



**UNIVERSITE DE LIMOGES**  
ECOLE DOCTORALE Biologie Santé  
Faculté de Pharmacie

EA 6309 Maintenance myélinique et neuropathies périphériques  
Co-tutelle avec UERJ

**Thèse**  
**pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Biologie santé / Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

Marcela OTRANTO DE SOUZA E MELLO

le 4 avril 2013

**Evaluation des altérations au cours de la réparation tissulaire cutané  
résultant de la résistance à l'insuline induite par une diète riche en graisses**

Thèse dirigée par le Professeur Alexis DESMOULIÈRE et Andréa MONTE

ALTO COSTA

JURY :

**Rapporteurs**

Mme. Christina Takiya, Professeur à l'Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mme. Patrícia Martins, Dr. à Fundação Oswaldo Cruz

**Examineurs**

M. Luis Cristóvão Sobrino Porto, Professeur à l'Universidade do estado do Rio de Janeiro.

Mme. Andréa Monte Alto Costa, Professeur à l'Universidade do estado do Rio de Janeiro

M. Alexis Desmoulière, Professeur à l'Université de Limoges.

Marcela Otranto de Souza e Mello

**Alterações no reparo tecidual cutâneo em um modelo de resistência à insulina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Realizada em cotutela com a Universidade de Limoges.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Monte Alto Costa  
Co-orientador: Prof. Dr. Alexis Desmoulière

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CB/A

S537 Mello, Marcela Otranto de Souza.  
Alterações no reparo tecidual cutâneo em um modelo de resistência à insulina / Marcela Otranto de Souza e Mello. – 2013.  
93 f.

Orientadora: Andréa Monte Alto Costa.

Orientador: Alexis Desmoulière

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

Convênio realizado em cotutela entre a Universidade do Estado do Rio de Janeiro e a Universidade de Limoges. Faculté de Pharmacie.

1. Cicatrização de feridas - Teses. 2. Resistência à insulina – Teses. 3. Pele – Reparo e reconstrução – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Macrófagos – Teses. I. Costa, Andréa Monte-Alto. II. Desmoulière, Alexis. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Universidade de Limoges. Faculté de Pharmacie. V. Título.

CDU 616.5-003.97

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Marcela Otranto de Souza e Mello

**Alterações no reparo tecidual cutâneo em um modelo de resistência à insulina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Realizada em cotutela com a Universidade de Limoges

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Monte Alto Costa (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Alexis Desmoulière (Co-orientador)  
Faculté de Pharmacie – Université de Limoges

---

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins  
Fundação Osvaldo Cruz - FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christina Maeda Takiya  
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Rio de Janeiro

2013

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às pessoas que me deram força, carinho e que contribuíram todos os dias para que esse período chegasse ao fim com muita experiência e sabedoria.

À minha família, pelo apoio e incentivo constante. Pela dedicação e esforço ao longo desses anos, por me oferecer uma boa educação e possibilitar a realização de todos os meus passos até hoje. Muito obrigada!

À minha orientadora Andréa, pela confiança e paciência e compreensão. Por todos os ensinamentos, que me fizeram crescer profissionalmente. Obrigada!

Ao Professor Alexis Desmoulière, por ter me recebido tão bem durante o doutorado-sanduíche, por todos os ensinamentos e por ter aberto meus horizontes mesmo que inconscientemente. Obrigada!

Ao Professor Luís Cristóvão, por ter me apoiado durante esses anos, pelos conselhos e pela compreensão. Muito obrigada!

À minha querida amiga Jeanine, por sua amizade verdadeira, pelo incentivo e palavras de apoio, pelo companheirismo, com direito a visita! Ainda vamos rir muito disso tudo, lembra? Muito obrigada!

À minha mais nova amiga Thatiana Luiza, por ter ficado ao meu lado, me dando força fora do “horário comercial” do HLA, você não imagina o quanto isso significou para mim!!! Pelas risadas e por todos os lanchinhos e cafés! Muito Obrigada!!!

À minha grande amiga Adriana, pela amizade, conselhos e enriquecimento profissional. Obrigada também pelas músicas cantaroladas e pelas boas risadas!!!

À minha amiga Mariane, pela amizade, pelo incentivo e por sempre me animar a seguir meus objetivos. Por suas histórias maravilhosas! Muito obrigada!

À minha amiga Bruna, pelo apoio e confiança durante todos esses anos! Pela sua amizade, por todos os ensinamentos e por ser um grande exemplo a ser seguido como uma brilhante profissional. Muito obrigada!!!

À minha amiga Taís, pela amizade, pelos seus conselhos profissionais e pessoais. Obrigada pela paciência e por me mostrar o que eu não consegui enxergar sozinha! Muito obrigada!

Aos meus amigos franceses que me acolheram incrivelmente em Limoges. Nicolas Védrenne por sua amizade e amor, por ter me ajudado e incentivado durante todos esses meses, longe de casa. Aurore Danigo pela amizade sincera e por ser essa pessoa prestativa e atenciosa, quase uma irmã! Laurance Richard pelo seu carinho, amizade, incentivo e por todos os ensinamentos! Pierre-Antoine pela amizade e ajuda nos experimentos! Nelly Bordeau, Laurent Botelle, Florent, Pierre, Stephane, Youness, Mathilde, Lamia, Hussein, Lynda, Ludo, David e Bassel pela amizade e momentos de pausa para o café! Ramone pela a amizade verdadeira, companheirismo e por ter me apresentado o CSP!!! Simon e Laetitia pela amizade, atenção e paciência! William, Tintin, Amandine e Nassim, Karl, Marina, Yoann e Claire pela amizade e pelos momentos de descontração! Agradeço ainda por vocês serem minha família francesa! Je vous remercie énormément!

Às minhas amigas Taíza, Bianca Fernanda e Neil pela amizade, ajuda nos experimentos e pelos momentos de distração com muitas risadas.

Aos amigos do HLA por todos os momentos de descontração e boas risadas! Por me receberem tão bem nesse novo ambiente de trabalho. Muito obrigada! Simone, Juliana Oliveira, Gustavo Milson, Danielle, Juliana Motta, Magda, Gabriel, Elisabeth, Mônica, Rogério, Angela, Rafael, Fernando, Rebeca, Sandra, Flavinha, Selma, Jaquie, Paulo, Erika, D. Fátima, Lú, D. Maria Antonieta e Priscila pela simpatia de vocês e educação! Muito Obrigada!

Apenas quando somos instruídos pela realidade é que podemos mudá-la.

*Bertolt Brecht*

## RESUMO

OTRANTO, Marcela. *Alterações no reparo tecidual cutâneo em um modelo de resistência à insulina*. 2013. 92 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A obesidade associada às alterações metabólicas, tais como a resistência à insulina, provoca significativas modificações no decorrer do processo de cicatrização. O objetivo desse estudo foi inicialmente avaliar os efeitos da resistência à insulina induzida por uma dieta com elevado teor de gordura durante o reparo tecidual. E, em seguida, investigar o papel dos macrófagos neste processo. Observamos que os animais submetidos à dieta hiperlipídica (RHL) tornaram-se intolerantes à glicose e resistentes à insulina, além de aumentarem as taxas plasmáticas de colesterol e triglicérides em relação aos animais alimentados com ração padrão (RP). O grupo RHL apresentou uma menor taxa de contração da lesão e reepitelização em relação ao grupo RP. Observamos ainda maior quantidade de células inflamatórias (células NOS 2-positivas, macrófagos, e neutrófilos), menor densidade de fibras do sistema colágeno e maior densidade de miofibroblastos e vasos sanguíneos no grupo RHL. O dano oxidativo estava maior no grupo RHL bem como a expressão proteica do fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). O grupo RHL apresentou altos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo RP. Além disso, a proporção das células M1 (macrófagos ativados classicamente) e M2 (macrófagos ativados alternativamente) foi a mesma em ambos os grupos. Em relação a síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento avaliados através dos ensaios *in vitro*, observamos ainda que os níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) estavam maiores no meio condicionado de macrófagos isolados dos animais do grupo RHL (MCRHL) em relação ao meio condicionado de macrófagos isolados dos animais do grupo RP (MCRP). Além disso, os nossos resultados demonstraram claramente que os fatores solúveis produzidos por macrófagos isolados a partir de animais resistentes à insulina inibem a proliferação e a migração de fibroblastos. Através desses resultados podemos sugerir que a resistência à insulina retarda o processo de cicatrização e que os macrófagos estão envolvidos diretamente neste efeito, estendendo a fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo.

Palavras-chave: Pele. Lesão. Reparo. Inflamação. Tecido de granulação. Macrófagos.

## ABSTRACT

Obesity associated with with metabolic alterations such as insulin resistance causes significant modifications during the healing process. Our aim was initially to analyse the effects of insulin resistance induced by a high- significant changes in skin combined fat diet during cutaneous wound healing. And then investigate the role of macrophages in this process. We observed that animals subjected to a high-fat diet (HFC) became glucose intolerant and insulin resistant and increased plasma cholesterol and triglycerides levels when compared to animals fed with a standard chow (SC). The HFC group had a lower rate of wound contraction and re-epithelialization than the SC group. Besides, HFC group presented a greater number of inflammatory cells (NOS 2- and F4/80-positive cells, and neutrophils), lower density of collagen fibers and higher density of myofibroblasts and blood vessels. Oxidative damage was greater in the HFC group as well as the protein expression of TGF- $\beta$ 1 and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ - SMA). The HFC group presented higher levels of plasma TNF- $\alpha$  when compared to RP group. Furthermore, the proportion of M1 cells (classically activated macrophages) and M2 (alternatively activated macrophages) was the same in both groups. Regarding to the synthesis and release of cytokines and growth factors evaluated by *in vitro* assays, we also observed that the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were higher in conditioned medium of macrophages isolated from animals of HFC (MCHFC) group when compared to the conditioned medium of macrophages isolated from animals in of RP (MCSC) group. Furthermore, our results clearly demonstrate that soluble factors produced by macrophages isolated from insulin resistant animals inhibit the proliferation and migration of fibroblasts. Thus, we can suggest that insulin resistance delays wound healing process and the macrophages are directly involved in this effect, extending the inflammatory phase of cutaneous wound healing.

