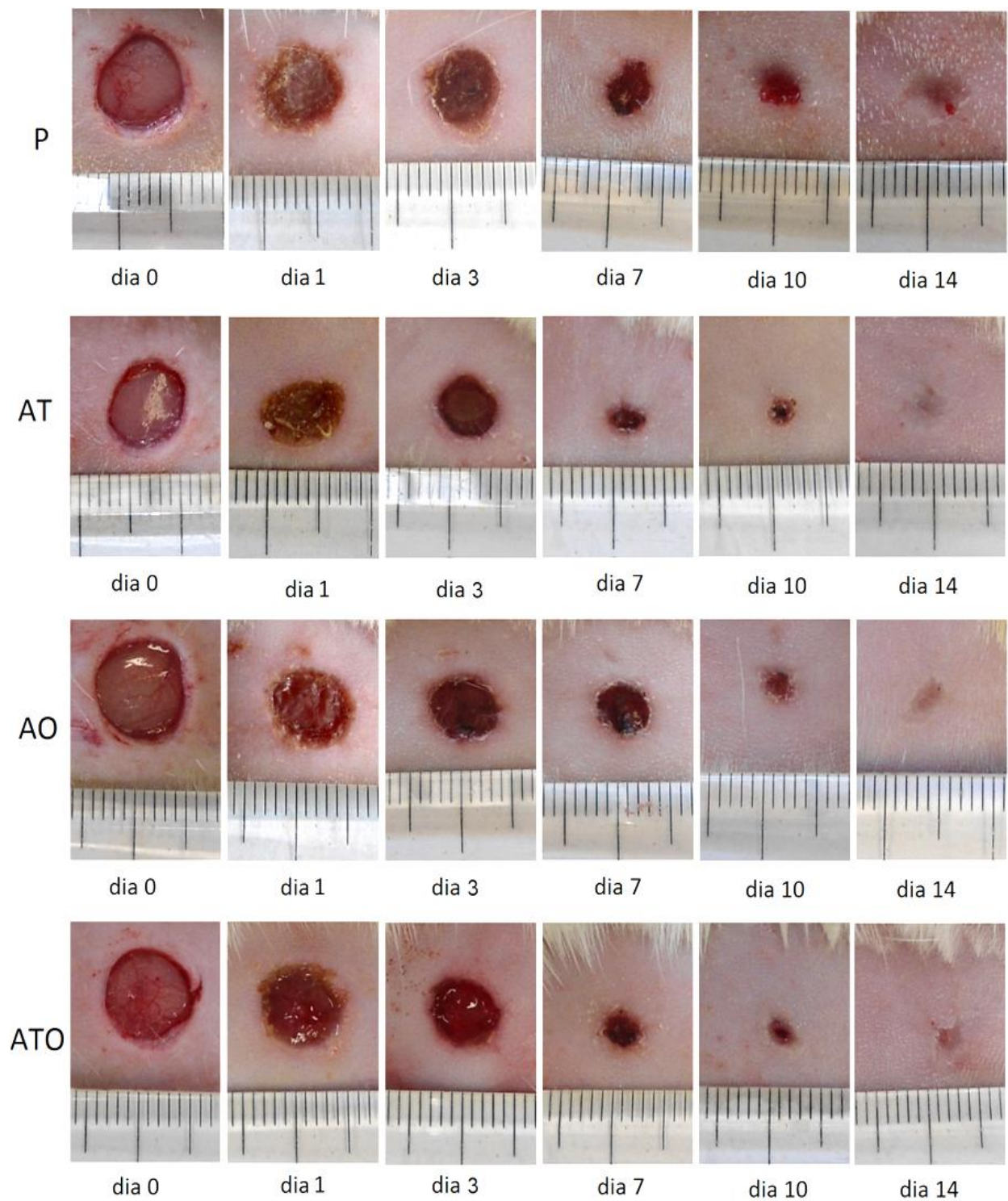


Figura 1 **Fotografias representativas das feridas nos dias 0, 1, 3, 7, 10 e 14.** Grupos: placebo (P); animais tratados com atorvastatina via oral (AO) ; tópica (AT); combinado (oral + tópica) ATO. Escala de 10 mm

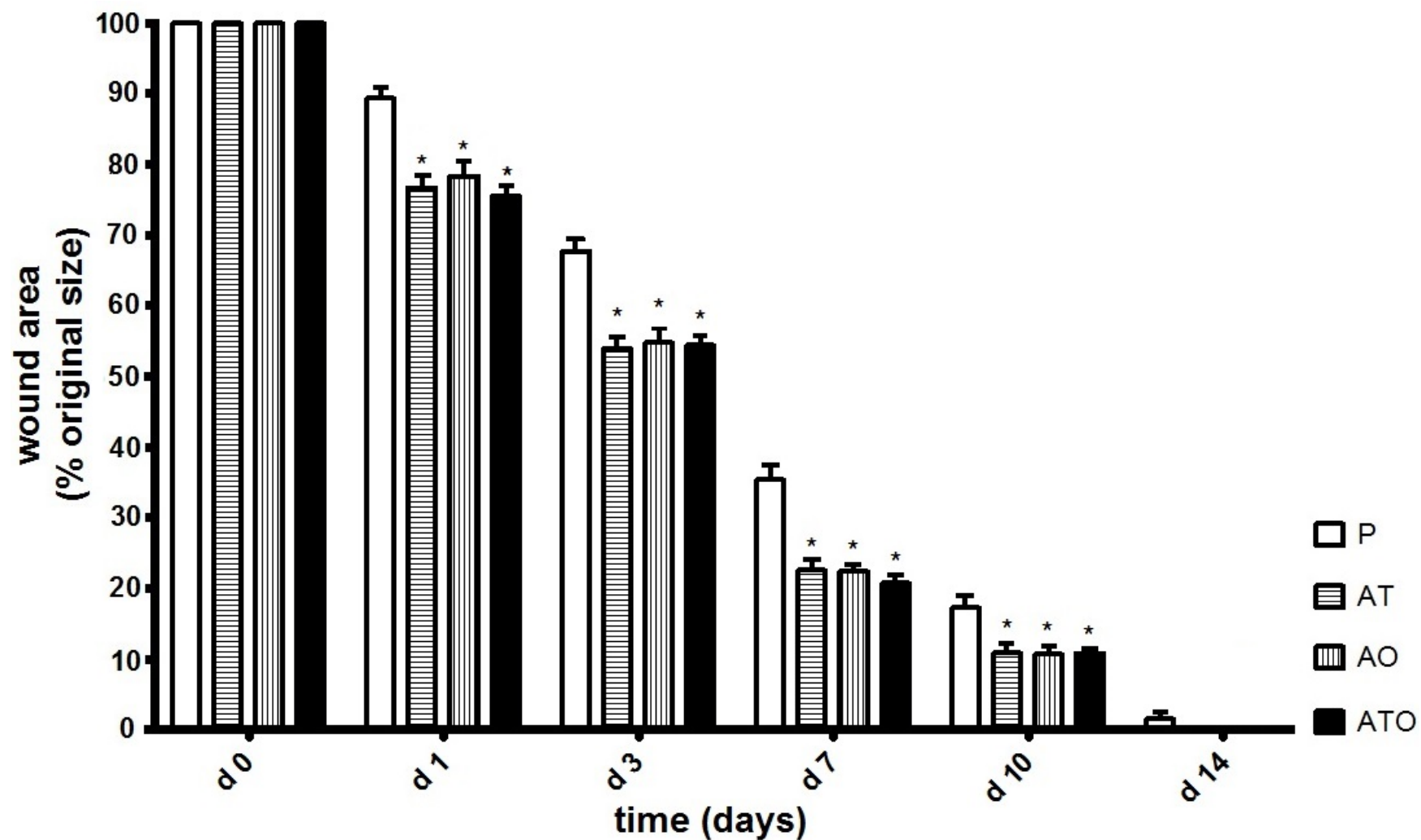


Figura 1a **Percentagem da área ferida (dia x) / área inicial (dia 0) x 100**; áreas calculadas no ImageJ. Os valores representados em médias $\pm$ EPM, n = 17-25; [*] $p < 0,05$ vs P. One-way ANOVA, pós-teste Tukey.

5.2 Atorvastatina na expressão das proteínas PI3K, Akt e GSK-3

Amostras de tecidos das lesões dos animais que receberam o tratamento placebo ou com atorvastatina foram processadas pelo método de *Western Blot* para investigação das proteínas PI3K, Akt e GSK-3.

Observou-se maior expressão da proteína PI3K (Figura 2) em sua fração catalítica p110 para os grupos AT e AO no 1º, 3º e 7º dias. No 1º dia, o grupo ATO tem menor expressão da PI3K em relação ao placebo e maior que o placebo no 3º e 7º dias ($p < 0,05$). No 14º dia, não houve diferença entre os grupos.

A fosforilação das proteínas Akt (Figura 3) e GSK-3 (Figura 4) foram maiores nos grupos AT e AO no 1º, 3º e 7º dias em relação ao placebo, seguindo a cascata de sinalização da PI3K. Ocorreu menor expressão de ambas no grupo ATO no 1º dia após lesão, porém nos dias 3 e 7 apresentou-se maior que no grupo placebo. No 14º dia, a fosforilação foi semelhante entre os grupos.

