

# Dermatan sulfato de *Styela plicata*: novo composto natural candidato ao tratamento de cicatrização de feridas

Dermatan sulfate from *Styela plicata*:  
new natural compound candidate for wound healing treatment

## RENATA MORLEY DE MUNO

Primeiro-Tenente (RM2-Md) Médica Veterinária do Instituto de Pesquisas Biomédicas - Hospital Naval Marcílio Dias.  
Doutora em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz.

## RACHEL ANTONIOLI SANTOS

Primeiro-Tenente (RM2-S) Bióloga do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias.  
Doutora em Neurociências pela Universidade Federal Fluminense.

## ROBERTA DA COSTA ESCALEIRA

Capitão-Tenente (S) Farmacêutica Bioquímica do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias.  
Doutora em Ciências Morfológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## LUCAS SANT'ANNA SILVA

Cabo (EF) Auxiliar do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias.  
Graduado em Nutrição pela Faculdade Bezerra de Araújo.

## MARCELO LEAL GREGÓRIO

Capitão de Fragata (Md) Encarregado do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias.  
Especialização Observership pela Cleveland Clinic Florida.

**Resumo:** A cicatrização de feridas cutâneas é um fenômeno biológico complexo que se apresenta em quatro fases: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento. Fibroblastos estão presentes desde o final da fase inflamatória até a completa re-epitelização tecidual. Os mecanismos celulares que regem este processo ainda não foram totalmente elucidados. Dermatan sulfato é o principal glicosaminoglicano da pele atuando na proliferação de fibroblastos e na modulação da atividade fibrogênica. Dermatan sulfatos isolados de invertebrados marinhos, como ascídias *Styela plicata*, mostraram que são desprovidos de efeito da agregação plaquetária e não apresentaram efeito de sangramento em testes *in vivo*. Frente a esse cenário, o principal objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do dermatan sulfato isolado de *S. plicata* na viabilidade celular e migração de fibroblastos de derme, *in vitro*. Fibroblastos da derme de camundongos foram cultivados e utilizados para os ensaios de viabilidade e migração, *in vitro*, frente a diferentes concentrações do composto, em diferentes tempos de incubação. Os resultados mostraram que os compostos não alteraram a viabilidade celular até 72 h de incubação e que a partir de 50µg/mL as células migraram para o centro da ferida, a partir de 24 h de incubação. Este estudo demonstrou que o dermatan sulfato extraído de *S. plicata* foi efetivo na promoção e aceleração do processo de fechamento da ferida em fibroblastos de derme, *in vitro*. Este agente se mostrou um alvo em potencial no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos naturais para o tratamento de feridas, em especial, as de difícil resolução.

**Palavras-chave:** Cicatrização de feridas. Fibroblastos. Dermatan sulfato; *Styela plicata*.

**Como citar este artigo:** Muno RM, Santos RA, Escalera RC, Silva LS, Gregório ML. Dermatan sulfato de *Styela plicata*: novo composto natural candidato ao tratamento de cicatrização de feridas. Arq Bras Med Naval. 2017 jan/dez;78(1):38-42.

**Submetido:** 31 de julho de 2017

**Revisado e aceito:** 15 de setembro de 2017

**Endereço de contato:** Rua: César Zama, 185 - Bairro: Lins de Vasconcelos, Rio de Janeiro - RJ, CEP:20725-090

**E-mail:** hnmd.abmn@marinha.mil.br

Os autores não relatam interesse comercial, financeiro ou de propriedade nos produtos ou empresas descritos neste artigo. As opiniões expressas neste artigo são de responsabilidade exclusiva dos autores.

## Dermatan sulfate from *Styela plicata*: new natural compound candidate for wound healing treatment

### INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas cutâneas é um fenômeno biológico complexo que envolve uma série de eventos que resultam no reparo e restabelecimento do tecido. Este fenômeno é dinâmico e se apresenta em quatro fases altamente integradas, definidas e sobrepostas: homeostase, inflamação, proliferação e remodelamento<sup>1-3</sup>. A restauração da integridade do tecido requer uma cooperação precisa de diversos tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, e células epiteliais e endoteliais, interagindo, tanto umas com as outras, quanto com os componentes da matriz extracelular (MEC) através de seus receptores de integrinas e moléculas de adesão.