Keywords: Skin. Lesion. Repair. Inflammation. Granulation tissue. Macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	As três fases clássicas do reparo tecidual cutâneo.....	23
Figura 2 –	Tecido adiposo e as subpopulações de macrófagos.....	28
Figura 3 –	Análises metabólicas.....	53
Figura 4 –	Análises bioquímicas.....	55
Figura 5 –	Avaliação da contração da lesão, reepitelialização, análises macroscópicas e microscópicas das lesões.....	57
Figura 6 –	Análise histológica e dosagem dos níveis de nitrito.....	58
Figura 7 –	Imunohistoquímica e quantificações.....	61
Figura 8 –	Expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e $\alpha$ -SMA.....	62
Figura 9 –	Alterações metabólicas.....	64
Figura 10 –	Metabolismo glicêmico e análises bioquímicas.....	66
Figura 11 –	Análises da contração da lesão e microscópicas.....	67
Figura 12 –	Imunomarcações e quantificações.....	71
Figura 13 –	Western blotting.....	72
Figura 14 –	Identificação e quantificação dos fenótipos de macrófagos de lesão	73
Figura 15 –	Análise dos experimentos <i>in vitro</i> .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição e conteúdo energético das rações padrão (RP) e hiperlipídica (RHL) utilizado para induzir a resistência à insulina.....	34
Tabela 2 –	Composição e conteúdo energético das rações padrão (RP) e hiperlipídica (RHL) utilizado para induzir a resistência à insulina.....	43
Tabela 3 –	Ganho de peso total, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar nos grupos RP e RHL.....	53
Tabela 4 –	Análises bioquímicas .....	57
Tabela 5 –	Ganho de peso total, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar nos grupos RP e RHL.....	64
Tabela 6 –	Parâmetros bioquímicos.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

Arg-1	Arginase 1
ASC	Área sobre a curva
BTH	Terc-butil-hidroquinona
CCL2	Ligante de citocina 2
CCR2	Receptor de citocina 2
CD11b	Receptor do fragmento C3bi do complemento
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenilindole dihidrocloridio
DMEM	Meio modificado Eagle Dulbecco
EA	Eficiência alimentar
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
I $\kappa$ K	Quinase do complexo I $\kappa$ B
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MCRP	Meio condicionado coletado do grupo ração padrão
MCPHL	Meio condicionado coletado do grupo ração hiperlipídica
MDA	Malondialdeído
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MMPs	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazólio

NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NOS 2	Óxido nítrico sintase 2
ON	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PU	Poliuretano
RP	Ração padrão
RHL	Ração hiperlipídica
SFB	Soro fetal bovino
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Colesterol total
TG	Triglicerídeos totais
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante- $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TTG	Teste de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -actina de músculo liso

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REPARO TECIDUAL CUTÂNEO</b> .....	19
2	<b>OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA</b> .....	24
3	<b>MACRÓFAGOS DURANTE O REPARO TECIDUAL</b> .....	30
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
5.1	<b>Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos</b> .....	34
5.1.1	<u>Animais e dietas</u> .....	34
5.1.2	<u>Lesão excisional</u> .....	36
5.1.3	<u>Análise macroscópica</u> .....	36
5.1.4	<u>Teste de tolerância à glicose oral (TTG)</u> .....	36
5.1.5	<u>Teste de tolerância à insulina intra-peritoneal (TTI)</u> .....	37
5.1.6	<u>Eutanásia, coleta e análise microscópica</u> .....	37
5.1.7	<u>Imunohistoquímica e quantificações</u> .....	37
5.1.8	<u>Determinação dos níveis de hidroxiprolina</u> .....	38
5.1.9	<u>Análises bioquímicas</u> .....	39
5.1.10	<u>Dosagem de malondialdeído</u> .....	40
5.1.11	<u>Dosagem de proteínas carboniladas</u> .....	40
5.1.12	<u>Expressão proteica de TGF-<math>\beta</math>1 e <math>\alpha</math>-SMA</u> .....	41
5.1.13	<u>Análise estatística</u> .....	41
5.2	<b>Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina</b> .....	43
5.2.1	<u>Modelo experimental</u> .....	43
5.2.2	<u>Realização da lesão</u> .....	45
5.2.3	<u>Macroscopia</u> .....	45
5.2.4	<u>Teste de tolerância à glicose oral (TTG)</u> .....	45
5.2.5	<u>Teste de tolerância à insulina intra-peritoneal (TTI)</u> .....	45
5.2.6	<u>Coleta e análise microscópica</u> .....	46
5.2.7	<u>Parâmetros bioquímicos</u> .....	46

5.2.8	<u>Dosagem de hidroxiprolina</u> .....	47
5.2.9	<u>Dosagem de malondialdeído</u> .....	47
5.2.10	<u>Carbonilação proteica</u> .....	47
5.2.11	<u>Western blotting</u> .....	47
5.2.12	<u>Imunomarcações e quantificações</u> .....	48
5.2.13	<u>Imunofluorescências e quantificações</u> .....	48
5.2.14	<u>Isolamento e cultura de macrófagos da cavidade peritoneal</u> .....	49
5.2.15	<u>Experimentos <i>in vitro</i></u> .....	49
5.2.16	<u>ELISA</u> .....	50
5.2.17	<u>Estatística</u> .....	51
6	<b>RESULTADOS</b> .....	52
6.1	<b>Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos</b> .....	52
6.1.1	<u>Massa corporal, gordura retroperitoneal, índice de Lee e pressão arterial</u> .....	52
6.1.2	<u>Ganho de peso, consumo alimentar e energético, e eficiência alimentar</u> .....	53
6.1.3	<u>Glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina</u> .....	54
6.1.4	<u>Contração da lesão e reepitelização</u> .....	56
6.1.5	<u>Análises bioquímicas</u> .....	58
6.1.6	<u>Peroxidação lipídica e proteínas carboniladas</u> .....	58
6.1.7	<u>Quantificação do infiltrado inflamatório</u> .....	59
6.1.8	<u>Análise estereológica</u> .....	60
6.1.9	<u>Expressão proteica de TGF-<math>\beta</math>1 e <math>\alpha</math>-SMA</u> .....	61
6.2	<b>Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina</b> .....	63
6.2.1	<u>Massa corporal, gordura retroperitoneal, índice de Lee e pressão arterial</u> .....	63
6.2.2	<u>Ganho de peso, consumo alimentar e energético, e eficiência alimentar</u> .....	64
6.2.3	<u>Metabolismo glicêmico e análises bioquímicas</u> .....	65
6.2.4	<u>Contração da lesão e análise histológica</u> .....	66
6.2.5	<u>Parâmetros bioquímicos</u> .....	68

6.2.6	<u>Peroxidação lipídica e carbonilação proteica.....</u>	68
6.2.7	<u>Quantificação das células inflamatórias.....</u>	69
6.2.8	<u>Estereologia.....</u>	70
6.2.9	<u>Western blotting.....</u>	72
6.2.10	<u>Identificação e quantificações dos tipos de macrófagos.....</u>	72
6.2.11	<u>Ensaio <i>in vitro</i>.....</u>	74
7	<b>DISCUSSÃO.....</b>	76
7.1	<b>Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos.....</b>	76
7.2	<b>Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina.....</b>	79
8	<b>CONCLUSÕES.....</b>	82
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	83
	<b>ANEXO A – Carta de aceite do artigo .....</b>	91
	<b>ANEXO B – Comitê de ética em pesquisa.....</b>	92
	<b>ANEXO C – Resumo em língua francesa.....</b>	93

## INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo que reveste externamente o corpo, conferindo uma barreira natural contra o ambiente e exercendo diversas funções protetoras essenciais para o organismo. Quando a sua integridade é perdida, o processo de reparo tecidual cutâneo é imediatamente iniciado para recompor a área lesada e restabelecer a sua função. Nesse processo há a participação de diversas células e mediadores, como citocinas e fatores de crescimento que são liberados durante as fases da cicatrização (Gurtner *et al.* 2008).

Já se sabe que os camundongos resistentes à insulina desenvolvem condições desordenadas durante o reparo tecidual (Seitz *et al.* 2010). Os defeitos mais frequentes estão associados a uma perda de função de diversos fatores de crescimento que coordenam determinadas células como os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, na presença da resposta inflamatória exacerbada (Frank *et al.* 1995; Tsuboi & Rifkin 1990; Werner *et al.* 1994).

A resistência à insulina é definida como o estado de uma célula alvo com capacidade reduzida de resposta aos níveis normais de insulina circulante (DeFronzo & Ferrannini 1991). O estudo dos fatores que desencadeiam a resistência à insulina tem sido um grande desafio para a ciência, em parte devido aos diversos fatores de risco ligados a esta condição, incluindo obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (Hoehn *et al.* 2009).

A linhagem de camundongos C57Bl/6 tem sido bem documentada no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, quando submetidos a uma dieta rica em gordura (Fellmann *et al.* 2012). Com isso, podemos afirmar que esta linhagem representa um modelo animal útil para mimetizar vários aspectos da progressão da resistência à insulina, como observado em seres humanos.

A fase inicial da cicatrização de lesões (inflamação) é crucial para que o processo siga corretamente tanto em condições normais quanto patológicas. A resposta inflamatória é caracterizada por ativação local do sistema imunológico inato, o que resulta num influxo imediato de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), seguido da invasão de monócitos do sangue, que se diferenciam em macrófagos dos tecidos (Lucas *et al.* 2010).

Vários estudos têm descrito os macrófagos como células cuja notável plasticidade lhes permitem responder ao ambiente e se diferenciar (Martin &

Leibovich 2005). Os macrófagos classicamente ativados (ou macrófagos M1) e os macrófagos alternativamente ativados (macrófagos M2) são dois fenótipos diferentes, no entanto, apresentam função contínua durante o reparo tecidual. O fenótipo M1 possui baixa expressão da interleucina-10 (IL-10) e exibe propriedades anti-microbianas através da liberação de mediadores inflamatórios que induzem a secreção de níveis elevados do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), o óxido nítrico (ON) e de (interleucina-1 $\beta$ ) IL-1 $\beta$ . Assim, o fenótipo de M2 é predominado pela alta expressão de IL-10 e (interleucina-4) IL-4, tem sido descrito como supressor das reações inflamatórias e desempenham um papel importante na angiogênese (Stout *et al.* 2009).

Com isso, o objetivo desse estudo foi inicialmente avaliar as consequências da resistência à insulina induzida por uma dieta com elevado teor de gordura. Em seguida, investigamos as alterações da ativação dos macrófagos também provocadas pela resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gordura durante o processo de cicatrização de lesões cutâneas.

Essa tese está organizada da seguinte forma: Introdução, objetivo, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. As seções de material e métodos, resultados e discussão estão divididos em duas partes para abordar os dois artigos científicos gerados a partir deste trabalho.

## 1. REPARO TECIDUAL CUTÂNEO

A pele é o maior órgão do corpo, e proporciona uma barreira natural e eficaz entre o ambiente interno e externo. Por isso, após a perda da integridade da pele, tanto por uma lesão aguda quanto por uma lesão crônica, o processo de cicatrização é imediatamente acionado e com isso, várias etapas são iniciadas de maneira concomitante, com o intuito de reconstruir o tecido lesado e reestabelecer a barreira funcional da pele (Gurtner *et al.* 2008). Esse processo envolve várias células (neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos) fatores locais e sistêmicos como espécies reativas de oxigênio, citocinas, citocinas e fatores de crescimento (Gurtner *et al.* 2008).

O reparo tecidual é um processo biológico dinâmico e organizado, classicamente dividido em três fases distintas e sobrepostas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Ko *et al.* 2011) (Figura 1). Para que a cicatrização ocorra normalmente, é importante que a sequência temporal desses eventos seja mantida (Gurtner *et al.* 2008). Logo no início do processo de reparo, ocorre vasodilatação local, extravasamento de sangue e de líquido intersticial para o espaço extravascular caracterizando a formação de um exudado, além do bloqueio da drenagem linfática que pode levar a produção de sinais cardinais, como vermelhidão, inchaço, aquecimento e ativação de fibras neurossensoriais de dor (Broughton *et al.* 2006).

O primeiro estágio do reparo de lesões, a fase inflamatória, é caracterizado por uma reação inicial do sistema imunológico à lesão e pela ativação da cascata de coagulação. A partir desta ativação ocorre a formação do coágulo de fibrina que tem como intuito estabilizar as condições da área lesada e formar uma matriz provisória para a migração celular de neutrófilos, monócitos, fibroblastos, entre outras células, até a área lesada. Essa resposta inflamatória aguda geralmente dura de 24 a 48 horas e pode persistir por até 2 semanas em alguns casos (Li *et al.* 2007).