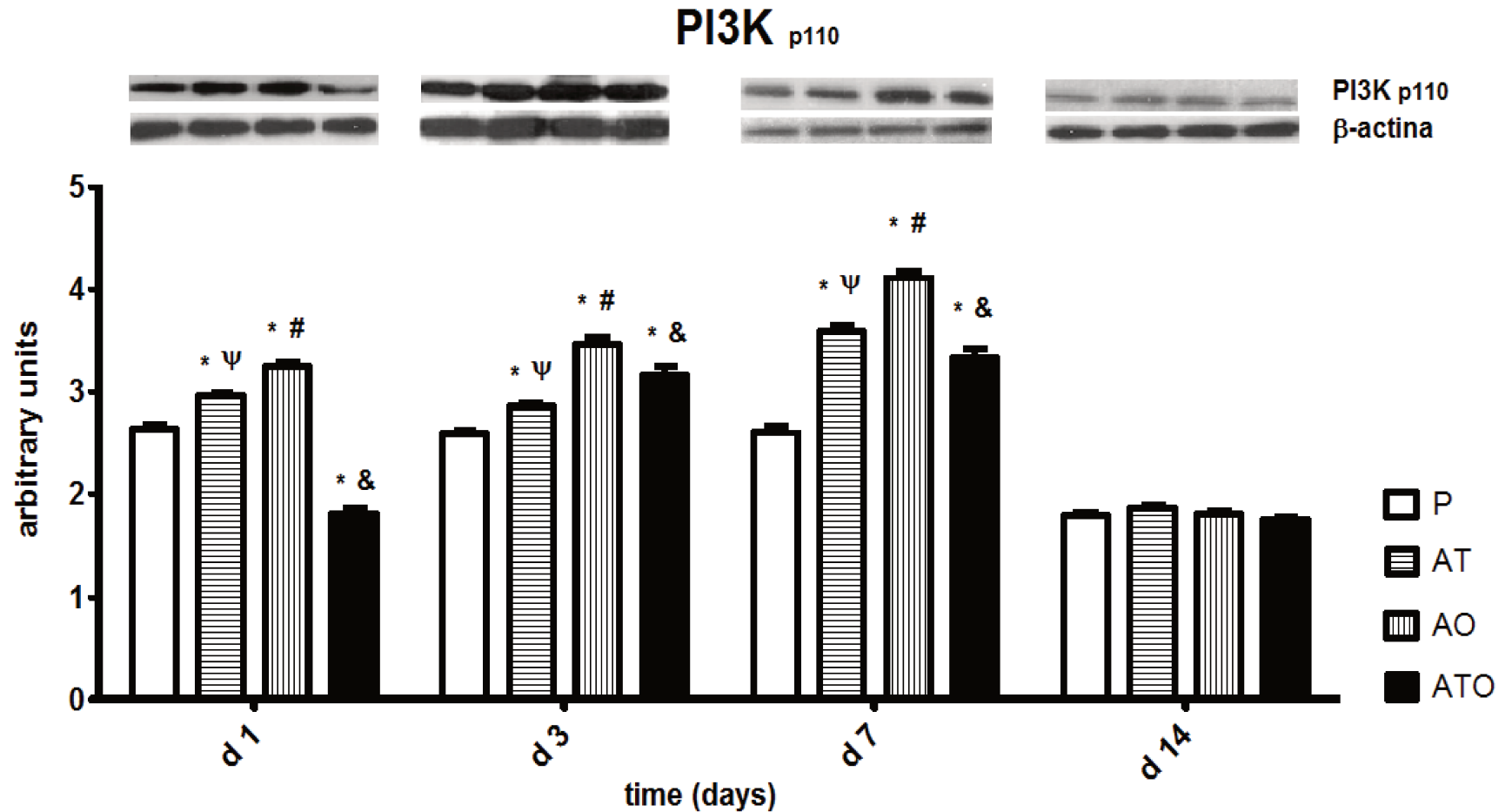


Figura 2 **Expressão da PI3K nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão da PI3K. A intensidade da banda da proteína foi normalizada como β-actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média ± EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [□] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO

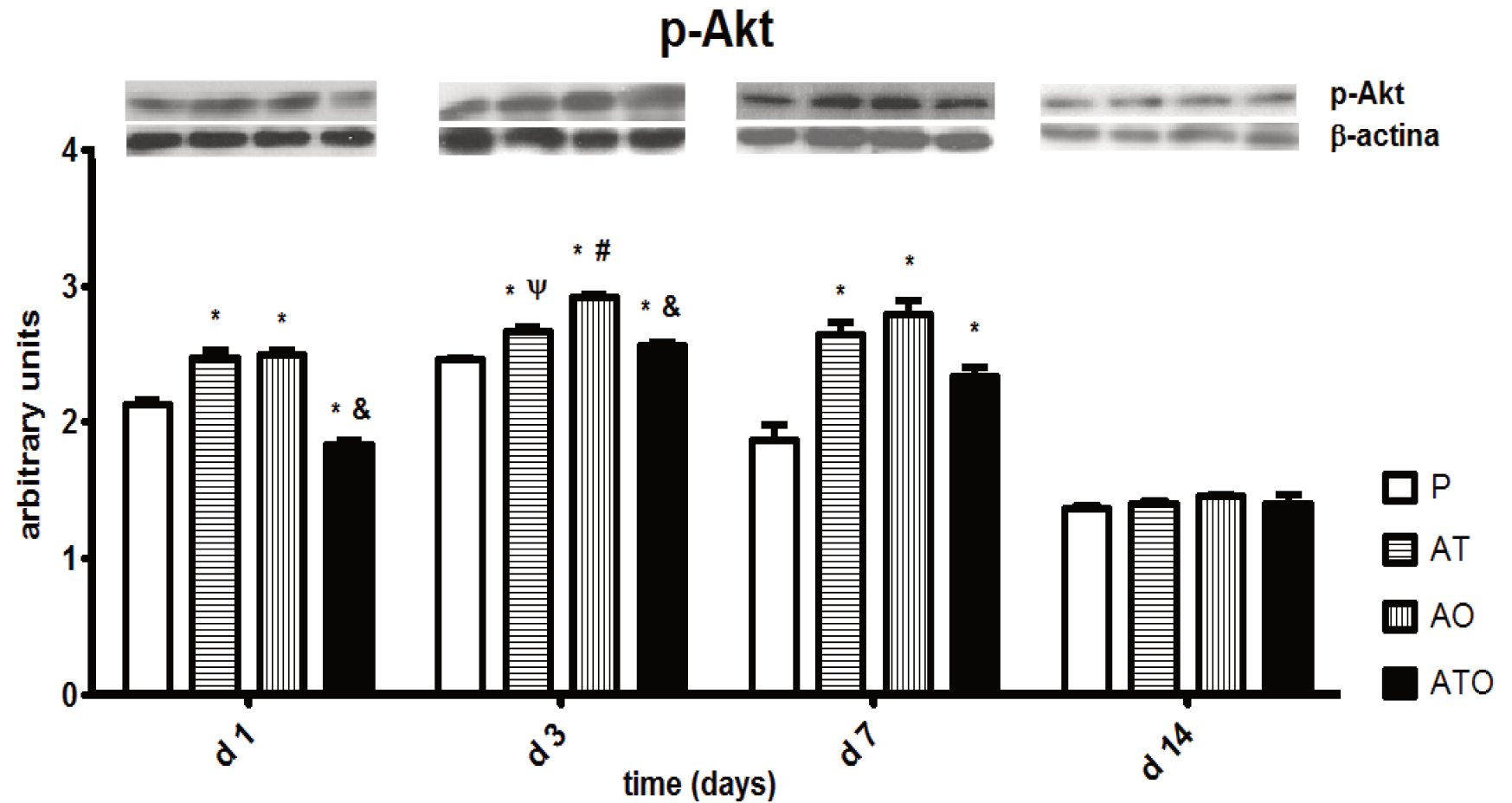


Figura 3 **Fosforilação da Akt nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a fosforilação da Akt. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β-actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média ± EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [□] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO

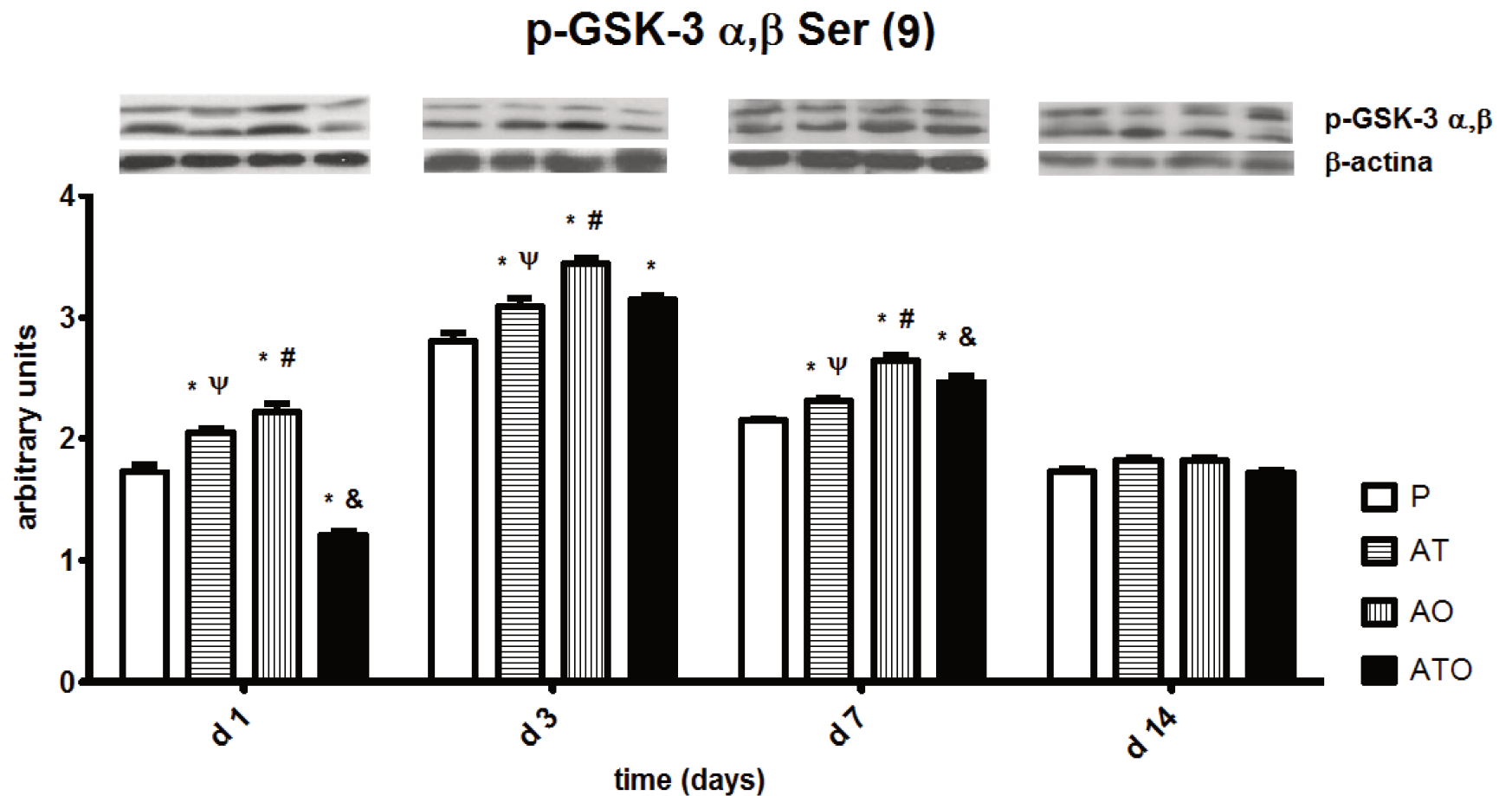


Figura 4 **Fosforilação da GSK-3 nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a fosforilação da GSK-3. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [Ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

5.3 Atorvastatina na expressão das proteínas ERK 1,2, VEGF, eNOS e TGF- β

Nos dias 1, 3 e 7, o grupo AT e AO apresentaram maior fosforilação do ERK que no grupo placebo. A fosforilação da ERK (Figura 5) mostrou-se menor no grupo ATO nos dias 1 e 3 em relação aos demais, porém 7º dia ocorre reversão do grau de fosforilação do ERK no grupo ATO, com os grupos tratados apresentando maior expressão da ERK fosforilada em relação ao placebo. Com 14 dias de seguimento, não houve diferença estatística entre os grupos quanto à fosforilação da ERK.