Em um processo de cicatrização saudável, fibroblastos estão presentes desde o final da fase inflamatória (24-48 h após a lesão) até a completa re-epitelização do tecido. Estas células adquirem a capacidade de migrar para o local da ferida, proliferar e desencadear uma série de atividades-chave que progressivamente alteram o micro-ambiente tornando-o crucial para a fase final da cicatrização.<sup>4-5</sup> Mais especificamente, eles infiltram e degradam a fibrina, através da produção de metaloproteinasas (MMPs) de matriz, e a substituem por componentes da MEC, como colágeno I-IV, XVIII, glicoproteínas, proteoglicanos, laminina, trombospondina e glicosaminoglicanos (GAGs).<sup>6</sup> Esta complexa matriz oferece suporte e regula migração e atividade de tanto de fibroblastos, bem como sinaliza para que a angiogênese, formação de tecido de granulação e re-epitelização ocorram.<sup>7</sup>

Algumas moléculas presentes na MEC, como os GAGs, desenvolvem papel essencial no reparo de feridas durante todas as fases da cicatrização. Dermatan sulfato é o principal glicosaminoglicano da pele, representando cerca de 36 a 78% do total de glicosaminoglicanos sulfatados nos fluidos de ferimentos.<sup>8</sup> A ligação do dermatan sulfato ao FGF-7, produzido após uma lesão na pele, potencializa a atividade do fator de crescimento, resultando em um aumento da

proliferação dos queratinócitos. De forma semelhante, o dermatan sulfato estimula a proliferação de fibroblastos mediada por FGF-2.<sup>9</sup> A interação do dermatan sulfato com o TGF- $\beta$  modula sua atividade fibrogênica, com importância no controle da cicatrização.<sup>10</sup>

Os mecanismos moleculares e celulares que regem o processo de reparação das feridas ainda não foram totalmente elucidados e, sem este conhecimento, os resultados das terapias atuais podem ser extremamente desapontadores.<sup>11</sup> Por isso, é necessário o desenvolvimento de novas idéias que associem marcadores biológicos envolvidos no processo de cicatrização fisiológico e sadio a novos agentes terapêuticos naturais que substituam compostos químicos existentes que frequentemente estão associados a irritações cutâneas e outros efeitos indesejados.<sup>3,10</sup>

Nos invertebrados marinhos, vários polímeros com estrutura e atividade biológicas semelhantes aos glicosaminoglicanos de vertebrados foram identificados. Dermatan sulfatos, semelhantes aos encontrados em vertebrados, mas com diferenças no grau e posição de sulfatação, foram isolados das ascídias *Styela plicata*<sup>12</sup> e *Ascidia nigra*.<sup>13</sup> Os GAGs das ascídias, quando testados em modelos experimentais de trombose venosa e arterial, apresentaram uma correlação direta entre as atividades anticoagulantes e antitrombóticas.<sup>14</sup> O dermatan e a heparina de *S. plicata* foram capazes de inibir 100% da trombose, tanto no modelo venoso quanto no arterial. Todos os GAGs das ascídias são desprovidos de efeito da agregação plaquetária e não apresentaram efeito de sangramento em testes *in vivo*.

Sendo assim, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar os efeitos do dermatan sulfato isolado de espécies de ascídias coletadas em águas tropicais e na antártica, na viabilidade celular e migração de fibroblastos de derme, *in vitro*.

### MÉTODOS

Obtenção do Dermatan Sulfato de *S. Plicata*

Ascídias da espécie *Styela plicata* foram coletadas por mergulho livre na praia da Urca, Baía de Guanabara, cidade do Rio de Janeiro. O isolamento dos polissacarídeos, a purificação do dermatan sulfato das ascídias e a análise dissacarídica do dermatan sulfato foram realizados no Laboratório de Bioanálises do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) no Hospital Naval Marcílio Dias. O dermatan sulfatado na posição 2,4 (DS-2,4) foi utilizado nos experimentos a seguir.