A inflamação é didaticamente composta de duas fases: a primeira, que consiste na resposta vascular e na restauração da homeostase e a segunda, referente à resposta celular e à inflamação propriamente dita. Na primeira fase, as plaquetas se aderem, agregam-se e começam a liberar mediadores, os quais iniciam

a formação de uma rede de fibrilas de fibrina, a partir da clivagem do fibrinogênio. Além disso, essas células iniciam cascatas de coagulação diferentes a partir de fatores liberados na área exposta (sistema extrínseco) e pela ativação dos trombócitos (sistema intrínseco). Uma rede altamente solúvel é formada, convertendo o *plug* plaquetário em um coágulo de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondinas (Reinke & Sorg 2012; Sonnemann & Bement 2011).

Já na reposta celular, outra etapa da inflamação, as plaquetas que formam o coágulo também liberam quimioatrativos e fatores de crescimento. Vários mediadores atuam como quimioatrativos para os neutrófilos como, por exemplo, as prostaglandinas, que mediam a dilatação dos vasos sanguíneos mais próximos, permitindo o aumento do tráfego destas células para o leito da lesão. As interleucinas (como, por exemplo, a IL-1), TNF- $\alpha$ , fator de crescimento transformante  $\beta$  (TFG- $\beta$ ) e produtos do metabolismo bacteriano liberados no local da lesão também atuam como potentes quimioatrativos para os neutrófilos (Broughton *et al.* 2006), caracterizando a segunda fase do reparo (Li *et al.* 2007). Já no leito da lesão, os neutrófilos fagocitam os restos celulares e teciduais, secretam proteases e eliminam as bactérias locais (Profyris *et al.* 2012). As células mononucleares, como os monócitos, que se transformam em macrófagos no local da lesão, são mais atuantes na resolução da inflamação. Os macrófagos estão entre as células reguladoras mais importantes da inflamação, fagocitando, digerindo e eliminando organismos patogênicos, além de remover os restos teciduais e destruir os neutrófilos remanescentes. Essa migração das células inflamatórias se deve, principalmente, pela liberação de fatores quimioatrativos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o TGF- $\beta$ , liberados na restauração da homeostase, e de mediadores secretados pelos mastócitos (Li *et al.* 2007). Uma das principais substâncias liberadas pelos mastócitos é a histamina, que atua no receptor 1 de histamina, promovendo a dilatação das artérias e aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Os mastócitos também secretam grânulos contendo heparina, que aumentam a permeabilidade inicial das vênulas. Além disso, a heparina também atua como anticoagulante, impedindo a coagulação durante a fase inicial da resposta inflamatória (Li *et al.* 2007). Essas sinalizações moleculares são vitais para a coordenação do reparo e essenciais para estimular a chegada da próxima fase, a fase proliferativa (Profyris *et al.* 2012).

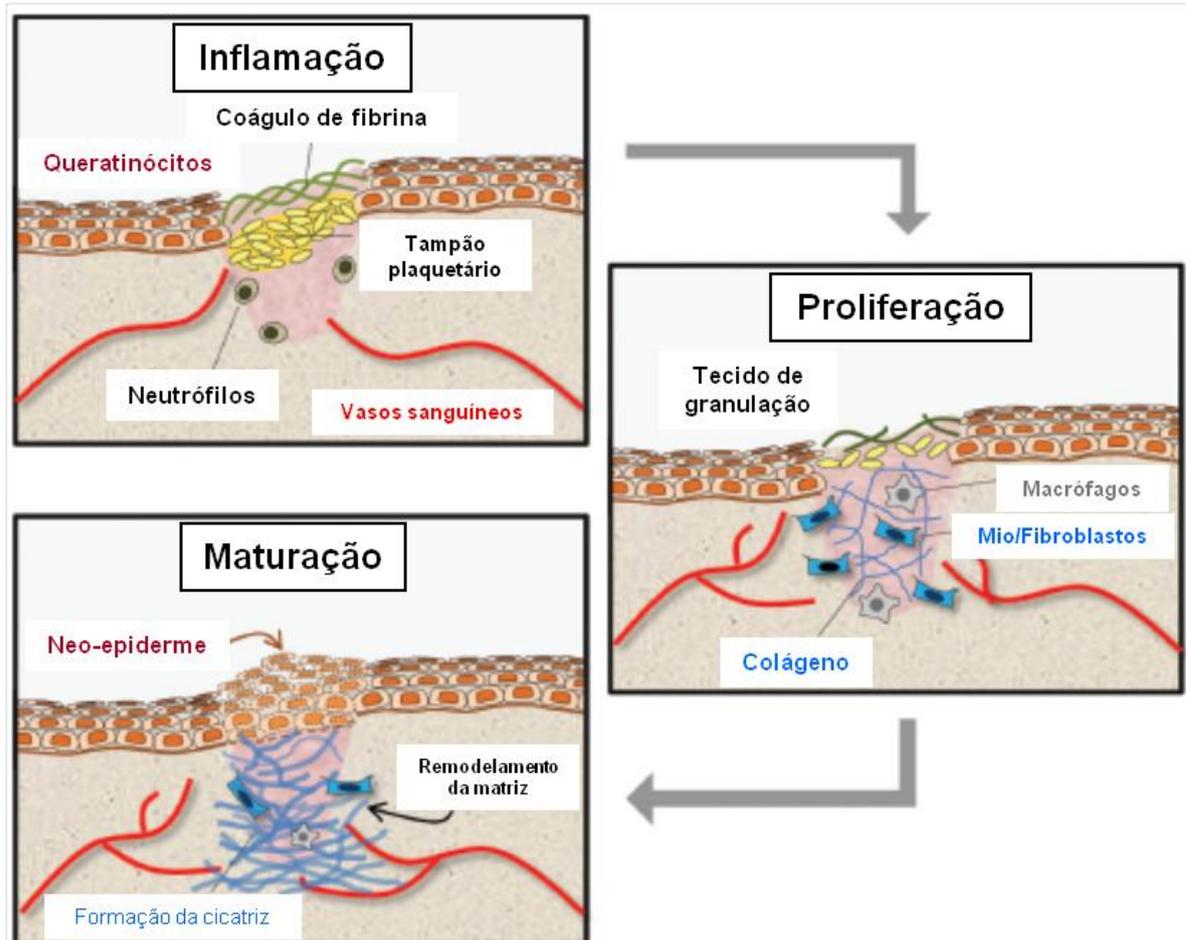
O segundo estágio do reparo de lesões, a fase de formação do tecido de granulação e é caracterizada pela proliferação e pela migração de diferentes tipos celulares. Durante a fase proliferativa ocorre a formação de uma barreira com permeabilidade seletiva (reepitelização), o estabelecimento do suprimento sanguíneo apropriado e a síntese de um novo tecido (fibroplasia) (Li *et al.* 2007). Nessa fase, o tecido de granulação substituiu o coágulo homeostático de fibrina formado na fase inflamatória (Profyris *et al.* 2012). A reepitelização é induzida pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e pelo TNF- $\alpha$ , produzidos pelas plaquetas ativadas e pelos macrófagos (Reinke & Sorg 2012). Os macrófagos sendo estimulados pelo PDGF e pelo TGF- $\beta$ 1; por sua vez, secretam EGF juntamente com as plaquetas o que induz a migração e proliferação de fibroblastos no leito da lesão (Profyris *et al.* 2012). Além disso, alguns desses fibroblastos atraídos para o local da lesão se diferenciam em miofibroblastos; que são células contráteis que expressam de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e ao longo do tempo tem a capacidade de aproximar as bordas da lesão. As células musculares lisas, células mioepiteliais e células componentes do sistema vascular também expressam  $\alpha$ -SMA (Desmouliere *et al.* 2005; Gabbiani 2003). Os fibroblastos e os miofibroblastos interagem e produzem matriz provisória, composta principalmente pelo colágeno tipo III, glicosaminoglicanos, fibronectina, entre outras proteínas da matriz (Broughton *et al.* 2006).

Através desse arcabouço, um ambiente propício para a proliferação de células endoteliais é formado e a partir do estímulo do TNF- $\alpha$  e VEGF, um dos mais importantes mediadores pró-angiogênicos que estimulam vários componentes da cascata angiogênica (formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes). A base do que é chamado de tecido de granulação está nesse período do processo de cicatrização constituído por fibras do sistema colágeno relativamente desorganizadas, alta celularidade (fibroblastos, macrófagos e granulócitos) além da nova rede vascular (Reinke & Sorg 2012; Sonnemann & Bement 2011).

O terceiro estágio do reparo de lesões, a fase de remodelamento, começa 2-3 semanas após a lesão e pode durar um ano ou mais. Durante este estágio, todos os processos ativados após a lesão desaceleram e param. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose, deixando o tecido de granulação com menor densidade celular em relação às outras fases (Gurtner *et al.* 2008). Além disso, a matriz extracelular é ativamente remodelada, com substituição

de colágeno do tipo III por colágeno do tipo I (Lovvorn *et al.* 1999). Este processo é realizado pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) que são secretadas pelos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, fortalecendo o tecido reparado. Dessa forma, o tecido de granulação estabelecido nas fases iniciais do reparo dá lugar a cicatriz. Entretanto, o tecido nunca recupera as propriedades da pele não lesada (Gurtner *et al.* 2008). A Figura 1 esquematiza as fases do processo de reparo tecidual.

A síntese e a liberação de citocinas são necessárias para a cicatrização de lesões, porém quantidades excessivas de citocinas inflamatórias estão presentes em lesões que não cicatrizam como as úlceras e/ou doenças inflamatórias crônicas (Cooney *et al.* 1997; Trengove *et al.* 2000). Estudos recentes têm demonstrado que a resistência à insulina induz inflamação, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias tais como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas são expressas principalmente em macrófagos, monócitos e neutrófilos, em muitos tecidos periféricos. Já se sabe que a infiltração de macrófagos para a área lesada aumenta significativamente em lesões patológicas, como é o caso de lesões diabéticas em humanos e em modelos de animais geneticamente diabéticos ou obesos (db/db ou ob/ob) (Goren *et al.* 2003; Wetzler *et al.* 2000). Já se sabe que a obesidade é descrita como uma inflamação crônica de baixo grau caracterizada pela síntese anormal de adipocinas e a ativação de vias pró-inflamatórias que por sua vez induzem a produção e liberação de fatores e citocinas inflamatórias. As alterações associadas à obesidade como a aterosclerose, doenças coronarianas e diabetes tipo 2 possuem como factor comum a resistência à insulina.



**Figura 1. As três fases clássicas do reparo tecidual cutâneo.** A fase de inflamação ocorre imediatamente após o dano tecidual com a ativação da cascata de coagulação que tem como objetivo a formação de um coágulo e de uma matriz provisória. A fase de proliferativa é caracterizada pela proliferação e pela migração de diferentes tipos celulares que resultam na reepitelização e na produção do tecido de granulação. A fase de maturação é caracterizada pela redução da celularidade e pelo remodelamento da cicatriz. Modificado de Ko et al, 2011.(Ko *et al.* 2011).