Na avaliação da expressão do VEGF observou-se que os tratamentos AT, AO e ATO não foram capazes de alterar a expressão deste fator de crescimento no 1º e 3º quando comparado ao grupo placebo. No 7º dia de tratamento observa-se maior expressão do VEGF para os tratados com atorvastatina em relação ao grupo placebo. Com 14 dias de seguimento não houve diferença na expressão do VEGF em relação ao grupo placebo. (Figura 6)

Quanto à eNOS (Figura 7) observa-se que no 1º, 3º e 7º dias após o tratamento a expressão desta proteína foi maior nos grupos AT e AO em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$). O grupo que recebeu o tratamento combinado (oral+ tópico) apresentou menor expressão da eNOS nos dias 1 e 3 em relação ao demais grupos. Com sete dias de tratamento o grupo combinado apresentou melhora na expressão do eNOS, aproximando-se dos grupos AT e AO. No 14º dia, os grupos que receberam tratamento com atorvastatina não apresentaram diferença em relação ao grupo placebo.

A expressão do TGF- β em relação ao placebo foi maior nos grupos de tratamento tópico AT e ATO no dia 1 e apenas no grupo AO no dia 3. No dia 7, foi maior no grupo AT e menor no grupo ATO e no 14º dia foram semelhantes ao placebo no grupo AT e menor que o placebo nos grupos AO e ATO. (Figura 8)

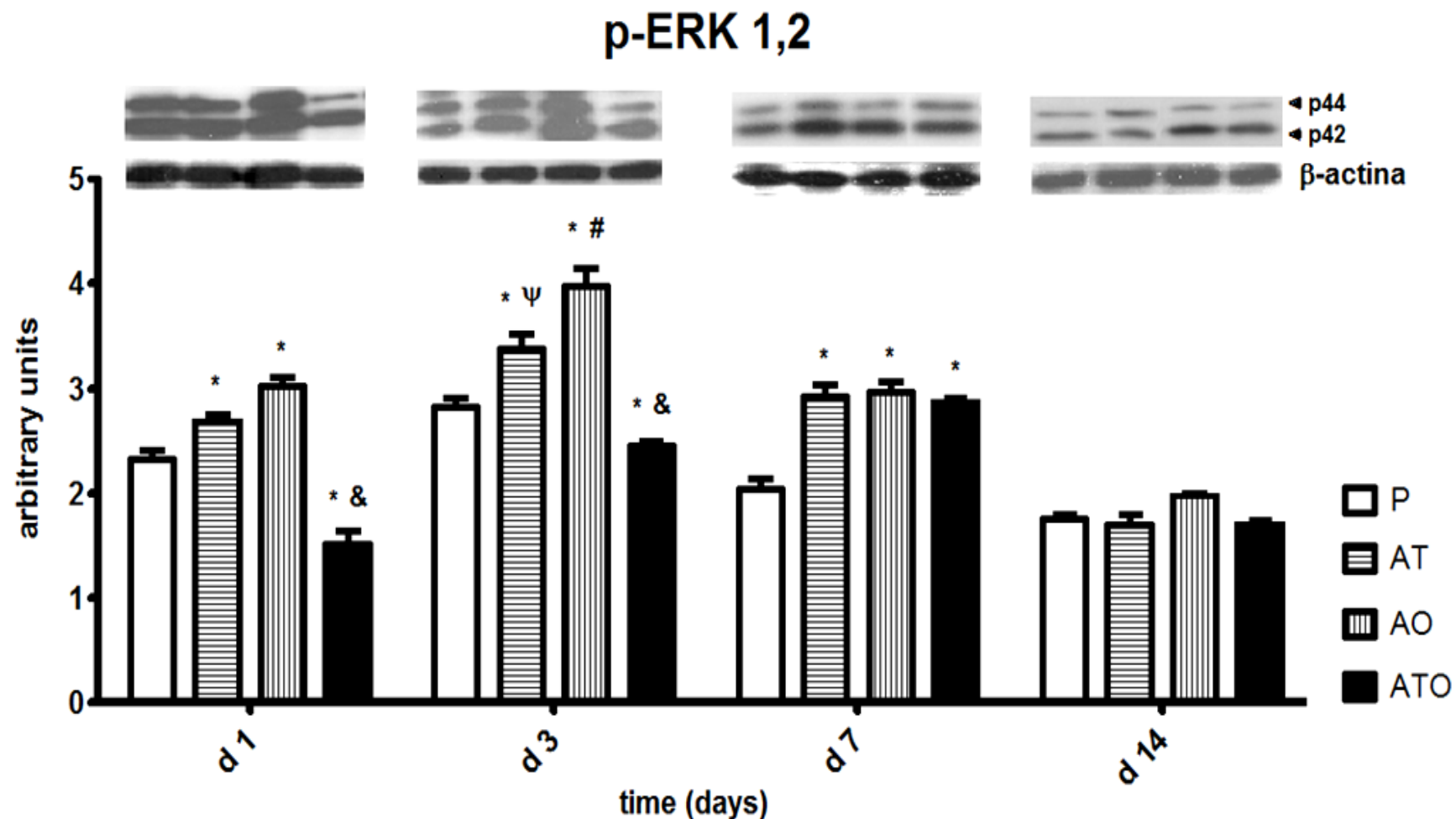


Figura 5 **Fosforilação da ERK nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a fosforilação da ERK. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β-actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média ± EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO

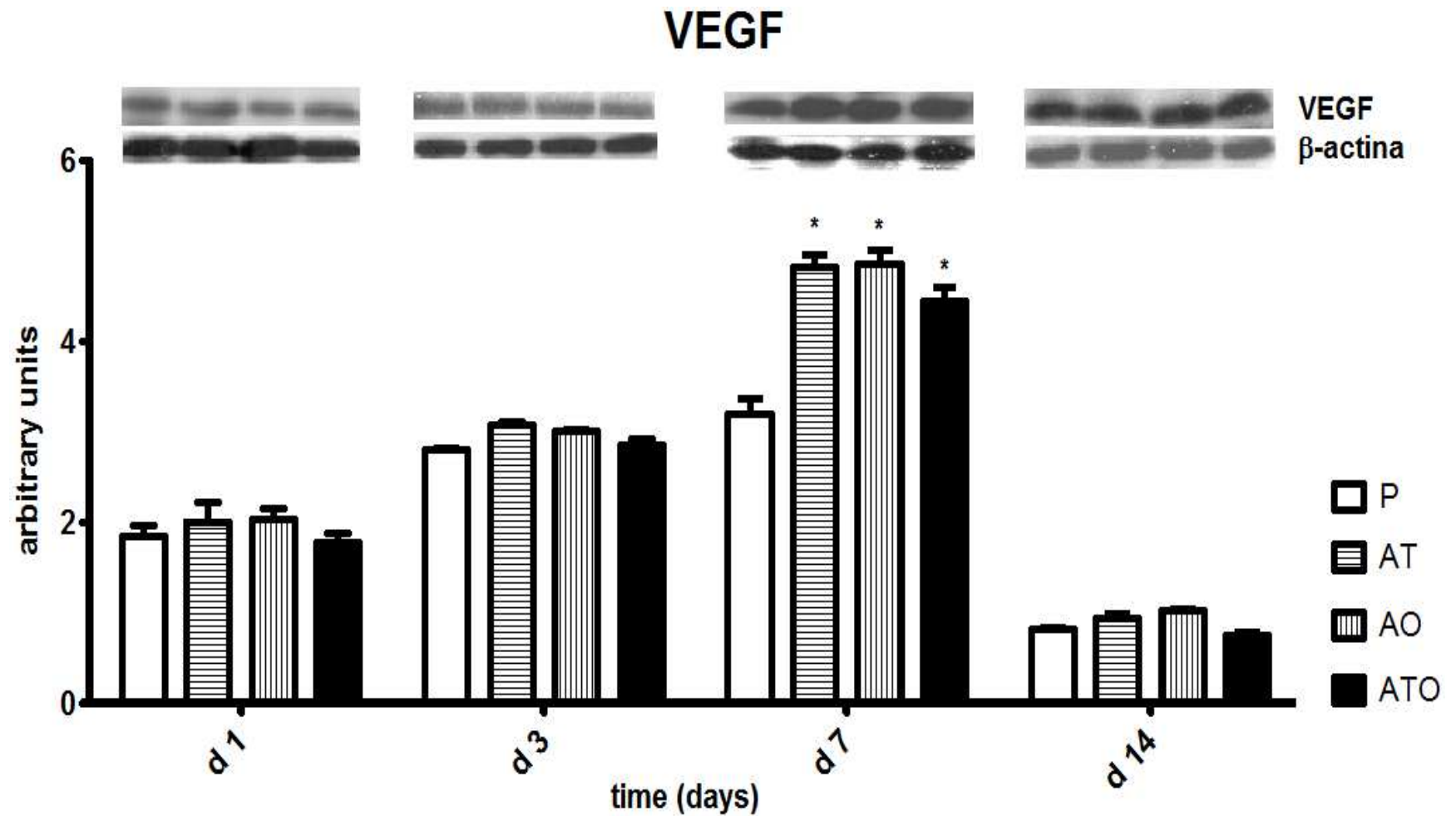


Figura 6 **Expressão do VEGF nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão do VEGF. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO

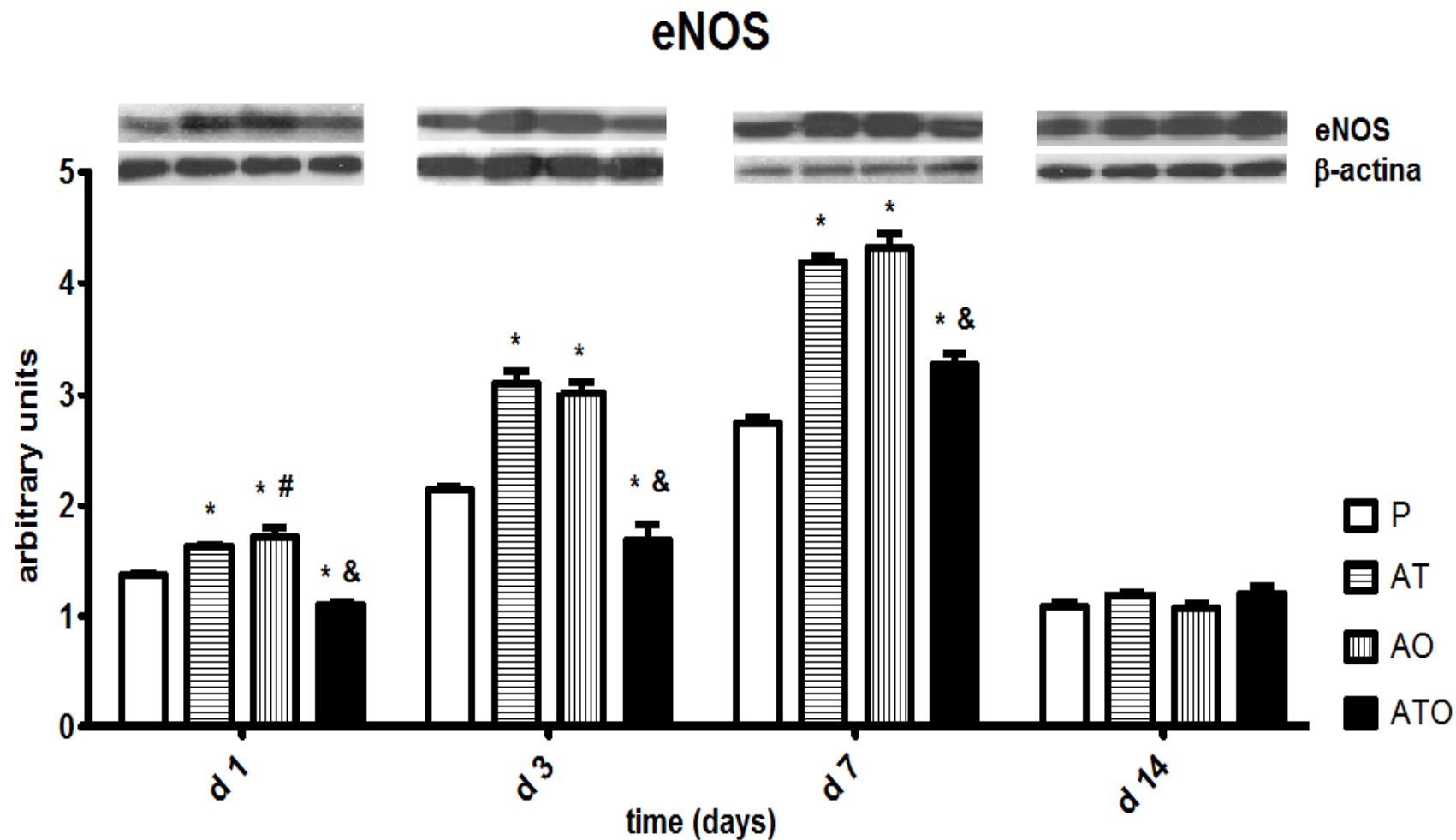


Figura 7 **Expressão da eNOS nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão da eNOS. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

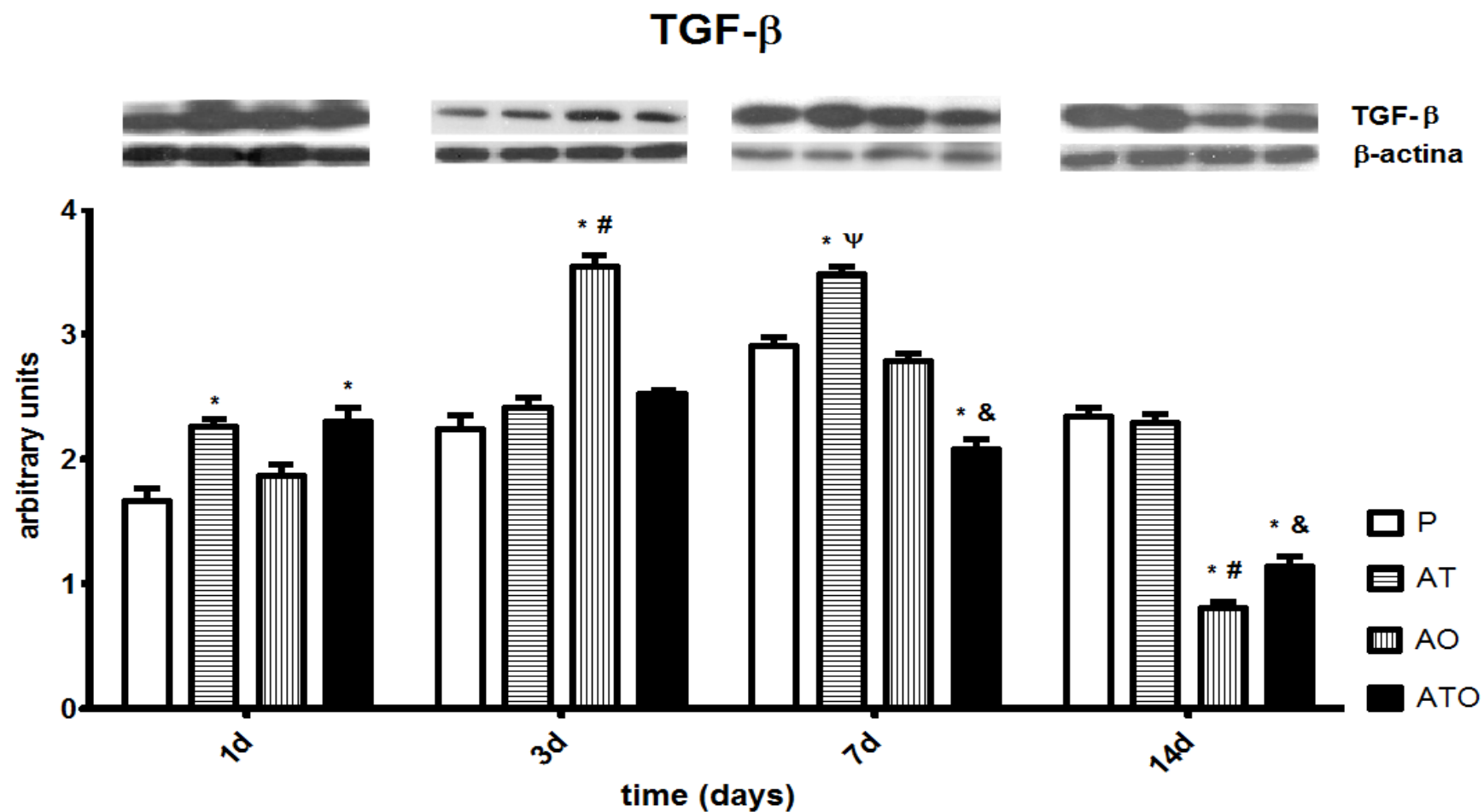


Figura 8 **Expressão do TGF- β nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão do TGF- β . A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

5.4 Atorvastatina na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10

No 1º dia após a lesão observa-se menor expressão da IL-1 β (Figura 9) para os grupos AO e ATO em relação ao placebo, No grupo de tratamento AT não houve diferença em relação ao grupo placebo. A expressão desta citocina foi menor no 3º dia para os grupos que receberam atorvastatina. Entretanto, no 7º dia após tratamento ocorreu menor expressão para os grupos AT e AO ($p < 0,05$) e não se observou diferença significativa no grupo ATO em relação placebo.

Observou-se menor expressão da IL-6 (Figura 10) para os grupos com tratamento AT, AO e ATO em relação ao controle no 1º, 3º e 7º dia após o tratamento ($p < 0,05$)

A menor expressão da TNF- α (Figura 11) foi observada em todos os grupos que receberam os tratamentos com atorvastatina em relação ao placebo nos três períodos quantificados ($p < 0,05$), sendo que, no primeiro dia, a menor quantidade do TNF- α foi encontrado no grupo ATO.

Na quantificação da expressão da IL-10 foram analisados 1º, 3º e 7º dias de tratamento com atorvastatina (Figura 12). Nestes períodos estudados houve maior expressão desta citocina para todos os tratamentos em relação ao placebo ($p < 0,05$).

No 14º Dia, não foi detectada a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10.

A avaliação qualitativa das expressões das proteínas estudadas no trabalho foram resumidas no **Quadro 1**.

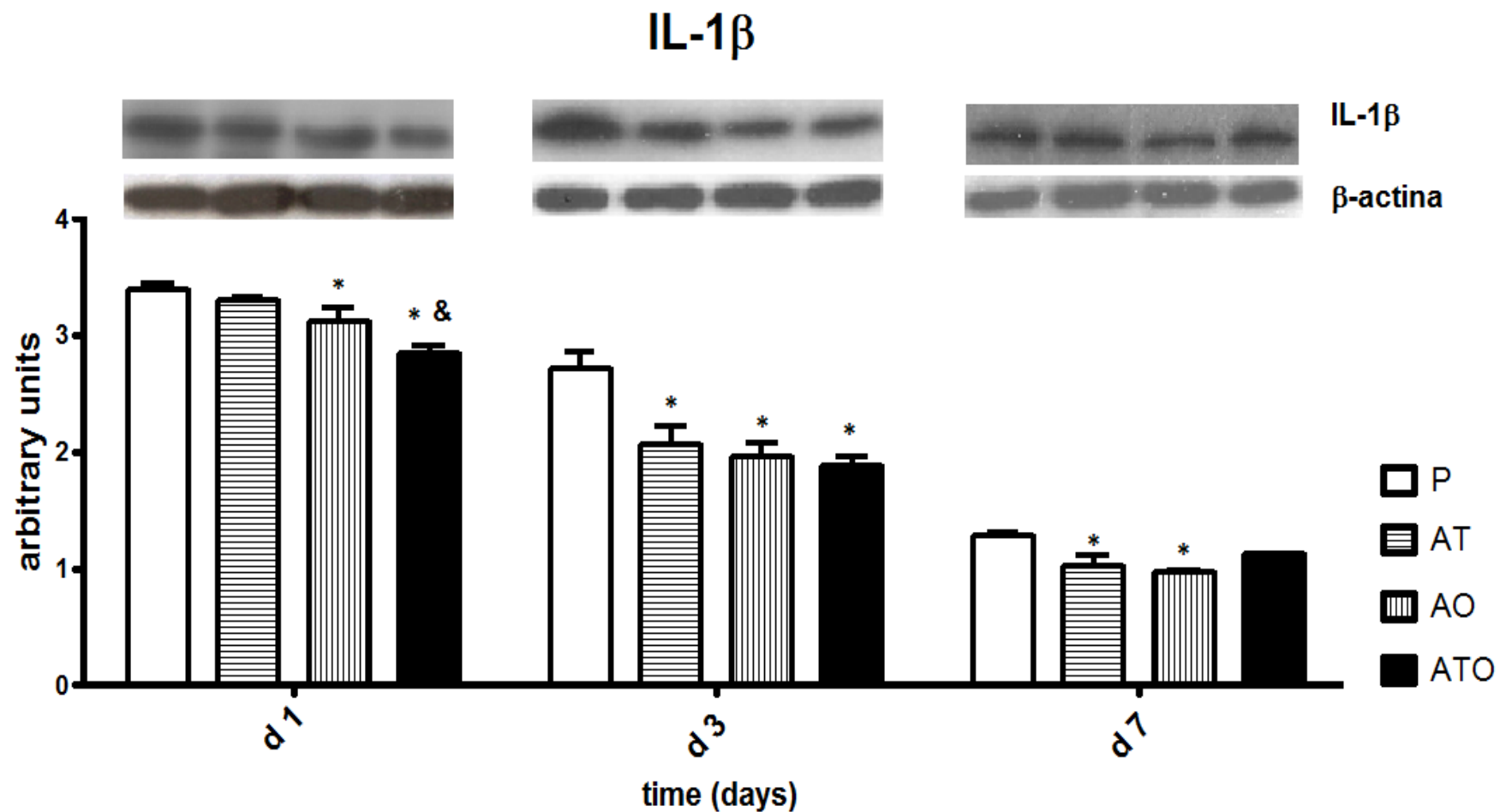


Figura 9 **Expressão da IL-1 β nos dias 1 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$, 7 $^{\circ}$ e 14 $^{\circ}$ do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão da IL-1 β . A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