Culturas primárias de fibroblastos de derme murinos

Com a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais do Hospital Naval Marcílio Dias (CEUA 01/2017), fragmentos da pele de camundongos C57BL/6 foram removidos por biópsia. Os fragmentos foram acondicionados em solução de tampão fosfato (PBS) contendo solução antibiótica a base de penicilina 10.000u/mL e estreptomicina 10.000 $\mu$ g/mL (1%) e antimicótica com anfotericina B (1 $\mu$ g/mL) (Sigma Aldrich) a 4<sup>o</sup> C por cerca de 30 minutos. Logo após, os tecidos foram lavados em PBS por três vezes, e, em seguida, cortados em fragmentos menores de aproximadamente 1mm.<sup>2</sup> A epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi e a derme foi utilizada como fonte de fibroblastos isolados pela técnica de explante, como descrito por Carrel & Burrows.<sup>15</sup>

Os fragmentos de derme foram aderidos à superfície de garrafas de cultura de células com 25 cm<sup>2</sup> de área e cultivados em meio de cultura DMEM, com 10% de soro fetal bovino e 1% solução de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Aldrich). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as culturas de fibroblastos foram mantidas em incubadoras em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a realização dos ensaios experimentais.

Ensaio de Viabilidade Celular (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) - MTT

Culturas de fibroblastos entre a 3<sup>a</sup> e a 5<sup>a</sup> passagem foram plaqueadas em placas de 96

### Dermatan sulfate from *Styela plicata*: new natural compound candidate for wound healing treatment

poços com a densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço em meio DMEM. Após 24 h, o meio foi substituído por diluições seriadas do tratamento com DS nas concentrações de 1000, 500, 250, 100, 50, 20 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e as células foram incubadas por 72h. Em seguida 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada por 3 h a 37°C. O formazan violeta formado foi solubilizado pela adição de 100  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfoxido (DMSO) em cada poço, incluindo os controles (sem tratamento) e, em seguida, homogeneizados sutilmente antes da leitura colorimétrica realizada a 570nm em espectrofotômetro.

#### Ensaio de cicatrização *in vitro*

Para avaliar os efeitos do composto na cicatrização, *in vitro*, fibroblastos de derme entre a 3ª e a 5ª passagem foram plaqueados em placas de 35mm com densidade de  $2 \times 10^5$  células por placa. Após a adesão e a confluência da placa, riscos perpendiculares foram realizados na monocamada de fibroblastos com auxílio de uma ponteira de 200  $\mu\text{l}$ , sendo as células soltas lavadas com PBS. Então, meio de cultura, contendo ou não os compostos em estudo, nas concentrações 20, 50 e 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , foram adicionados em cada poço. Ao longo do experimento, Mitomicina C (Sigma –M4287) (10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inibiu a proliferação celular durante o tempo de incubação. Micrografias do centro dos riscos perpendiculares foram realizadas durante os tempos estudados (0, 3, 24 e 48h) e a migração relativa foi estimada pela diminuição da área do risco, livre de células.

#### RESULTADOS

Viabilidade celular de fibroblastos murinos tratados com dermatan sulfato extraído de *Styela plicata*  
Dermatan sulfato extraído de *Styela plicata* reduz o tempo de cicatrização de feridas

A ocupação da área do risco pelos fibroblastos em cultura foi analisada após 24 e 48 h. A área do risco (descelularizada) foi delimitada por linhas pontilhadas (em vermelho, Figura 2).

Em todas as culturas observadas logo

após o risco (Figura 2 A, D, G e J), a área descelularizada era bem delimitada, com as bordas bem definidas. Na condição controle, a área descelularizada reduziu gradualmente ao longo das 48 h avaliadas (Figura 2 B e C), contudo ainda foi possível observar regiões sem fibroblastos.