## 2. OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA

Muitas linhas de pesquisa mostram evidências sobre a possível causa da obesidade relacionada com a resistência à insulina: ativação crônica das vias pró-inflamatórias dentro das células alvo de insulina. De maneira coerente com esses dados, altos níveis das citocinas pró-inflamatórias como; TNF- $\alpha$ , IL-6 e proteína C-reativa (PCR) têm sido observadas em pessoas com resistência à insulina e diabetes (de Luca & Olefsky 2008; Shoelson *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008). No entanto, os eventos fisiológicos exatos que levam à iniciação da resposta inflamatória durante a obesidade permanece incompreendida. Uma teoria sustenta a hipótese que a expansão do tecido adiposo ocorre devido à hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e que então esses adipócitos grandes acabam com o suprimento local de oxigênio, o que leva a hipóxia celular, provocando a ativação de vias de estresse celular. Esses eventos induzem à inflamação celular autônoma e à liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, adipocinas como resistina, leptina e adiponectina, que são secretadas pelos adipócitos, também afetam a inflamação e a sensibilidade à insulina. Como parte do processo inflamatório crônico, citocinas pró-inflamatórias secretadas no local atraem macrófagos para o tecido adiposo, ao chegarem ao tecido adiposo formam as estruturas em forma de coroa (do inglês “crown-like structures”), isto é; macrófagos migram e se posicionam ao redor de grandes adipócitos mortos. Estes macrófagos teciduais em seguida, liberam citocinas, que por sua vez são capazes de ativar a inflamação em adipócitos vizinhos, exacerbando a inflamação e a resistência à insulina (de Luca & Olefsky 2008).

A resistência à insulina é definida como o estado de uma célula alvo com capacidade reduzida de resposta aos níveis normais de insulina circulante (DeFronzo & Ferrannini 1991). O estudo dos fatores que desencadeiam a resistência à insulina têm sido um grande desafio para a ciência, em parte devido aos diversos fatores de risco ligados a esta condição, incluindo obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (Hoehn *et al.* 2009). Outro dado de grande importância que não pode deixar de ser mencionado foi analisado pela Federação Internacional de Diabetes; segundo esta organização em 2003 existiam 190 milhões

de adultos (29-79 anos) no mundo inteiro com o diagnóstico de diabetes tipo-2; atualmente (2012) esses números quase dobraram, passando para 371 milhões de adultos (*International Diabetes Federation 2012*).

Muitas linhas de pesquisa já demonstraram que ativação crônica das vias pró-inflamatórias no interior células-alvo à insulina pode levar a resistência à insulina relacionada com a obesidade. Várias citocinas tais como IL-6, IL-1 $\beta$ , fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e TNF- $\alpha$ , podem ser liberadas por ambos tipo celulares; adipócitos e macrófagos (Halberg *et al.* 2008; Scherer 2006; Wang *et al.* 2008). Em estudos anteriores foi observado que as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 em indivíduos com resistência à insulina e diabetes estão elevadas (Tajiri *et al.* 2005). Além disso, os níveis de TNF- $\alpha$  estão elevados no tecido adiposo e sangue de roedores obesos, e já se sabe que a neutralização desta citocina melhora a sensibilidade à insulina nestes animais (Hotamisligil *et al.* 1995).

Diferentes subpopulações de macrófagos estão envolvidas na inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade. Macrófagos que se acumulam no tecido adiposo de roedores obesos expressam principalmente genes associados com o fenótipo M1 ou macrófagos classicamente ativados, enquanto que o macrófagos presentes no tecido adiposo de roedores magros expressam genes associados com macrófago M2 ou macrófagos alternativamente ativados (Lumeng *et al.* 2007). O estímulo com citocinas do tipo Th1 (isto é, sintetizadas ou induzidas pelos linfócitos T helper 1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou com produtos bacterianos leva à polarização dos macrófagos para o fenótipo M1, que produzem citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6), além da elevada expressão da enzima da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) (Gordon 2003). Esse subtipo de macrófago é duplamente positivo para marcadores de superfície F4/80, receptor do fragmento C3bi do complemento (CD11b). Em relação aos macrófagos que são polarizados para o fenótipo M2, essa indução ocorre devido a presença de citocinas do tipo Th2 (sintetizadas ou induzidas pelos linfócitos T helper 2), tais como IL-4 e IL-13. Os macrófagos M2 produzem principalmente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e reduzem a expressão e a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Funcionalmente, os macrófagos M2 estão associados com o reparo tecidual e a resolução de inflamação e são positivos para F4/80 e CD11b (Gordon 2003).

Dependendo do fenótipo de macrófago predominante no tecido o ambiente será enriquecido de citocinas e fatores pró ou anti-inflamatórios, favorecendo ou não as doenças metabólicas associadas à obesidade. Alguns fatores como o TNF- $\alpha$ , MCP-1 e a IL-1 $\beta$ , mais recentemente identificados como fatores que promovem a inflamação; a IL-10, citada anteriormente como citocina anti-inflamatória, são expressos no tecido adiposo e em outros tecidos como a pele, por exemplo; suas propriedades metabólicas serão discutidas em mais detalhes a seguir:

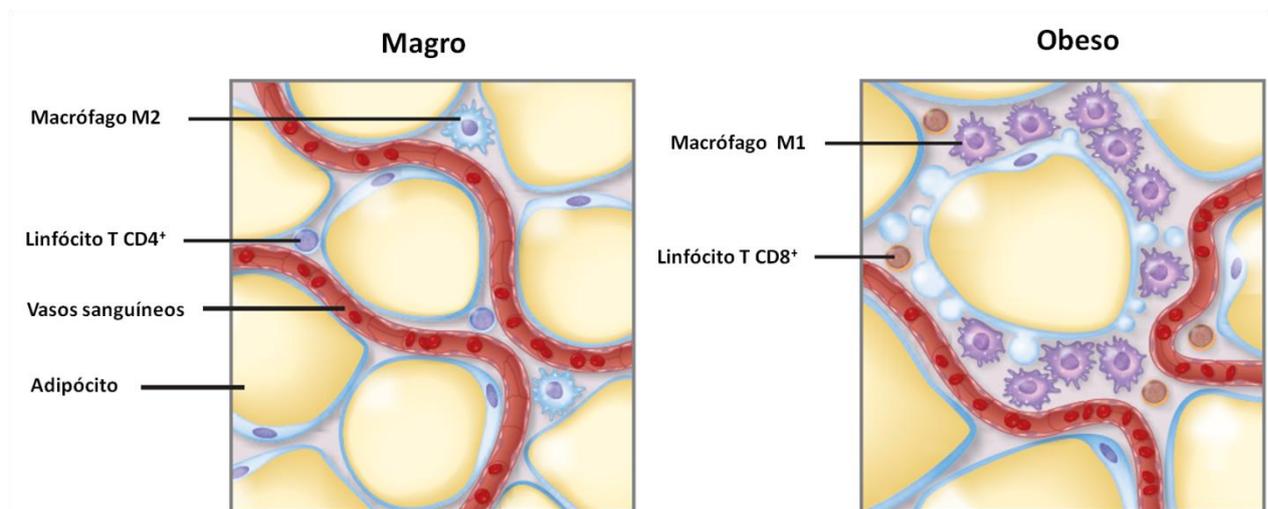
- **TNF- $\alpha$ .** O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, que é principalmente produzida por monócitos e macrófagos e tem um papel central em doenças inflamatórias e auto-imunes. A expressão de TNF- $\alpha$  é aumentada no tecido adiposo de animais em modelos experimentais de obesidade e diabetes tipo 2 (Hotamisligil *et al.* 1993). Por conseguinte, a neutralização do TNF- $\alpha$  induzida por sinalização em animais obesos aumenta a sensibilidade à insulina, que está associada com um aumento da sinalização da insulina no músculo e tecido adiposo (Hotamisligil *et al.* 1994; Hotamisligil *et al.* 1993; Uysal *et al.* 1997). Esses dados confirmam a hipótese de que o TNF- $\alpha$  tem o papel crucial como fator pró-inflamatório na resistência à insulina associada à obesidade. Por outro lado, o bloqueio, do TNF- $\alpha$  em pacientes com graves doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e psoríase, promove o aumento da sensibilidade à insulina (Gonzalez-Gay *et al.* 2006; Marra *et al.* 2007), o que sugere que a inibição de TNF- $\alpha$  poderia ser eficaz no tratamento de pacientes que apresentam resistência à insulina em determinadas condições (tais como doenças inflamatórias graves). Estudos recentes também mostraram que a neutralização por um período prolongado de TNF- $\alpha$  em pacientes com síndrome metabólica melhora os níveis de glicemia de jejum (Stanley *et al.* 2011), confirmando a hipótese que o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  durante a obesidade prejudica a homeostase da glicose em seres humanos.
- **MCP-1.** Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1, também conhecida como ligante de citocina 2 (CCL2) e seu receptor de citocina 2 (CCR2) são também componentes importantes da resistência à insulina em roedores obesos. A MCP-1 é uma citocina secretada principalmente por macrófagos e células endoteliais que promovem o recrutamento de monócitos para tecidos danificados ou inflamados (Kurihara & Bravo 1996). Weisberg e

colaboradores examinaram o papel do CCR2 e descobriram que roedores CCR2<sup>-/-</sup> obesos apresentam menor infiltração de macrófagos no tecido adiposo, esteatose hepática reduzida, além da diminuição do perfil inflamatório e da sensibilidade à insulina sistêmica. A deficiência no CCR2 também atenuou o elevado ganho de peso induzido por dieta rica em gordura, causando uma redução na ingestão de calorias, destacando o possível envolvimento do CCR2 no controle do comportamento alimentar. Além disso, o tratamento farmacológico de roedores obesos com um antagonista do CCR2 levou à diminuição da infiltração de macrófagos adiposo e à sensibilidade à insulina (Weisberg *et al.* 2006). Estudos complementares sobre o MCP-1, têm mostrado que a sua expressão é aumentada em roedores obesos, sugerindo que mudanças nos níveis de MCP-1 promovem o recrutamento de macrófagos de tecido adiposo, e em seguida, induz a inflamação e a resistência à insulina. Esta hipótese foi testada em roedores geneticamente modificados que apresentam alta expressão de MCP-1. Este estudo concluiu que a alta expressão de MCP-1 no tecido adiposo aumenta a infiltração de macrófagos, causando resistência à insulina (Kamei *et al.* 2006; Kanda *et al.* 2006). Kanda e colaboradores foram mais longe para mostrar que o aparecimento destas anormalidades em roedores obesos poderia ser prevenida pela deleção genética de MCP1 (Kanda *et al.* 2006). Já, Inouye e colaboradores sugerem que a MCP-1 pode também ter um papel no metabolismo energético. No entanto, em contraste com os estudos anteriores, mostraram que animais que são geneticamente modificados (MCP-1<sup>-/-</sup>) submetidos a uma dieta rica em gordura desenvolvem hiperinsulinemia e aumento da adiposidade independente a quantidade de macrófagos do tecido adiposo. Diferenças em abordagens experimentais, bem como a complexidade/redundância de sinalização da citocina podem ser responsáveis por estas conflitantes conclusões (Inouye *et al.* 2007). A maior parte das evidências sugere que o eixo MCP-1/CCR2 pode ser umas das explicações para a associação da obesidade, a inflamação do tecido e resistência à insulina.

- **IL-1 $\beta$ .** IL-1 $\beta$  é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes. Ela é produzida por monócitos e macrófagos (Martin & Wesche 2002). Estudos recentes sugerem que a IL-1 $\beta$  poderia também pertencer à rede de citocinas

envolvidas na resistência à insulina. Os indivíduos com níveis circulantes detectáveis de IL-1 $\beta$  e níveis elevados de IL-6 têm um risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2 (Spranger *et al.* 2003). Já se sabe que a expressão tanto de IL-1 $\beta$  e do seu receptor está aumentada em tecido adiposo visceral de pacientes obesos (Juge-Aubry *et al.* 2004).