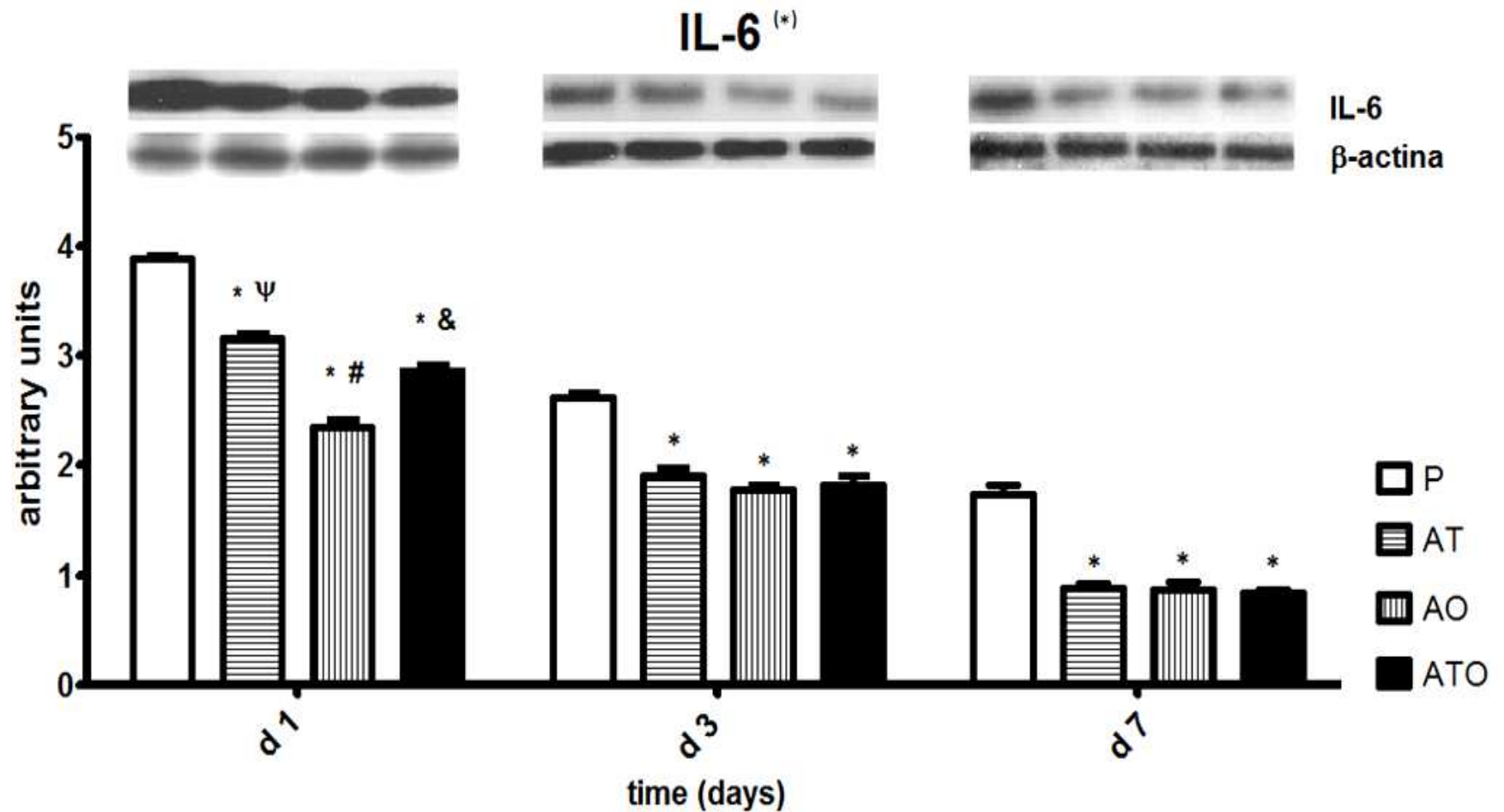


Figura 10 **Expressão da IL-6 nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão da IL-6. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β-actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média ± EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

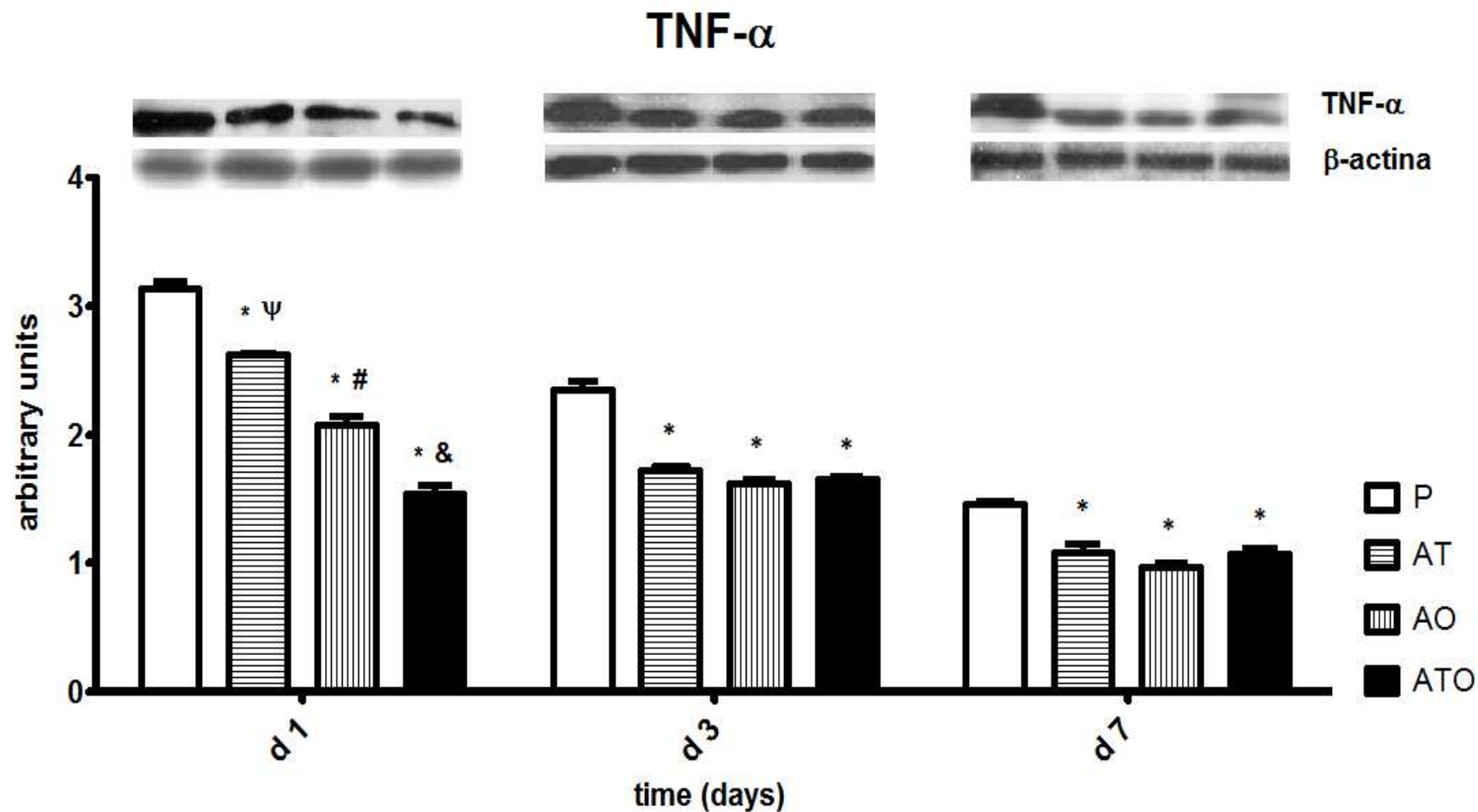


Figura 11 **Expressão da TNF- α nos dias 1º, 3º, 7º e 14º do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão do TNF- α . A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Os dados estão representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P; [ψ] AT vs AO e ATO; [#] AO vs AT e ATO; [&] ATO vs AT e AO.