Em culturas tratadas com 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DS, a ocupação total da área do risco pelos fibroblastos só foi observada após 48 h (Figura 2 E e F). O efeito mais evidente do tratamento com DS no fechamento do risco foi utilizando o composto nas concentrações 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . A ausência de área descelularizada foi observada a partir de 24 h após o tratamento com 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DS (figura 2 H, I, K e L), caracterizando, portanto, a redução do tempo de resposta migratória de fibroblastos durante o processo de cicatrização. O DS não exibiu efeito citotóxico em nenhuma das concentrações utilizadas no estudo, uma vez que a viabilidade celular das culturas tratadas foi sempre maior que 75% em comparação ao grupo controle (Figura 1).

#### DISCUSSÃO

Um processo ineficaz de cicatrização de feridas pode ocorrer em qualquer indivíduo, mas é mais frequente em pessoas idosas e indivíduos acometidos por doenças crônicas. Com o envelhecimento da população e uma prevalência crescente de doenças como câncer e diabetes, o manejo adequado de feridas se torna uma questão ainda mais notável para os sistemas de saúde.<sup>16-17</sup> Um processo de cicatrização inadequado é ainda mais significativo quando acompanhado de alterações nas propriedades físicas do colágeno, alterações estruturais das junções dermo-epidérmicas, depleção nutricional e imunidade celular levando a mudanças nos padrões de citocinas pró e anti-inflamatórias.<sup>18</sup>

Muitos modelos de células *in vitro* foram descritos para estudos de cicatrização de feridas; No entanto, os mecanismos que estão subjacentes ao processo, especialmente em feridas crônicas ou complicadas, não são entendidos. É

necessária a identificação de sistemas de cultura celular que simulem de perto a fisiologia do tecido danificado *in vivo*. As culturas celulares derivadas do epitélio, incluindo células epiteliais da pele (queratinócitos, fibroblastos e células-tronco mesenquimatosas multipotentes), desempenham um papel fundamental em nossa compreensão dos mecanismos de cicatrização de feridas. Os modelos de cultura de células são ferramentas inestimáveis para promover a compreensão dos mecanismos que regulam o processo de cicatrização de feridas e fornecem uma plataforma para descoberta de drogas. Mais estudos são necessários para desenvolver e desvendar mais mecanismos de cicatrização de feridas, especialmente em feridas crônicas complicadas.<sup>19</sup> Além disso, o entendimento das mudanças bioquímicas dos constituintes da MEC com processo de cicatrização pode ser de grande importância na implementação das novas estratégias terapêuticas alternativas, no decurso da reparação dos tecidos danificados termicamente.<sup>20</sup> Assim, o objetivo do presente do estudo foi enfatizar o efeito do dermatan sulfato de *S. Plicata* sobre as propriedades de cicatrização de feridas *in vitro*.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que as concentrações de 50 e 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentaram a migração de fibroblastos de derme, a partir de 24 h de incubação. A migração celular é um evento importante necessário para a cicatrização de feridas e um evento essencial durante a reepitelização, de modo que a presença de fibroblastos no local da ferida garantem um abastecimento adequado de células para migrar e cobrir a superfície da lesão.<sup>21-22</sup>

Os resultados discutidos acima estimulam a continuidade dos estudos para o uso do DS extraído de *S. plicata* como agente cicatrizante. Na literatura, a importância clínica do DS extraído de invertebrados, incluindo efeito na cicatrização de feridas, não foi completamente elucidada até agora. O presente trabalho confirma que o composto em estudo pode ter efeitos de cicatrização de

Dermatan sulfate from *Styela plicata*:

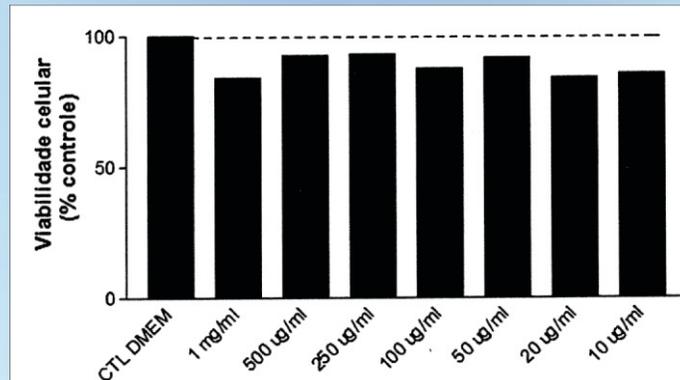
## new natural compound candidate for wound healing treatment

**FIGURA 1**

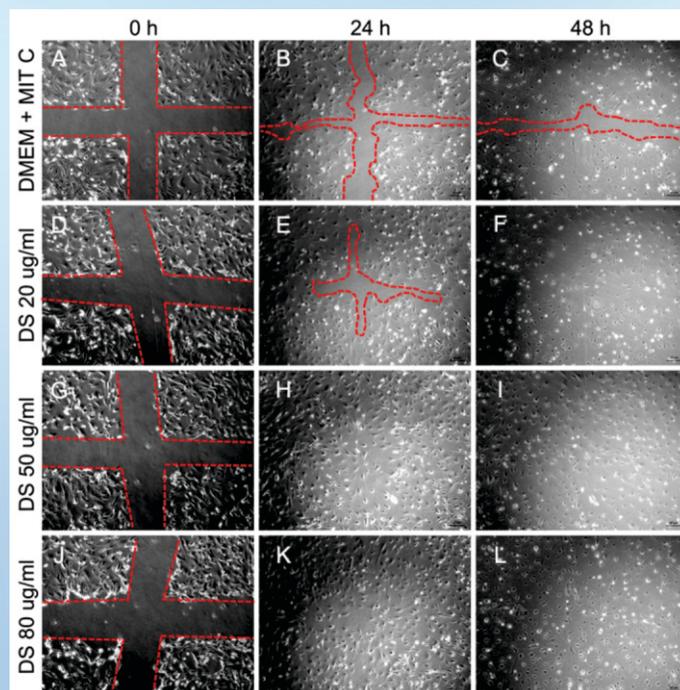
Efeito do Dermatan sulfato extraído de *Styela plicata* na viabilidade de fibroblastos murinos.

Fibroblastos extraídos da derme de camundongos neonatos foram cultivados em placas de 96 poços (2 x 10<sup>4</sup> células/poço) e tratados com 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml ou 10 µg/ml de dermatan sulfato por 72 h.

Todas as concentrações de DS avaliadas apresentaram viabilidade celular superior a 70% quando comparadas com o controle (CTL DMEM) (n=2).

**FIGURA 2**

Resposta migratória de fibroblastos murinos tratados com dermatan sulfato extraído de *Styela plicata*. Fibroblastos extraídos da derme de camundongos neonatos foram cultivados em placas de 35 mm (2 x 10<sup>5</sup> células/placa) e tratados com 20 µg/ml, 50 µg/ml ou 80 µg/ml de dermatan sulfato (DS) após realização do risco em cruz na placa de cultura (área delimitada pelas linhas pontilhadas). As imagens foram obtidas nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h após os tratamentos. É possível observar nas culturas tratadas com DS nas concentrações 50 µg/ml e 80 µg/ml a ocupação total da área do risco pelos fibroblastos com 24h de tratamento (H e K), o que não se observa nas culturas mantidas sob condições controle (DMEM + MIT C) e tratadas com DS 20 µg/ml (E).



ferida com base nos dados de ensaios *in vitro* em células de fibroblastos de derme no modelo murino.

Os estudos futuros serão centrados no efeito sobre a proliferação celular, na produção de colágeno *in vitro*, na expressão gênica de fatores envolvidos em todas as etapas da cicatrização, incluindo a angiogênese, bem como, na identificação e purificação da fração ativa que esteja

envolvida nesses fenômenos cicatrícios, que possibilitem explorar a produção de um novo composto natural no tratamento de feridas, principalmente as de difícil resolução.