- **IL-10.** É uma citocina anti-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos. IL-10 exerce a sua atividade anti-inflamatória através da inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) induzida pela redução da atividade da quinase do complexo I $\kappa$ B (IKK) (Schottelius *et al.* 1999). Em estudos com seres humanos, demonstrou-se que há uma maior incidência de resistência à insulina em indivíduos com menores níveis séricos de IL-10 (van Exel *et al.* 2002). Isto levanta a possibilidade de que a IL-10 possa exercer efeitos como aumentar a sensibilidade à insulina. Consistente com esta idéia, já foi demonstrado que roedores tratados com IL-10 não se tornaram resistentes à insulina quando tratados com IL-6 (Kim *et al.* 2004). Além disso, Lumeng e colaboradores demonstraram que as células 3T3L1 (adipócitos) quando tratadas com IL-10 são protegidas da ação do TNF- $\alpha$  quando induzidas à resistência à insulina (Lumeng *et al.* 2007). O tratamento de doenças inflamatórias como a psoríase com IL-10 recombinante, tem sido uma terapia eficaz e, portanto, a modulação da atividade da IL-10 pode servir como um potente tratamento da resistência à insulina (Asadullah *et al.* 2003).



**Figura 2 – Tecido adiposo e as subpopulações de macrófagos.** Tecido adiposo em pessoas magras é caracterizado por macrófagos M2 e linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Em pessoas obesas, o tecido adiposo apresenta macrófagos M1 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> e sinais de inflamação. Modificado de Julia *et al.*, 2013 (Barrett 2013).

Há evidências experimentais que demonstram claramente que, sob determinadas condições, "somente" os mediadores inflamatórios podem desencadear a resistência à insulina em células, em modelos experimentais e seres humanos, na ausência de outros fatores desencadeantes, tais como a obesidade. Esta observação, sugere que a inflamação é proporcional à deterioração metabólica. Embora este conceito seja válido para certas condições, tais como infecções graves, queimaduras e traumas, não é claro se o mesmo é aplicável a obesidade ou outras doenças metabólicas crônicas. Além disso, também é claro que a disfunção metabólica crônica pode ser desencadeada por excesso de nutrientes, tais como lipídeos e glicose. No entanto, neste caso, esses sinais também desencadeiam simultaneamente respostas inflamatórias. Nesta definição de excesso metabólico, é mais provável que esses sinais metabólicos sirvam como gatilhos para as respostas inflamatórias, e, em seguida, a função metabólica seja ainda mais perturbada, levando, assim, a mais estresse e inflamação (Spranger *et al.* 2003).

Além disso, já se sabe que os camundongos resistentes à insulina apresentam retardo durante o processo de cicatrização de lesões cutâneas (Seitz *et al.* 2010). Os defeitos mais frequentes estão associados a uma perda de função de diversos fatores de crescimento que coordenam determinadas células como os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, na presença da resposta inflamatória exacerbada (Frank *et al.* 1995; Tsuboi & Rifkin 1990; Werner *et al.* 1994). A fase inicial do processo de cicatrização de lesões (inflamação) é crucial em lesões que estão em condições normais ou patológicas. A resposta inflamatória é caracterizada pela ativação do sistema imunológico inato local, o que resulta num influxo imediato de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), seguido de subsequente invasão de monócitos do sangue, que se diferenciam em macrófagos dos tecidos (Lucas *et al.* 2010). Já está bem descrito que os macrófagos da lesão promovem a cicatrização devido a sua participação na retirada dos debris da lesão e secreção de uma ampla gama de mediadores, e que os macrófagos são ativados de forma anormal em animais submetidos a uma dieta rica em gordura (Koh & DiPietro 2011).

### 3. MACRÓFAGOS DURANTE O REPARO TECIDUAL

Os macrófagos são células mielóides maduras, derivadas da diferenciação dos monócitos circulantes após infiltração no tecido. Longe de ser uma população homogênea, os macrófagos exibem alguns fenótipos e propriedades fisiológicas, dependendo das citocinas que induzem a sua maturação (Gordon & Taylor 2005). Além disso, os macrófagos são células capazes de mudar de uma subpopulação funcional para outra, dependendo do estímulo recebido (Stout & Suttles 2004). Outro aspecto da heterogeneidade de macrófagos é a especialização do tecido dos macrófagos residentes; microglia, células do cérebro, células de Kupffer, do fígado ou macrófagos alveolares, no pulmão. No entanto, ainda não está claro se esses são os macrófagos residentes derivados de monócitos circulantes que estão em um estado estacionário ou se são células terminalmente diferenciadas (Gordon & Taylor 2005).

Após o nascimento, os macrófagos são de extrema importância durante as diferentes fases do processo de cicatrização de lesões, modulam a função de diferentes tipos celulares envolvidos neste processo. O benefício de inflamação e células inflamatórias durante o processo de cicatrização de lesões é um assunto em constante debate; já em condições normais essas células promovem o fechamento da lesão, mas também podem induzir fibrose durante a formação de cicatriz.

Os macrófagos representam o meio mais eficaz de remover os neutrófilos. Eles respondem aos neutrófilos e aos seus produtos, e induzem a apoptose em neutrófilos (Meszaros *et al.* 1999). Talvez o papel mais importante realizado pelos macrófagos seja o de reconhecer e ingerir neutrófilos ativamente apoptóticos, ajudando assim a resolver a fase de inflamação do processo de reparo (Daley *et al.* 2005; Khanna *et al.* 2010; Meszaros *et al.* 1999; Savill *et al.* 1989). Vários estudos sugerem que a fagocitose de neutrófilos tem influência sobre os fenótipos de macrófagos, causando uma mudança do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para o fenótipo M2, o que induz o processo de cicatrização (Fadok *et al.* 1998).

Estudos recentes sugerem que a falha na remoção das células inflamatórias, tais como neutrófilos, tem uma papel na patogênese de lesões que não cicatrizam (Acosta *et al.* 2008; Khanna *et al.* 2010). Já se sabe que um déficit na capacidade de

macrófagos em remover, de maneira eficaz, neutrófilos foi recentemente relatado como um componente crítico da cicatrização deficiente observada em lesões diabéticas (Khanna *et al.* 2010). Os macrófagos derivados de esponjas implantadas em camundongos diabéticos apresentaram menor taxa de fagocitose de células apoptóticas. Esse déficit está associado com maior quantidade de células apoptóticas e mediadores pró-inflamatórios na lesão, outra característica que foi observada em lesões de pacientes diabéticos. Por conseguinte, o processo de fagocitose bem sucedido executado pelos macrófagos pode ser necessário para cicatrização de lesões, tanto para a remoção de neutrófilos apoptóticos, quanto para a transição para um fenótipo de macrófagos que suporte os aspectos proliferativos do reparo tecidual cutâneo.

Já se sabe que a ausência de macrófagos pode alterar as fases mais tardias do reparo como foi mostrado por Goren e colaboradores que utilizaram camundongos com depleção de macrófagos (Goren *et al.* 2009). Neste modelo encontrava-se poucos miofibroblastos e baixa taxa da contração da lesão, apesar da bioatividade normal de TGF- $\beta$ . A maioria desses resultados corroboram os dados de Mirza e colaboradores, eles também demonstraram que a depleção de macrófagos provoca retardo na reepitelização, diminuição na deposição de colágeno, agiogênese prejudicada, bem como uma menor taxa de proliferação celular associada com a menor expressão de TGF- $\beta$  e VEGF (Mirza *et al.* 2009). Essa discrepância em relação a expressão de TGF- $\beta$ 1 pode ser explicada devido aos locais da lesão onde ocorre diferenciação miofibroblástica (Lucas *et al.* 2010).

Estudos recentes de macrófagos derivados de lesões da pele, assim como de esponjas implantadas na região subcutânea em camundongos, demonstram que macrófagos apresentam múltiplos fenótipos que mudam ao longo do tempo (Daley *et al.* 2010). Estes estudos sugerem que as células M1 (ativação clássica), que são caracterizadas pela alta expressão de Ly6C e produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, são comuns nas fases iniciais do reparo, enquanto que células M2, sintetizam menos citocinas pró-inflamatórias e apresentam alta expressão da arginase 1 (Arg-1), são comuns nas fases mais tardias do reparo. No entanto, estes fenótipos *in vivo* não são facilmente identificados, e não reproduzem completamente as descrições demonstradas em macrófagos *in vitro*. Por exemplo, foram encontradas populações de macrófagos que exibiam marcadores de fenótipo M2 (ativados alternativamente), tais como Arg-1 e citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, que normalmente estão associadas

as células M1 (classicamente ativadas). Em qualquer fase do processo de cicatrização o leito da lesão pode conter macrófagos com diferentes fenótipos. Vários estudos sugerem que as alterações nos fenótipos de macrófagos desempenham um papel crítico no desenvolvimento de lesões crônicas. Além disso, estudos preliminares indicam que a transição do fenótipo de macrófago pró-inflamatório (células M1) para um fenótipo M2 é prejudicada em macrófagos de lesão excisional de camundongos geneticamente diabéticos (db/db). No entanto, os fatores envolvidos na permanência do determinado fenótipo de macrófagos no decorrer do processo de cicatrização de lesões dos camundongos diabéticos ainda não estão esclarecidos (Koh & DiPietro 2011).

Por outro lado, há poucos estudos sobre os fenótipos de macrófagos reais que existem na lesão *in vivo* e os fenótipos descritos até agora parecem altamente complexos (Daley *et al.* 2010). Além disso, foram propostos vários marcadores de fenótipos macrófagos, porém existe uma falta de concordância sobre os quais são os mais críticos ou informativos. Finalmente, investigações sobre os fenótipos de macrófagos de lesão são limitados devido as dificuldades técnicas na obtenção de amostra verdadeiramente representativa das populações de células a partir de locais específicos nas lesões (Koh & DiPietro 2011).

Como mencionado anteriormente, as lesões crônicas são um dos principais problemas de saúde pública, e os atuais tratamentos são frequentemente ineficazes. Evidências indicam que a disfunção de macrófagos é um dos fatores mais importantes na cicatrização deficiente observada em pacientes diabéticos e nos idosos, que estão em constante grande risco ao desenvolvimento de úlceras e lesões crônicas (Khanna *et al.* 2010; Swift *et al.* 2001).

#### 4. OBJETIVOS

- Avaliar as consequências da resistência à insulina induzida por uma dieta com elevado teor de gordura durante o reparo tecidual cutâneo em camundongos.
- Avaliar as alterações na ativação dos macrófagos em camundongos submetidos a uma dieta com alto teor de gordura e os mecanismos pelos quais retardam o reparo tecidual cutâneo.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos

#### 5.1.1. Animais e dietas

Camundongos C57Bl/6 (seis semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=10; por grupo) e submetidos a diferentes dietas durante 30 semanas: ração padrão (RP; 76% carboidratos, 6% gordura e 18% proteína) ou ração hiperlipídica (RHL; 42% carboidratos, 42% de gordura e 16% proteína). O conteúdo de minerais é idêntico em ambas rações; e além disso as recomendações padrões de rações para roedores estão de acordo com (AIN-93) (Reeves *et al.* 1993). O antioxidante presente nas rações é o terc-butil-hidroquinona (BHT). As rações foram produzidas pela Pragsoluções (Pragsoluções; Campinas, SP, Brasil). A tabela 1 mostra a composição das rações. Os animais foram mantidos sob condições padrões; tiveram livre acesso à água e comida e foram acondicionados em uma sala com temperatura controlada (22°C) em um ciclo de 12 horas claro/escuro. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética para o uso de animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA/012/2010).