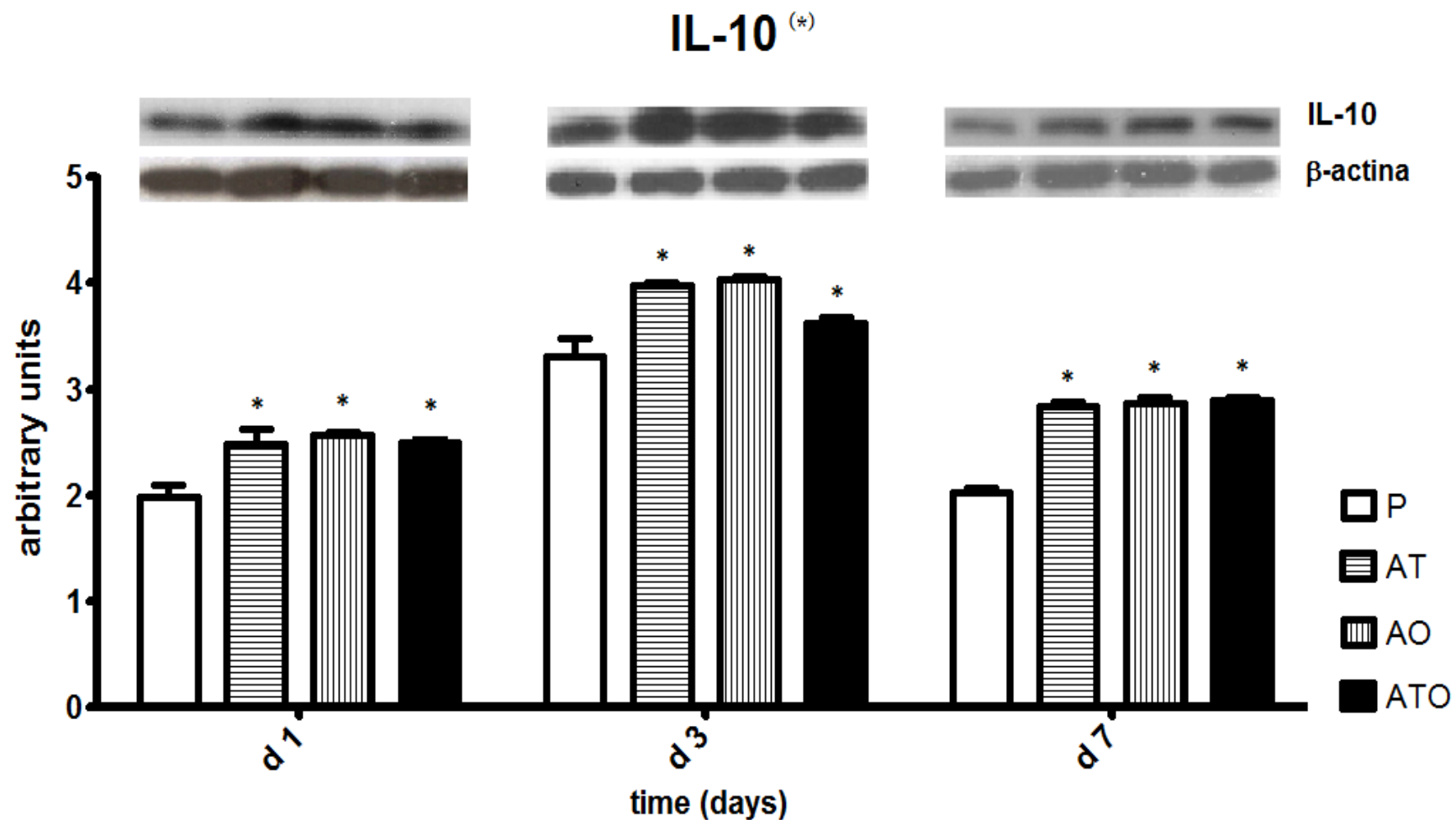


Figura 12 **Expressão da IL-10 nos dias 1, 3 e 7 do reparo tecidual.** Blots representativos mostram a expressão da IL-10. A intensidade da banda da proteína foi normalizada com β -actina. Teste One-way ANOVA, pós-teste Tukey. Dados representados em média $\pm$ EPM, (n=6). Nível de significância $p < 0,05$ para [*] AT ou AO ou ATO vs P.

Quadro 1: Expressão das proteínas avaliadas neste trabalho. As expressões estão subdivididas por dias 1, 3, 7 e 14 e por proteína, sendo [-] níveis de expressão sem diferença estatística entre os grupos, $p < 0,05$ e [N] não foi detectada expressão.

1º dia	PI3K	p-Akt	p-GSK-3	eNOS	p-ERK	VEGF	TGF- β	IL-10	IL-1 β	IL-6	TNF- α
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	-	↓	↓
AO	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	↑	↓	↓	↓
ATO	↓	↓	↓	↓	↓	-	↑	↑	↓	↓	↓
3º dia	PI3K	AKT	p-GSK-3	eNOS	p-ERK	VEGF	TGF- β	IL-10	IL-1 β	IL-6	TNF- α
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	↑	↓	↓	↓
AO	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↓	↓	↓
ATO	↑	↑	↑	↓	↓	-	-	↑	↓	↓	↓
7º dia	PI3K	AKT	p-GSK-3	eNOS	p-ERK	VEGF	TGF- β	IL-10	IL-1 β	IL-6	TNF- α
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
AO	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↓	↓	↓
ATO	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	-	↓	↓
14º dia	PI3K	AKT	p-GSK-3	eNOS	p-ERK	VEGF	TGF- β	IL-10	IL-1 β	IL-6	TNF- α
P	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	N
AT	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	N
AO	-	-	-	-	-	-	↓	N	N	N	N
ATO	-	-	-	-	-	-	↓	N	N	N	N



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar o efeito do tratamento oral, tópico e combinado (oral e tópico) com atorvastatina no reparo cicatricial de feridas de ratos Wistar. As estatinas possuem propriedades chamadas de pleiotrópicas, que são mediadas pela inibição da síntese de isoprenóides, envolvidas em processos de sinalização celular^(25, 26, 35).

Estudos anteriores^(72, 73) investigaram a ação da sinvastatina em lesões de animais e constataram melhora significativa nos grupos tratados com a estatina, observada na avaliação histológica das lesões, com aumento do processo de reepitelização, diminuição na formação de granulomas e do infiltrado inflamatório.

Embora pesquisas tenham demonstrado os benefícios dos efeitos pleiotrópicos das estatinas em lesões de animais saudáveis e também em diabéticos, o mecanismo pelo qual as estatinas exercem este efeito não está completamente elucidado, mas tende a ser um processo independente da via de formação do colesterol⁽²⁶⁾.

Observamos o aumento da expressão das proteínas PI3K e eNOS com o uso oral e tópico da atorvastatina, além do aumento na fosforilação das proteínas Akt, ERK e GSK-3 α, β , na fase inflamatória e proliferativa, entre o 1º e o 7º dia de tratamento. A maior expressão de proteínas da via PI3K/Akt em tecido cicatricial foi demonstrada com o uso tópico de insulina⁽⁷⁴⁾.

Pesquisa revelou que administração de atorvastatina protegeu o coração de camundongos de lesão letal induzida pela reperfusão, por meio da fosforilação de múltiplas vias, envolvendo não somente a via PI3K/Akt, mas também p44/42 MAPK (ERK 1,2) e p38 MAPK⁽⁴³⁾. Em outro estudo, a sinvastatina foi capaz de modular a liberação do VEGF das células vasculares de musculatura lisa atuando na via da ERK 1,2⁽⁵¹⁾. A via da Ras/ERK 1,2, quando ativada, atua de modo anti-inflamatório na pele ao suprimir a expressão de citocinas pro-inflamatórias⁽⁷⁵⁾ e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10⁽⁷⁶⁾.

Trabalho mostrou que a expressão do VEGF induzida pelo uso de atorvastatina em cardiomiócitos foi modulada pela ativação da ERK 1,2 e da p38 MAPK. Ao fosforilar a p38 MAPK, a atorvastatina aumentou a expressão do VEGF, enquanto ao fosforilar a ERK 1,2, fez a contra-regulação, diminuindo os níveis de VEGF⁽⁷⁷⁾. Nossos resultados também mostraram que, com o aumento na fosforilação da ERK 1,2 nos grupos tratados com atorvastatina, houve modulação dos níveis de VEGF no 1º e 3º dias.

Produzido em queratinócitos, o VEGF é uma das mais potentes citocinas angiogênicas⁽¹³⁾ e está associado a uma variedade de eventos neovasculares fisiológicos e patológicos, tais como o desenvolvimento embriogênico, crescimento tumoral e reparo tecidual⁽⁷⁸⁾.

Estudo com animais diabéticos tratados com sinvastatina intraperitonal apresentou rápida cicatrização da ferida mediada por um cross-talk entre NO e VEGF; a ativação desta via levou ao restabelecimento do processo de angiogênese e consequente aumento da cicatrização⁽⁵⁸⁾.

Lesões de animais diabéticos tratadas com sinvastatina tópica tiveram benefícios no reparo tecidual, aumento significativo da angiogênese, linfangiogenese e da infiltração de macrófagos em relação aos animais tratados com placebo, sugerindo ação da estatina sobre o VEGF liberado pelos macrófagos⁽⁷⁹⁾. É provável que haja ligação entre as estatinas e Akt, participando de processos proangiogênicos nas células endoteliais, incluindo aumento do óxido nítrico (NO) através do aumento da eNOS^(31, 49, 56).

Na via da PI3K/Akt⁽⁷⁴⁾, a insulina promove o aumento da produção de NO⁽⁸⁰⁾. Recentemente, pesquisas mostraram que o fator induzido por hipóxia (HIF-1) e o NO aumentaram a produção do VEGF através da ativação da Akt^(49, 78, 79, 81, 82). Nossos dados revelaram que as proteínas da fase inicial da cicatrização envolvidas no eixo PI3K/Akt estão

elevadas em feridas dos grupos de tratamento AT e AO, quando comparado com animais tratados com placebo.

Estudos mostraram resultados opostos na ação das estatinas sobre a via clássica do TGF- β /Smad, ora aumentando⁽⁸³⁾, ora diminuindo^(31, 84) os níveis de TGF- β . Outras vias de sinalização celular do TGF- β independente das Smad são as vias MAPK/ERK, PI3K/Akt e GTPases^(85, 86); nosso trabalho mostrou que nos tratamentos AT e AO, as vias MAPK/ERK e PI3K/Akt estão mais ativas do que no placebo.

A expressão do TGF- β foi modulada pela ação antiinflamatória da atorvastatina e que, conjuntamente com a IL-10, podem ter contribuído para uma resolução mais rápida da fase inflamatória. Observou-se no grupo AT uma elevação controlada dos níveis de TGF- β enquanto no grupo AO houve um aumento mais rápido entre o 3º e 7º dias e os níveis mais baixos dentre os tratados no 14º dia, já na fase de remodelamento. Sugerimos que o TGF- β pode ter atuado também na fosforilação do GSK-3- β e da ERK, como observado em outros trabalhos^(67, 87), e pode ter estimulado a produção de VEGF sob hipóxia⁽⁸⁸⁾.

Outra proposta do estudo foi investigar ação anti-inflamatória da atorvastatina aplicada topicamente, via oral ou combinada (oral + tópica). As citocinas pro-inflamatórias, particularmente IL-1 e IL-6 e TNF- α são reguladas durante a fase inflamatória do reparo tecidual⁽¹¹⁾. De acordo com estudos, as estatinas parecem interferir na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α observadas nos processos inflamatórios como sepse, colite e feridas infectadas⁽⁸⁹⁻⁹²⁾. A partir das primeiras horas pós-lesão, a produção do VEGF é induzida principalmente por citocinas, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α ^(13, 51, 77). Nossos resultados mostraram redução destas citocinas pró-inflamatórias desde o primeiro dia até o 7º dia. Estudo com uso oral da atorvastatina mostrou menor expressão de VEGF, TNF- α e TGF- β o que levou à inibição parcial da angiogênese⁽³¹⁾.

A expressão do VEGF não teve alteração em relação aos níveis apresentados pelo tratamento placebo no primeiro, terceiro e 14º dias. Apenas no 7º dia houve aumento do VEGF nos grupos tratados com atorvastatina. Sugere-se que a maior expressão do VEGF neste período pode estar relacionada tanto ao aumento na expressão da eNOS via PI3K/Akt, com maior produção de NO, quanto pela ação de MAPK^(13, 77, 93) sobre os queratinócitos.