**CONCLUSÃO**

Este estudo demonstrou que a o Dermatan Sulfato extraído de *S. plicata* foi efetivo na promoção e aceleração do processo de fechamento da ferida em

fibroblastos de derme, *in vitro*. Este agente natural se mostrou um alvo em potencial no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de feridas, em especial, as de difícil resolução.

**ABSTRACT**

Skin wound healing is a biological complex phenomenon that presents in four classical phases: homeostasis, inflammation,

Dermatan sulfate from *Styela plicata*:  
new natural compound candidate for wound healing treatment

proliferation and remodeling. Fibroblasts are present from the end of the inflammatory phase to complete tissue epithelization. The cellular mechanisms that drive this process have not yet been fully elucidated. Dermatan sulfate is the main skin glycosaminoglycan acting on fibroblast proliferation and modulation of fibrogenic activity. Dermatan sulfate isolated from marine invertebrates, such as *Styela plicata*, showed that they lack the effect of platelet aggregation and showed no bleeding effect in *in vivo* tests. Due to this background, the main objective of this study was to investigate the effects of dermatan sulfate from *S. plicata* on cell viability and migration of dermal fibroblasts *in vitro*. Mouse dermal fibroblasts were cultivated and used for viability and migration assays, *in vitro*, against different compound concentrations, at different times of incubation. The results showed that the compounds did not alter cell viability until 72 h of incubation and the cells migrated to the center of the wound after 24 h of incubation with 50 µg / mL. This study demonstrated that the dermatan sulfate extracted from *S. plicata* was effective in promoting and accelerating the wound closure process in dermal fibroblasts, *in vitro*. This agent has proved to be a potential target in the development of novel natural therapeutic agents for the treatment of wounds, especially those of difficult resolution. Keywords: Wound healing. Fibroblasts. Dermatan sulfate. *Styela plicata*.

## REFERÊNCIAS

1. Flanagan M. Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care*. 2003;12:189-94.
2. Jalalpure SS, Agrawal N, Patil MB, Chimkode R, Tripathi A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* Linn. *Int J Green Pharm*. 2008;2:141-4.
3. Gothai S, Arulselvan P, Tan WS, Fakurazi S. Wound healing properties of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in normal human dermal fibroblasts. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016;5(1):1-6.
4. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995;146(1):56-66.
5. Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chin J Traumatol*. 2017;20(4):189-93.
6. Li B, Wang JH-C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability*. 2011;20(4):108-20.
7. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Develop Biology*. 2010;341(1):126-40.
8. Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M, et al. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28116-21.
9. Taylor KR, Rudisill JA, Gallo RL. Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5300-6.
10. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;5:123.
11. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:969618.
12. Pavão MS, Aiello KR, Werneck CC, Silva LC, Valente AP, Mulloy B, et al. Highly sulfated dermatan sulfates from *Ascidians* structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 1998;273(43):27848-57.
13. Pavão MS. Unique sulfated polysaccharides from ascidians (Chordata, Tunicata). *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(9):1227-33.
14. Vicente CP, Zancan P, Peixoto LL, Alves-Sá R, Araújo FS, Mourão PA, et al. Unbalanced effects of dermatan sulfates with different sulfation patterns on coagulation, thrombosis and bleeding. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1215-20.
15. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *J Amer Med Assoc*. 1910;55:1379-81.
16. Muhammad AA, Pauzi NA, Arulselvan P, Abas F, Fakurazi S. In vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Biomed Res Int*. 2013;2013:974580.
17. Hurd TA. Nutrition and wound-care management/prevention. *Clin Pract*. 2004;2:20-8.
18. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:19-25.
19. Vidmar J, Chingwaru C, Chingwaru W. Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review. *J Surg Res*. 2017;210:269-80.
20. Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int*. 2014;2014:747584.
21. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2:329-33.
22. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3:445-64.

A cada tragada, um sopro a menos de vida.