A pressão arterial sistólica foi verificada pelo método não-invasivo de pletismografia de cauda, em todos camundongos sem auxílio de anestésicos (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha), na 28ª semana do experimento. A ingestão de ração e a massa corporal foram medidas semanalmente, desde o início do período experimental, e o comprimento naso-anal foi medido mensalmente. O Índice de Lee foi calculado mensalmente dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento naso-anal (mm) x 10<sup>4</sup> (Cattaneo *et al.* 1997). A eficiência alimentar (EA) [(ganho de peso/kcal consumida) x100] foi determinada após 30 semanas em ambos os grupos. Todos os dados são apresentados como a média e erro padrão da média (EPM).

**Tabela 1.** Composição e conteúdo energético das rações padrão (RP) e hiperlipídica (RHL)

Conteúdo (g/Kg)	Dieta	
	RP	RHL
Soja	305,0	360,0
Amido de milho	510,7	262,0
Sacarose	75,0	75,0
Óleo de soja	4,3	4,3
Banha	-	200,0
Fibras	31,7	25,4
Vitaminas <sup>§</sup>	10,0	10,0
Minerais <sup>§</sup>	35,0	35,0
L-Cisteína	1,8	1,8
Colina	1,5	1,5
Antioxidante	0,014	0,028
Total (gramas)	1000,0	1000,0
Conteúdo energético (kJ/g)	16,2	19,4
Carboidrato (%)	76	42
Proteína (%)	14	16
Lipídio (%)	10	42

<sup>§</sup>Misturas de vitaminas e minerais

### **5.1.2. Lesão excisional**

Após 28 semanas de dieta, no dia 0, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com quetamina (150 mg/k) e xilazina (15 mg/k) (via intraperitoneal) e receberam implantes subcutâneos de esponjas de poliuretano (PU) na região abdominal. A superfície dorsal foi depilada e uma lesão excisional total, isto é; a epiderme, a derme e a hipoderme foram retiradas, expondo o tecido muscular subjacente de 1 cm<sup>2</sup> foi realizada. A lesão não foi suturada nem coberta e foi cicatrizada por segunda intenção (Otranto *et al.* 2010).

### **5.1.3. Análise macroscópica**

A área da lesão foi medida no dia em que foi feita em 7 e 14 dias após a lesão. Para medir o tamanho da lesão, uma folha plástica transparente foi colocada sobre a lesão e suas margens foram traçadas (Nascimento & Costa 2006). Áreas de de lesão reepitelizada foram observadas e medidas somente 14 dias após a lesão. Após a digitalização, as áreas lesadas foram avaliadas utilizando o sistema de análise de imagem da Zeiss (KS 400; Zeiss-Vision, Oberkochen, Alemanha). Os dados da contração são expressos como porcentagem da área inicial lesada. Já os dados da reepitelização são, por sua vez, expressos como porcentagem de área reepitelizada.

### **5.1.4. Teste de tolerância à glicose oral (TTG)**

Depois de 30 semanas de dieta, após 6 horas de jejum, a concentração de glicose foi determinada no sangue obtido por punção da cauda (tempo 0), em 5 animais selecionados em cada grupo. Logo após, esse animais receberam glicose (2 g/kg) através do método de gavagem e, em seguida, a glicose foi avaliada 15, 30, 60 e 120 minutos após o desafio da glicose. A concentração de glicose foi determinada por meio de uma tira reagente Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostics; Mannheim, Alemanha). Os resultados do TTG via oral são expressos como áreas integradas sob as curvas após 120 minutos da administração via

gavagem da glicose (ASC), calculada utilizando a regra trapezoidal:  $ASC = (C_1 + C_2) (2)^{-1} \times (t_2 - t_1)$  (Anwer *et al.* 2008).

#### **5.1.5. Teste de tolerância à insulina intra-peritoneal (TTI)**

Após 30 semanas de dieta, depois de 6 horas de jejum a concentração de glicose foi determinada no sangue obtido por punção da cauda (tempo 0), em 5 animais por grupo, utilizando uma tira de reagente Accu-Chek (Roche Diagnostics; Mannheim, Alemanha). Logo após, insulina (1 U/kg) foi injetada via intra-peritoneal e, em seguida, as concentrações de glicose foram determinadas 5, 10, 15 e 20 minutos após a injeção. As áreas sob as curvas foram calculadas usando a regra trapezoidal:  $ASC = (C_1 + C_2) (2)^{-1} \times (t_2 - t_1)$  (Bhatt & Makwana 2008).

#### **5.1.6. Eutanásia, coleta e análise microscópica**

Quatorze dias após a realização das lesões, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) (via intraperitoneal) e, em seguida, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. O plasma foi obtido após ser centrifugado (120 g; 10 minutos) e logo em seguida foi congelado a -80°C. Além disso, as lesões de pele normal adjacente foram devidamente removidas e divididas em dois fragmentos. Um fragmento de cada animal foi fixado em formol e embebido em parafina, enquanto o outro (sem pele normal adjacente) foi congelado a -80°C para realizar dosagem de hidroxiprolina. Os implantes de esponjas de PU foram recolhidos e imediatamente armazenados individualmente a -80°C para análises bioquímicas (mieloperoxidase, nitrito e dosagens de malondialdeído) Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação do aspecto geral da lesão e com vermelho de picrossírius, sob microscopia de luz polarizada, para avaliar a densidade das fibras colágenas.

#### **5.1.7 Imunohistoquímica e quantificações**

Para a quantificação da células NOS 2-positivas, os cortes foram incubados com o anticorpo policlonal anti-NOS 2 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA)

Além disso, a densidade de miofibroblastos e vasos sanguíneos foram avaliadas através do anticorpo monoclonal anti- $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (DAKO; Carpinteria, CA). Para quantificar os macrófagos e neutrófilos, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-F4/80 (Serotec; Raleigh, UK) e com um anticorpo monoclonal anti-mieloperoxidase (anti-MPO) (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente.

A recuperação antigênica foi realizada com tripsina a 0,1% (Difco Laboratories; Detroit, MI). A peroxidase endógena foi inibida pela incubação dos cortes em peróxido de hidrogênio 3% em metanol. Após a lavagem desses cortes, os anticorpos primários foram detectados usando o anticorpo policlonal anti-rato biotinilado (DAKO), EnVision anti-camundongo (DAKO) ou anti-coelho conjugado à peroxidase (DAKO). A diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno e os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris. Nenhuma marcação foi observada nos cortes onde o anticorpo primário foi omitido. Para quantificar o número de células NOS 2-, macrófagos e neutrófilos, dez campos aleatórios por corte/animal ( $15.000 \mu\text{m}^2$ ) foram avaliados no tecido de granulação, usando lentes objetivas de 40x em um sistema de videomicroscopia. Os dados são apresentados como quantidade de células por  $\text{mm}^2$ .

A densidade de volume (Vv) de miofibroblastos e vasos sanguíneos dentro do tecido de granulação foi estimada utilizando uma ferramenta estereológica (contagem de pontos) (Otranto *et al.* 2010). A densidade de volume (Vv) de cada uma das estruturas foi expressa como a percentagem de pontos que atingem cada estrutura (Pp) em relação ao número total de pontos (Pt) na grade. Dez campos aleatórios por corte/animal foram analisados utilizando com lentes objetivas de 40x. A densidade de volume dos miofibroblastos (Vv[miofibroblastos]%) e vasos sanguíneos (Vv[vasos sanguíneos]%) foi estimada no tecido de granulação.

Todas as análises foram realizadas de maneira cega e duas vezes sem qualquer diferença significativa entre as medidas. Fotomicrografias foram capturadas com lentes objetivas de 100x. Os dados são expressos como média e o erro padrão da média (EPM).

### 5.1.8 Determinação dos níveis de hidroxiprolina

A deposição de colágeno na área lesada foi quantificada pelo ensaio de hidroxiprolina no tecido congelado. Para remoção de gordura, cerca de 5-15 mg de tecido seco foi incubada com acetona (100%), durante 2 dias, mudando acetona a cada 24 horas e, em seguida, para um período adicional de 24 horas em uma mistura de clorofórmio e etanol (2:1). Em seguida, o tecido foi seco a 60°C durante 1 hora. As amostras de tecido seco e livre de lipídio foram hidrolisadas com HCl 6 mol/l por 18 horas a 118°C em tubos de ensaio selados. Os lisados foram diluídos em água destilada, neutralizados com 6 mol/l de NaOH e centrifugados a 700 g por 15 minutos. Os níveis de hidroxiprolina foram medidos nesses lisados como descrito previamente (Woessner 1961). Para isso, alíquotas diluídas de lisado (80 µl) foram misturados com 40 µl de cloramina-T (0,05 M) (Merck, Whitehouse Station, NJ) e incubadas durante 20 minutos a 25°C. Em seguida, 40 µl de ácido perclórico (3,17 M) (Vetec; Rio de Janeiro, Brasil), e 40 µl de 4-dimetilaminobenzaldeído (Merck) foram adicionados, e as placas foram novamente incubadas durante 20 minutos a 60°C. A placa foi lida em espectrofotômetro a 550 nm. As concentrações de hidroxiprolina foram determinados a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de L-4-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os dados são expressos como ng de hidroxiprolina por mg de tecido.

### 5.1.9 Análises bioquímicas

O colesterol total plasmático (TC) e os triglicerídeos (TG) foram medidos com um teste colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

A dosagem de nitrito foi utilizada como um índice da síntese de óxido nítrico (ON), porque o nitrito é uma molécula estável, sendo responsável por mais de 90% do total dos metabólitos mensuráveis de ON (Schaffer *et al.* 1997). Para investigar os níveis de nitrito, os fragmentos dos implantes de esponja de PU foram homogeneizadas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; NaCl 138 mM, glicerol a 10%, 1% de Triton X-100, 2 mM de EDTA, 10 mg/ml de leupeptina, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo [todos os reagentes Sigma-Aldrich]). Os níveis de nitrito

no lisado foram determinados por um método espectrofotométrico baseado na reação de Griess (Green *et al.* 1982). Uma alíquota de cada amostra (100  $\mu$ l) foi misturada e incubada com 100 ml de reagente de Griess, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A placa foi lida em espectrofotômetro a 550 nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de nitrito de sódio. A concentração de proteína total foi determinada utilizando o método de Bradford. Os dados são expressos como mmol de nitrito por mg de proteína total. Todas as análises foram realizadas em triplicata e repetidas, sem diferenças significativas.

Para estimar o número de neutrófilos na área lesada, a dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) do lisado dos implantes de esponja de PU foi realizada de acordo com a Stark e colaboradores, com pequenas modificações (Stark *et al.* 1992). Uma alíquota do lisado foi misturada em tampão fosfato (80 mM), contendo brometo de amônio a 0,5% hexadeciltrimetil (Sigma-Aldrich) ao pH 5,5. A mistura foi centrifugada a 130 g durante 15 minutos para extrair a MPO. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado com 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina dicloridrato de (1,9 mg/ml) (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio (1 mM) (Vetec). Em seguida, a mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos e, misturada com tampão acetato pH 3,0 (1,64 M). A placa foi lida em espectrofotômetro a 630 nm. As concentrações de MPO nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de MPO de leucócitos humanos. Os dados são expressos como mU de MPO por mg de proteína total.

#### **5.1.10 Dosagem de malondialdeído (MDA)**

O método para quantificar o produto da reação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); como o malondialdeído (MDA) foi utilizado como índice de peroxidação lipídica, conforme descrito anteriormente (Draper *et al.* 1993). As amostras do lisado a partir dos implantes de esponja de PU foram misturadas com 10% de ácido acético e de ácido tiobarbitúrico 0,67% e, em seguida, aquecida em água fervendo durante 30 minutos. Os níveis de TBARS foram determinados por absorvância a 532 nm. Os resultados são expressos em equivalentes de MDA (nM/ $\mu$ g).