Durante o processo cicatricial há um balanço na expressão das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-10 é capaz de alterar o fenótipo e atividade funcional dos monócitos/macrófagos⁽¹⁴⁾, queratinócitos e células do endotélio vascular^(14, 94, 95).

A modulação da expressão do VEGF vista no primeiro e terceiro dias sugerem a ação da IL-10 sobre este fator de crescimento⁽⁹⁶⁾. Estudo sugere um efeito benéfico no aumento da IL-10 associado à prevenção de um processo desorganizado de angiogênese a partir da modulação dos níveis de VEGF⁽⁹⁵⁾, que pode ser importante também para a redução de edema e da formação de cicatriz e fibrose⁽⁹⁷⁾.

Houve maior expressão da IL-10 nos grupos tratados com atorvastatina que no placebo desde as primeiras 24hs até o 7º dia pós-lesão. Em monócitos e macrófagos ocorre maior produção da IL-10, com aumento da expressão da proteína PI3K e da fosforilação da Akt e GSK-3^(63, 65), corroborando nossos resultados que mostraram maior ativação da via e também maior expressão desta citocina. Este dado sugere que tratamento com atorvastatina foi capaz de modular a IL-10 e promover a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa mais precocemente.

Estudos que investigaram ação antiinflamatória das estatinas aplicadas topicamente em modelos de inflamação aguda ou crônica observaram melhora no edema, migração de leucócitos e diminuição na espessura da epiderme^(72, 98). Nossos resultados confirmam a

atividade antiinflamatória no uso tópico da atorvastatina em situações de inflamação cutânea aguda.

Mostramos que o tratamento combinado ATO reduziu a expressão da PI3K e a atividade das proteínas IRS-1, Akt e GSK-3, no 1º dia e da eNOS e ERK 1,2 no 1º e 3º dias do reparo tecidual. Esta ação pode ser explicada pela dosagem de atorvastatina que os animais receberam no grupo ATO. Em baixas doses, como nos grupos AT e AO, as estatinas exerceriam seus efeitos pleiotrópicos sem alterar a síntese do colesterol que forma membranas celulares. Entretanto, em altas doses, a síntese do colesterol e a formação de novas células seriam menores, devido a uma sobreposição das doses administradas por duas vias de metabolização diferentes (via oral e via tópica) e a conversão da atorvastatina em metabólitos ativos, propiciando doses mais altas que nos grupos AT e AO e ação antiproliferativa ^(31, 48, 79).

Observou-se que na fase de remodelamento, por volta do 14º dia, as lesões estavam completamente cicatrizadas nos animais que receberam o tratamento com atorvastatina quando comparadas ao placebo e não houve diferença estatística na expressão das proteínas investigadas nesse dia.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Demonstramos que o tratamento oral e/ou tópico com atorvastatina modulou as etapas iniciais da via de sinalização PI3K/Akt, com aumento na expressão da GSK-3, eNOS e VEGF na lesão aguda de animais.

Em relação às citocinas, o tratamento com atorvastatina tópica, por gavagem ou combinado foi capaz de aumentar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuiu a expressão das pro-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em lesão aguda em animais saudáveis.

A atorvastatina promoveu redução da fase inflamatória e melhor resolução da fase proliferativa. Portanto, o uso desta estatina contribuiu para um processo cicatricial de lesões agudas mais eficaz.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011;216(7):753-62.
2. Enoch S, Leaper DJ. *Basic science of wound healing*. UK: Oxford; 2008. p. 31-7.
3. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736-43.
4. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care*. 2005;28(2):461-71.
5. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen*. 2003;11 Suppl 1:S1-28.
6. Balbino C, Pereira L, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*. 2005;41(1):27-51.
7. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol*. 2001;12(6):303-13.
8. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
9. Chin G, Schultz G, Chegini N, Diegelmann R. Biochemistry of Wound Healing in Wound Care Practice. In: Sheffield P, Smith A, Fife C, editors. *Wound Care Practice*. Second edition ed. Flagstaff, Arizona: Best Publishing Company; 2007. p. 1-800.
10. Aktunc E, Ozacmak VH, Ozacmak HS, Barut F, Buyukates M, Kandemir O, et al. N-acetyl cysteine promotes angiogenesis and clearance of free oxygen radicals, thus improving wound healing in an alloxan-induced diabetic mouse model of incisional wound. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35(8):902-9.
11. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):514-25.
12. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008.
13. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-58.
14. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-70.
15. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219-29.
16. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
17. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*. 2002;7(1):1-10.
18. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004;187(5A):11S-6S.

19. Wertheimer E, Trebicz M, Eldar T, Gartsbein M, Nofeh-Moses S, Tennenbaum T. Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2000;115(1):24-9.
20. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*. 2004;145(6):2997-3003.
21. Blakytyn R, Jude EB, Martin Gibson J, Boulton AJ, Ferguson MW. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *J Pathol*. 2000;190(5):589-94.
22. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
23. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*. 2001;50(7):1627-35.
24. Laing T, Hanson R, Chan F, Bouchier-Hayes D. Effect of pravastatin on experimental diabetic wound healing. *J Surg Res*. 2010;161(2):336-40.
25. Schiefelbein D, Goren I, Fisslthaler B, Schmidt H, Geisslinger G, Pfeilschifter J, et al. Biphasic regulation of HMG-CoA reductase expression and activity during wound healing and its functional role in the control of keratinocyte angiogenic and proliferative responses. *J Biol Chem*. 2008;283(22):15479-90.
26. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
27. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000;6(9):1004-10.
28. Van Linthout S, Riad A, Dhayat N, Spillmann F, Du J, Dhayat S, et al. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2007;50(9):1977-86.
29. Johansen OE, Birkeland KI, Jørgensen AP, Orvik E, Sørsgård B, Torjussen BR, et al. Diabetic foot ulcer burden may be modified by high-dose atorvastatin: A 6-month randomized controlled pilot trial. *J Diabetes*. 2009;1(3):182-7.
30. Toker S, Gulcan E, Cayc MK, Olgun EG, Erbilien E, Ozay Y. Topical atorvastatin in the treatment of diabetic wounds. *Am J Med Sci*. 2009;338(3):201-4.
31. Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(1):29-34.
32. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2000;6(12):1399-402.
33. Tang TT, Song Y, Ding YJ, Liao YH, Yu X, Du R, et al. Atorvastatin upregulates regulatory T cells and reduces clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Lipid Res*. 2011;52(5):1023-32.
34. Clarke RM, Lyons A, O'Connell F, Deighan BF, Barry CE, Anyakoha NG, et al. A pivotal role for interleukin-4 in atorvastatin-associated neuroprotection in rat brain. *J Biol Chem*. 2008;283(4):1808-17.

35. Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Vouthounis C, Krzyzanowska A, Das S, et al. Farnesyl pyrophosphate inhibits epithelialization and wound healing through the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 2010;285(3):1980-8.
36. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005;19(1):117-25.
37. Jowkar F, Namazi MR. Statins in dermatology. *Int J Dermatol*. 2010;49(11):1235-43.
38. Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*. 1992;267(28):20033-8.
39. Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):623-9.
40. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997;11(18):2295-322.
41. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):358-70.
42. Arnaud C, Brauersreuther V, Mach F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(6):202-6.
43. Efthymiou CA, Mocanu MM, Yellon DM. Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: new pleiotropic effect implicating multiple prosurvival signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45(3):247-52.
44. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*. 1995;332(8):488-93.
45. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation*. 1997;95(5):1126-31.
46. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106(1):57-62.
47. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273(37):24266-71.
48. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther*. 2003;99(1):95-112.
49. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90(12):1243-50.
50. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res*. 2005;97(12):1232-5.
51. Takenaka M, Hirade K, Tanabe K, Akamatsu S, Dohi S, Matsuno H, et al. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(1):198-203.
52. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J*. 2001;15(13):2530-2.

53. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*. 2002;105(6):739-45.
54. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108(3):391-7.
55. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108(3):399-405.
56. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res*. 2002;90(6):737-44.
57. Li M, Losordo DW. Statins and the endothelium. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(1):1-9.
58. Bitto A, Minutoli L, Altavilla D, Polito F, Fiumara T, Marini H, et al. Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes. *Pharmacol Res*. 2008;57(2):159-69.
59. Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7772-7.
60. Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, Hino Y, Kuroda S, Takata M, et al. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol*. 1998;18(7):3708-17.
61. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995;376(6541):599-602.
62. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
63. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*. 2005;6(8):777-84.
64. Beurel E, Michalek SM, Jope RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol*. 2010;31(1):24-31.
65. Rodionova E, Conzelmann M, Maraskovsky E, Hess M, Kirsch M, Giese T, et al. GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood*. 2007;109(4):1584-92.
66. Campbell M, Allen WE, Sawyer C, Vanhaesebroeck B, Trimble ER. Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circ Res*. 2004;95(4):380-8.
67. Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, et al. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res*. 2008;57(4):274-82.
68. Danesh FR, Kanwar YS. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J*. 2004;18(7):805-15.

69. Van Linthout S, Riad A, Dhayat N, Spillmann F, Du J, Dhayat S, et al. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2007;50(9):1977-86.
70. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-61.
71. Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*. 2003;29(1):1-14.
72. Adami M, Prudente AaS, Mendes DA, Horinouchi CD, Cabrini DA, Otuki MF. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. *J Dermatol Sci*. 2012;66(2):127-35.
73. Karadeniz Cakmak G, Irkorucu O, Ucan BH, Emre AU, Bahadir B, Demirtas C, et al. Simvastatin improves wound strength after intestinal anastomosis in the rat. *J Gastrointest Surg*. 2009;13(9):1707-16.
74. Lima MH, Caricilli AM, de Abreu LL, Araújo EP, Pelegrinelli FF, Thirone AC, et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *PLoS One*. 2012;7(5):e36974.
75. Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Mariani V, Girolomoni G. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation. *J Immunol*. 2005;174(8):5047-56.
76. Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, et al. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol*. 2005;174(9):5630-5.
77. Nakajima K, Suga H, Matsuno H, Ishisaki A, Hirade K, Kozawa O. Differential roles of MAP kinases in atorvastatin-induced VEGF release in cardiac myocytes. *Life Sci*. 2006;79(12):1214-20.
78. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2879-87.
79. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, et al. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2012;181(6):2217-24.
80. Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 2000;101(13):1539-45.
81. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*. 2000;95(1):189-97.
82. Wong VW, Crawford JD. Vasculogenic cytokines in wound healing. *Biomed Res Int*. 2013;2013:190486.
83. Rodríguez-Vita J, Sánchez-Galán E, Santamaría B, Sánchez-López E, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, et al. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One*. 2008;3(12):e3959.
84. Mizuguchi Y, Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Hayakawa M. Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction. *J Urol*. 2004;172(6 Pt 1):2456-9.
85. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(12):2059-81.

86. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):128-39.
87. Secker GA, Shortt AJ, Sampson E, Schwarz QP, Schultz GS, Daniels JT. TGFbeta stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and Ras/MEK/ERK signalling. *Exp Cell Res.* 2008;314(1):131-42.
88. Nam EH, Park SR, Kim PH. TGF-beta1 induces mouse dendritic cells to express VEGF and its receptor (Flt-1) under hypoxic conditions. *Exp Mol Med.* 2010;42(9):606-13.
89. Rego AC, Araújo Filho I, Damasceno BP, Egito ES, Silveira IA, Brandão-Neto J, et al. Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats. *Acta Cir Bras.* 2007;22 Suppl 1:57-63.
90. Aktunc E, Kayhan B, Arasli M, Gun BD, Barut F. The effect of atorvastatin and its role on systemic cytokine network in treatment of acute experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011;33(4):667-75.
91. Calisto KL, Carvalho BeM, Ropelle ER, Mittestainer FC, Camacho AC, Guadagnini D, et al. Atorvastatin improves survival in septic rats: effect on tissue inflammatory pathway and on insulin signaling. *PLoS One.* 2010;5(12):e14232.
92. Stumpf C, Petzi S, Seybold K, Wasmeier G, Arnold M, Raaz D, et al. Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond).* 2009;116(1):45-52.
93. Wietecha MS, Cerny WL, Dipietro LA. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;367:3-32.
94. Kassan M, Galan M, Partyka M, Trebak M, Matrougui K. Interleukin-10 released by CD4(+)CD25(+) natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(11):2534-42.
95. Dace DS, Khan AA, Kelly J, Apte RS. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. *PLoS One.* 2008;3(10):e3381.
96. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res.* 2000;87(6):448-52.
97. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25(1):87-91.
98. Bracht L, Caparroz-Assef SM, Magon TF, Ritter AM, Cuman RK, Bersani-Amado CA. Topical anti-inflammatory effect of hypocholesterolaemic drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(7):971-5.

ANEXOS

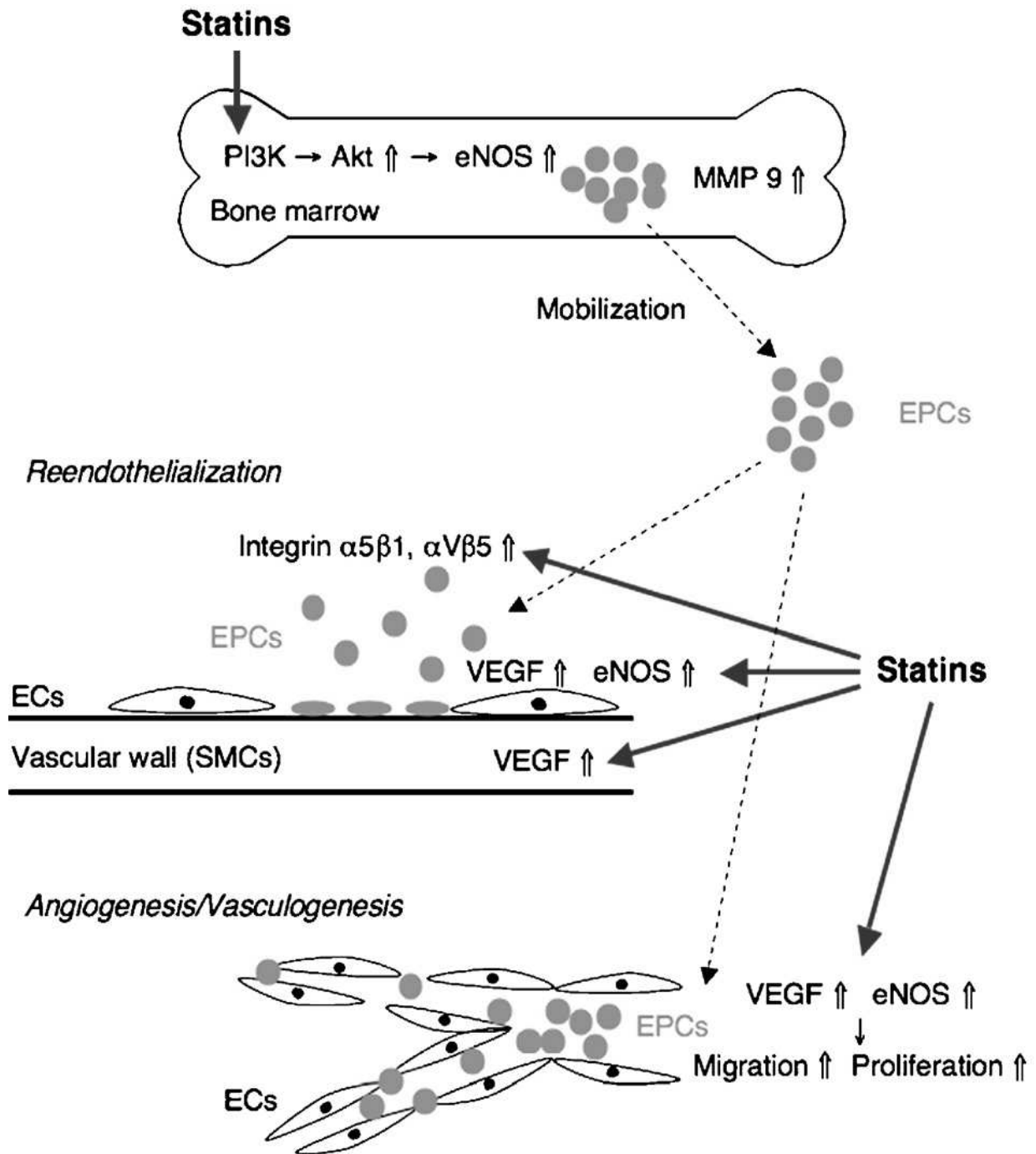


Figura A1 **Efeito das estatinas nas EPC.** Retirada do trabalho de Li e Losordo, 2007.

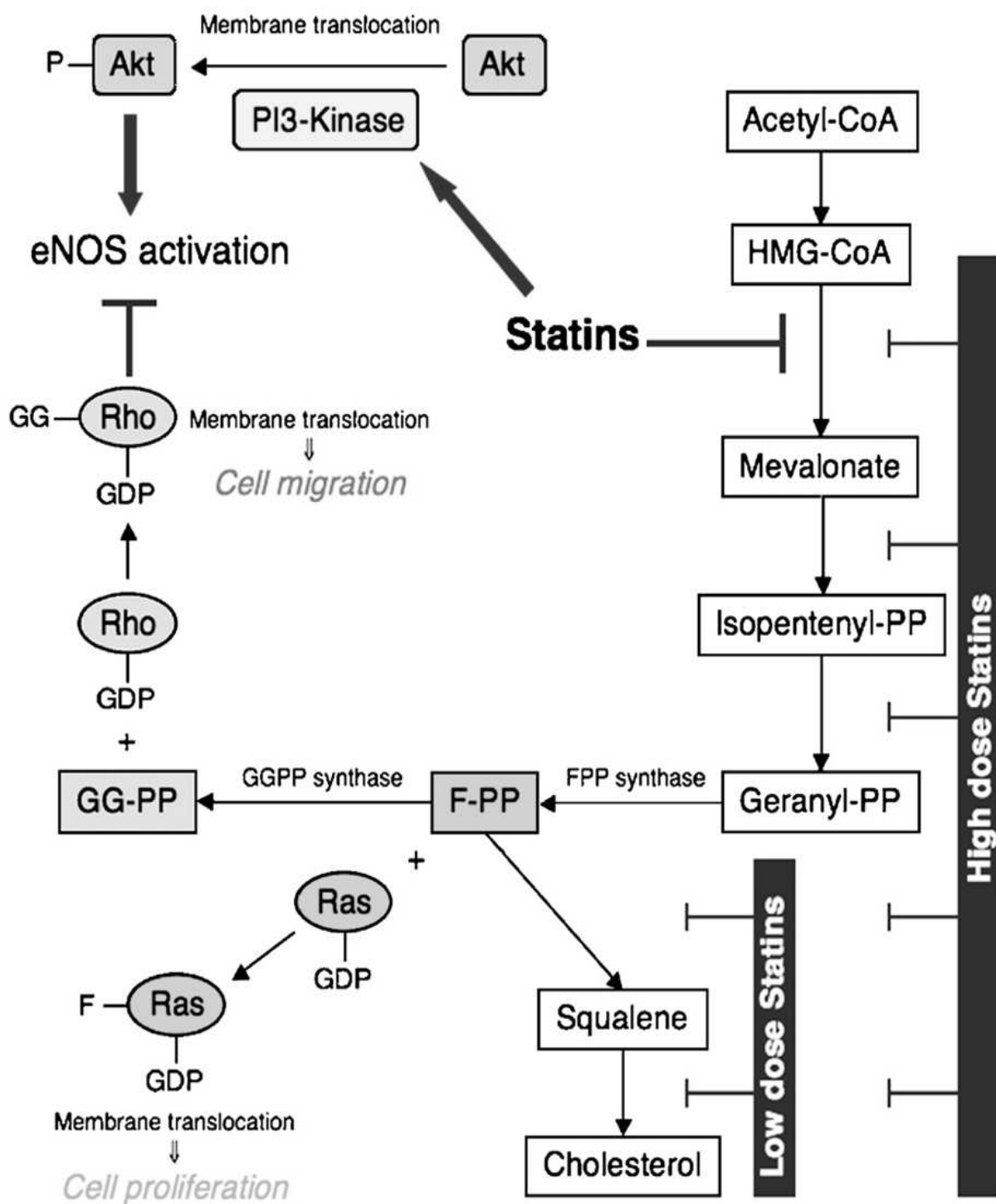


Figura A2 Efeito das estatinas nas vias de sinalização PI3K-Akt-eNOS; proteínas Ras e Rho, na migração e proliferação celulares. Retirada do trabalho de Li e Losordo, 2007.



CEUA/Unicamp

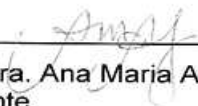
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

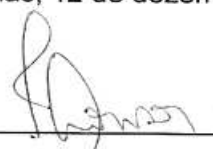
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "**EFEITO DA ATORVASTATINA ORAL E DO CREME ENRIQUECIDO COM ATORVASTATINA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS**" (protocolo nº **2584-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Helena de Melo Lima / Vanessa Ferraz Suzuki**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **12 de dezembro de 2011**.

Campinas, 12 de dezembro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Figura **A3** Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – IB/Unicamp, que autoriza os experimentos.