### 5.1.11 Dosagem de proteínas carboniladas

Carbonilação das proteínas foram quantificadas através da medida do conteúdo de proteína carboniladas por derivatização com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (Levine *et al.* 1990). As proteínas lisadas da lesão em tampão fosfato 50 mM de potássio, pH 7,4, foram derivatizadas com DNPH (21% em HCl 2 N). Os brancos foram misturados com 2 N de HCl e incubados durante 1 hora, no escuro, a proteína foi precipitada com 20% de ácido tricloroacético (TCA). As proteínas não derivatizadas foram lavadas com uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1). Os peletes finais de proteína foram dissolvidos em 6,0 N de hidrocloreto de guanidina, e a absorvância foi medida a 370 nm. O conteúdo de proteína carboniladas é expresso em mmol por mg de proteína total.

### 5.1.12 Expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e $\alpha$ -SMA

A expressão proteica do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e da  $\alpha$ -SMA foi detectada através de imunoblotting. O lisado proteico (20  $\mu$ g) de cada lesão desnaturada em tampão de amostra, separada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 10% (SDS-PAGE) e então, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF. O padrão de peso molecular foi incluído. As membranas foram bloqueadas por 30 minutos com Tween-PBS 0,05% contendo albumina de soro bovino 5% e incubadas overnight com os anticorpos primários policlonal anti-TGF- $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology) ou monoclonal anti- $\alpha$ -SMA (Santa Cruz Biotechnology), a 4°C. As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário EnVision anti-coelho conjugado à peroxidase (DAKO) ou anti-camundongo conjugado à peroxidase (DAKO), respectivamente por uma hora. Os anticorpos ligados foram detectados por um kit de quimioluminescência (Pierce; Rockford, IL).

As membranas foram estripadas com um tampão de estripagem contendo  $\beta$ -mercaptoetanol (100 nM) e reincubadas para determinar a quantidade de  $\beta$ -actina. As intensidades das bandas foram normalizados pelas intensidades das bandas correspondentes de  $\beta$ -actina através de uma análise densitométrica. A densitometria foi realizada pelo programa Adobe Photoshop versão CS3 (Adobe Systems; San Jose, CA).

### 5.1.13 Análise estatística

Todos os dados são testados quanto à normalidade e homogeneidade. O teste estatístico utilizado na análise da massa corporal e no Índice de Lee foi *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. O teste *t* não-pareado com correção de Welch foi utilizado para analisar a gordura retroperitoneal, a pressão sanguínea, a glicose, a área de lesão, os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol totais, hidroxiprolina, nitrito, MPO, a atividade de MDA e a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e  $\alpha$ -SMA. Já nas análises das densidades dos miofibroblastos e vasos sanguíneos e o número de células NOS 2-positivas, macrófagos e neutrófilos do tecido de granulação foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prisma versão 5.03 (Software GraphPad; San Diego, CA), onde  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 5.2. Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina

### 5.2.1 Modelo experimental

Camundongos C57Bl/6 (seis semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=20; por grupo) e submetidos a diferentes dietas durante 20 semanas: ração padrão (RP; 76% carboidratos, 10% gordura e 14% proteína) ou ração hiperlipídica (RHL; 26% carboidratos, 60% de gordura e 14% proteína). O conteúdo de minerais é idêntico em ambas as rações; e além disso as recomendações padrões de rações para roedores estão de acordo com (AIN-93) (Reeves *et al.* 1993). O antioxidante presente nas rações é o terc-butil-hidroquinona (BHT). As rações foram produzidas pela Pragsoluções (Pragsoluções; Campinas, SP, Brasil). A tabela 2 mostra a composição das rações. Os animais foram mantidos sob condições padrões; tiveram livre acesso à água e comida e foram acondicionados em uma sala com temperatura controlada (22°C) em um ciclo de 12 horas claro/escuro. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética para o uso de animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA/012/2010).

A pressão arterial sistólica foi verificada pelo método não-invasivo de pletismografia de cauda, em todos camundongos sem auxílio de anestésicos (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha), na 19ª semana do experimento. A ingestão de alimentos e a massa corporal foram medidas semanalmente, desde o início do período experimental, e o comprimento naso-anal foi medido mensalmente. O Índice de Lee também foi calculado mensalmente dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento naso-anal (mm) x  $10^4$  (Cattaneo *et al.* 1997). A eficiência alimentar (EA) [(ganho de peso/kcal consumida) x100] foi determinada após 20 semanas em ambos os grupos submetidos as respectivas dietas. Todos os dados são apresentados como médias e erro padrão da média (EPM).

**Tabela 2.** Composição e conteúdo energético das rações padrão (RP) e hiperlipídica (RHL)

Conteúdo (g/Kg)	Dietas	
	RP	RHL
Soja	305,0	410,0
Amido de milho	510,7	80,0
Sacarose	75,0	76,3
Ácidos graxos da soja	25,0	50,0
Óleo de soja	4,3	-
Banha	-	310,0
Fibras	31,7	25,4
Vitaminas <sup>§</sup>	10,0	10,0
Minerais <sup>§</sup>	35,0	35,0
L-Cistina	1,8	1,8
Colina	1,5	1,5
Antioxidante	0,14	0,05
Total (gramas)	1000,0	1000,0
Conteúdo energético (kJ/g)	16,2	21,9
Carboidrato (%)	76	26
Proteína (%)	14	14
Lipídio (%)	10	60

<sup>§</sup>Misturas de vitaminas e minerais

### 5.2.2 Realização da lesão

Após 20 semanas de dieta, no dia 0, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com quetamina (150 mg/k) e xilazina (15 mg/k) (via intraperitoneal) e receberam implantes subcutâneos de esponjas de poliuretano (PU) na região abdominal. A superfície dorsal foi depilada e uma lesão excisional total; isto é, a epiderme, a derme e a hipoderme foram retiradas, expondo o tecido muscular subjacente de 1 cm<sup>2</sup> foi realizada. A lesão não foi suturada nem coberta e foi cicatrizada por segunda intenção (Otranto *et al.* 2010).

### **5.2.3 Macroscopia**

A área da lesão foi medida no dia em que foi feita (d0), 3 e 7 dias após a realização da lesão. Para medir o tamanho da lesão, uma folha plástica transparente foi colocada sobre a lesão e suas margens foram traçadas (Nascimento & Costa 2006). Não observamos áreas de reepitelização mesmo 7 dias após a lesão. Após a digitalização, as áreas lesadas foram avaliadas utilizando o sistema de análise de imagem da Zeiss (KS 400). Os dados da contração foram expressos como porcentagem da área inicial lesada.

### **5.2.4 Teste de tolerância à glicose oral (TTG)**

Depois de 20 semanas de dieta, após 6 horas de jejum, a concentração de glicose foi determinada no sangue obtido por punção da cauda (tempo 0), em 6 animais selecionados em cada grupo, como descrito no item 5.1.4.

### **5.2.5 Teste de tolerância à insulina intra-peritoneal (TTI)**

Após 20 semanas de dieta, depois de 6 horas de jejum a concentração de glicose foi determinada no sangue obtido por punção da cauda (tempo 0), em 6 animais de cada grupo, utilizando uma tira de reagente Accu-Chek (Roche Diagnostics). Como descrito no item 5.1.5.

### **5.2.6 Coleta e análise microscópica**

Após 20 semanas de dieta, os camundongos foram anestesiados com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) (via intraperitoneal) e, em seguida, as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. O plasma foi obtido após ser centrifugado (120 g; 10 minutos) e logo em seguida congelado a -80°C. Os implantes de esponjas de PU foram recolhidos e imediatamente armazenados individualmente a -80°C para análises bioquímicas (western blotting). A gordura retroperitoneal foi cuidadosamente retirada e medida. Além disso, as lesões de pele normal adjacente de 11 animais selecionados em cada um dos grupos (animais que

possuíam implantes espojas de PU) foram devidamente removidas e divididas em dois fragmentos. Um fragmento de cada animal foi fixado em formalina e embebidos em parafina, enquanto o outro (sem pele adjacente normal) foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar dosagem de hidroxiprolina. Como objetivo de caracterizar fenotipicamente os macrófagos (imunofluorescências), as lesões com pele adjacente normal de 9 animais selecionados em cada um grupo (animais que não possuíam implantes espojas de PU) foram devidamente removidas e divididas em dois fragmentos. Um fragmento de cada animal foi embebido em Tissue-Tek Optimun Cutting temperature compound, enquanto o outro (sem pele adjacente normal) foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar outras dosagens bioquímicas (nitrito, mieloperoxidase, TBARS e dosagens de proteínas carboniladas).

Os cortes embebidos em parafina foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação do aspecto geral da lesão e com vermelho de picrossírius, sob microscopia de luz polarizada, para avaliar a densidade das fibras colágenas.

### **5.2.7 Parâmetros bioquímicos**

A concentração de proteína total foi determinada utilizando o método de Bradford.

Os níveis plasmáticos totais de colesterol (TC) e de triglicerídeos (TG) foram medidos através de um teste colorimétrico comercial (Bioclin) de acordo com as instruções do fabricante.

A dosagem de nitrito foi utilizada como um índice da síntese de óxido nítrico (ON), já que o nitrito é uma molécula estável, sendo responsável por mais de 90% do total dos metabólitos mensuráveis de ON, como descrito no item 5.1.9.

Para estimar o número de neutrófilos na área lesada, a dosagem da atividade de MPO no lisado dos fragmentos de lesão foi realizada de acordo com a Stark e colaboradores, com pequenas modificações, como descrito no item 5.1.9.

### **5.2.8 Dosagem de hidroxiprolina**

Como descrito no item 5.1.8.

### **5.2.9 Dosagem de malondialdeído (MDA)**

O método para quantificar o produto da reação às substâncias reativas ao ácido tiobasbitúrico (TBARS); como o malondialdeído (MDA), foi utilizado como índice de peroxidação lipídica, conforme descrito anteriormente no item 5.1.10.

### **5.2.10 Carbonilação proteica**

Como descrito no item 5.1.11.

### **5.2.11 Western blotting**

A expressão proteica do TGF- $\beta$  e do MCP-1 foi detectada através de imunoblotting. O lisado proteico (20  $\mu$ g) dos implantes de esponja PU desnaturado em tampão de amostra foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 10% (SDS-PAGE) e então, as proteínas foram então transferidas para a membrana de PVDF. O padrão de peso molecular foi incluído. As membranas foram bloqueadas por 30 minutos com Tween-PBS 0,05% contendo albumina de soro bovino 5% e incubadas overnight com os anticorpos primários policlonal anti-TGF- $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology) ou monoclonal anti-MCP-1 (Santa Cruz Biotechnology), a 4°C. As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário EnVision anti-coelho conjugado à peroxidase (DAKO) ou anti-camundongo conjugado à peroxidase (DAKO), respectivamente por uma hora. Os anticorpos ligados foram detectados por um kit de quimioluminescência (Pierce).

As membranas foram estripadas com um tampão de estripagem contendo  $\beta$ -mercaptoetanol (100 nM) e reincubadas para determinar a quantidade de  $\beta$ -actina. As intensidades das bandas foram normalizados pelas intensidades das bandas correspondentes de  $\beta$ -actina através de uma análise densitométrica. A densitometria foi realizada pelo programa Adobe Photoshop versão CS3 (Adobe Systems).

### **5.2.12 Imunomarcações e quantificações**

Para a quantificação da células NOS 2-positivas, macrófagos e neutrófilos, os cortes foram incubados com o anticorpo policlonal anti-NOS 2 (Santa Cruz

Biotechnology; Santa Cruz, CA), anticorpo monoclonal anti-F4/80 (Serotec) e com um anticorpo monoclonal anti-mieloperoxidase (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente, como descrito no item 5.1.7.

### **5.2.13 Imunofluorescências e quantificações**

Para a realização das imunofluorescências indiretas, os fragmentos de lesão foram devidamente congelados na temperatura ideal em Tissue-Tek. Cortes foram obtidos através do uso de um criostato e em seguida foram fixados em acetona - 20°C. Os cortes foram reidratados em tampão fosfato salina (PBS) e em seguida incubados com o anticorpo policlonal anti-Ly-6c ou arginase-1 (Arg-1) (Santa Cruz Biotechnology). Após a lavagem desses cortes, os anticorpos primários foram detectados usando o anticorpo anti-cabra Alexa Fluor 647 (Molecular Probes; Eugene, OR) ou o anti-receptor do fragmento C3bi do complemento (Cd11b) conjugado ao anti-rato Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; Eugene, OR). Os cortes foram montados com o auxílio do meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Laboratories; Burlingame, CA). Para quantificar as células duplamente marcadas para Cd11b e para Ly-6c- ou Arg-1-positivas, 15 campos aleatórios do tecido de granulação dos animais de ambos os grupos (55.000  $\mu\text{m}^2$ ) foram analisados utilizando uma objetiva de 60x. Os resultados são expressos como média de células-positivas/ $\text{mm}^2$ .

### **5.2.14 Isolamento e cultura de macrófagos da cavidade peritoneal**

Os macrófagos foram coletados dos animais de ambos os grupos por lavagem peritoneal. No dia da eutanásia foram injetados 2 ml de PBS gelado, contendo 10 U/ml de heparina (Sigma-Aldrich). As soluções injetadas foram imediatamente coletadas e seguida, centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados e as células restantes foram ressuspensas em DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (soro fetal de bovino) (Cultilab; Campinas, Brasil), e 1% de penicilina, estreptomicina e fungizona. Uma alíquota das células foi plaqueada em lâminas de vidro, e corada com Giemsa; entre todas as células aderidas, pelo menos, 70% eram de macrófagos. As células foram semeadas em

placas de 24 poços ( $1,0 \times 10^6$  células por poço) com DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina, estreptomicina e fungizona foram incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Os meios condicionados (MC) coletados dos macrófagos isolados de animais de ambos os grupos (RP e RHL) foram coletados 24 horas após o plaqueamento e em seguida congelados a -80°C (MCRP e MCRHL).

A viabilidade celular e ensaio de migração foram realizados a fim de avaliar os efeitos desses meios condicionados (MCRP e MCRHL) sobre células L929. Além disso, algumas análises de ELISA foram feitas com o objetivo de identificar quais foram as citocinas produzidas por macrófagos isolados da cavidade peritoneal de ambos os grupos.

### **5.2.15 Experimentos *in vitro***

Células L929 foram gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia. Veras (FIOCRUZ; Salvador, Brasil). As células foram semeadas em placas de 24 poços ( $1,0 \times 10^6$  células por poço) com DMEM suplementado com 10% de SFB durante 6 horas. Após 6 horas, o meio consumido foi descartado e todos os poços foram lavados com PBS e incubados durante a noite com DMEM suplementado com 0,5% de SFB e 1% de penicilina, estreptomicina e fungizona. Após este período, todos os poços foram lavados e tratados com os respectivos meios condicionados MCRP ou MCRHL a fim de realizar ensaios de viabilidade e de migração celular.

O método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difeniltetrazólio] avaliou a viabilidade das células L929 após o tratamento com os meios condicionados (MCRP ou MCRHL). Para isso, as células L929 foram semeadas em placa de 96 poços ( $3,0 \times 10^4$  células por poço) e incubadas com DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina, estreptomicina e fungizona, durante 6 horas. Após este período, o meio consumido foi substituído por meio DMEM suplementado com 0,5% de SFB e 1% de penicilina, estreptomicina e fungizona. A placa foi incubada durante toda a noite em estufa 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. O meio DMEM suplementado com 0,5% de SFB foi descartado, as células foram lavadas e em seguida, tratadas com os respectivos meios condicionados MCRP ou MCRHL durante 6 horas. Dez microlitros do reagente MTT (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada um dos poços. Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi

totalmente descartado e 100 µl de álcool isopropílico foi adicionado. A densidade óptica foi lida a 570 nm (Romana-Souza *et al.* 2010).

O ensaio de migração foi realizado para avaliar os efeitos destes meios condicionados de macrófagos isolados a partir da cavidade peritoneal de animais de ambos os grupos (RP e RHL) em células L929. Para isto, uma monocamada semi-confluyente de células L929 foi submetida a um arranhão linear com uma ponta de pipeta (amarela) e a migração para a área livre de células (sem células) foi monitorada após 6, 12 e 24 horas. A área livre de células foi medida usando o software ImageJ e os dados foram expressos como percentagem da área inicial livre de células (Romana-Souza *et al.* 2010).

### 5.2.16 ELISA

A quantidade de proteína TNF- $\alpha$  no plasma dos animais de ambos os grupos foi analisada através de um *kit* comercial para murinos (PeproTech; Rocky Hill, NJ). Além disso, os níveis proteicos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  bem como IL-10 foram quantificados nos meios condicionados coletados de macrófagos isolados de animais de ambos os grupos (MCRP e MCRHL). Para isto, utilizamos *kits* tais como: *kit* TNF- $\alpha$  de imunoensaio enzimático para murinos (PeproTech), *kit* IL-1 $\beta$  de imunoensaio enzimático para murinos e *kit* IL-10 de imunoensaio enzimático para murinos (R&D Systems; Minneapolis, MN). Todos os *kits* de ELISA foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.2.17 Estatística

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade. O teste estatístico utilizado na análise da massa corporal, Índice de Lee, viabilidade celular e ensaio de migração foi *one-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. O teste *t* não-pareado com correção de Welch foi utilizado para analisar a gordura retroperitoneal, a pressão sanguínea, as concentrações de glicose, a contração da lesão, os níveis totais de triglicerídeos e colesterol no plasma, hidroxiprolina, nitrito, MPO, a atividade de MDA, a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e MCP-1 e os resultados do ELISA. Já nas análises das densidades de miofibroblastos e vasos sanguíneos e do número de células NOS 2- e F4/80-positivas e neutrófilos

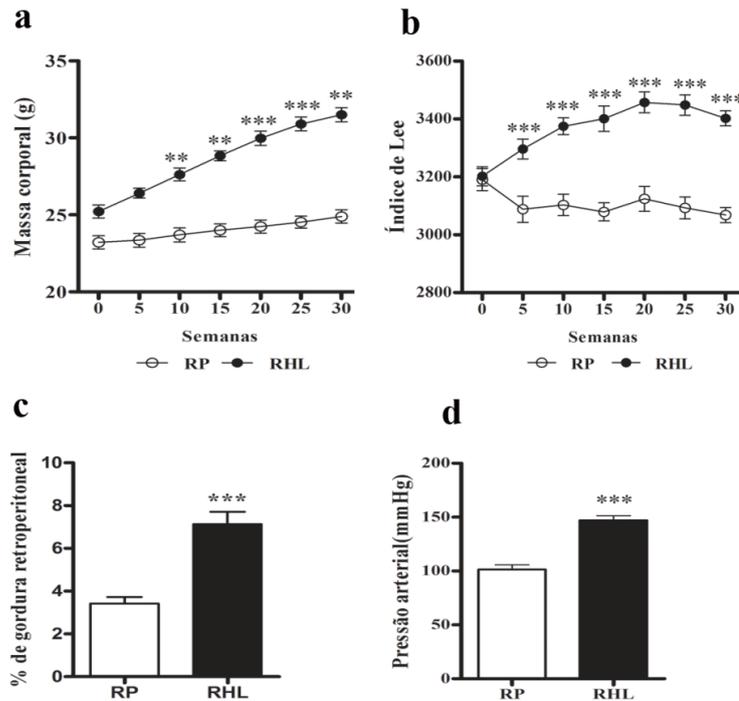
assim como as quantificações de células duplamente marcadas como Cd11b/Ly-6c-positivas ou Cd11b/Arg-1-positivas presentes na lesão foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prisma versão 5.03 (Software GraphPad; San Diego, CA), onde  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos

#### 6.1.1 Massa corporal, gordura retroperitoneal, Índice de Lee e pressão arterial

A média da massa corporal inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos (23,2 g $\pm$ 0,6 no grupo RP e 25,0 g $\pm$ 0,4 no grupo HLP). Durante a oitava semana de dieta, o grupo HLP apresentou maior massa corporal do que o grupo RP ( $P<0,05$ ; Fig. 3a) e assim se manteve por todo o período experimental (Fig. 3a). O Índice de Lee (equivalente do Índice de Massa Corporal para humanos) aumentou significativamente no grupo RHL, 5 semanas após o início da administração da dieta e permaneceu elevado até a 30<sup>a</sup> semana (13%;  $P<0,001$ ; Fig. 3b) quando comparado com o grupo RP. Essa análise pode explicar a grande quantidade de gordura observada no grupo RHL (Fig. 3c). A pressão arterial sistólica basal estava maior no grupo alimentado com ração hiperlipídica em relação ao grupo RP, no dia da realização da lesão (28<sup>a</sup> semana, dia 0), indicando hipertensão ( $P<0,001$ , Fig. 3d).



**Figura 3 - Análises metabólicas.** A massa corporal (a), Índice de Lee (b) a cada cinco semanas de dieta. A percentagem de gordura retroperitoneal (c) após 30 semanas de dieta e a pressão sanguínea sistólica (d) na 28ª semana (d0) do período experimental (RP e RHL; n=10, para cada grupo). RP; ração padrão e RHL; ração hiperlipídica. Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes dos da ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foi utilizado para análise da massa corporal e Índice de Lee, já o teste  $t$  não-pareado com correção de Welch foi utilizado para análise da gordura retroperitoneal e da pressão sanguínea).

### 6.1.2 Ganho de peso, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar

O aumento observado na massa corporal dos animais RHL pode ser explicado através do maior consumo energético (Tabela 1). O ganho de peso estava 300% maior no grupo RHL em relação ao grupo RP após 30 semanas de dieta ( $P < 0,001$ ; Tabela 3). Por outro lado o consumo energético (kJ) foi 28% maior no grupo RHL quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ; Tabela 3), entretanto as análises de consumo alimentar (g) apresentaram o mesmo padrão em ambos os grupos (Tabela 3). A eficiência alimentar (ganho de peso em gramas dividido por quilocalorias consumidas x 100) estava maior no grupo RHL do que no grupo RP ( $P < 0,001$ ). Todos os animais do grupo RHL toleraram a ração sem desenvolver qualquer sintoma físico.

**Tabela 3 - Ganho de peso total, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar nos grupos ração padrão (RP) e ração hiperlipídica (RHL)**

Grupos	RP	RHL
	Média ± EPM	Média ± EPM
Parâmetros analisados		
Ganho de peso total (g)	2,0 ± 0,2	8,0 ± 0,8***
Consumo alimentar (g/animal/d)	3,7 ± 0,03	3,6 ± 0,02
Consumo energético (kJ/animal/d)	60,0 ± 0,1	76,0 ± 0,1***
Eficiência alimentar (%)	0,1 ± 0,01	0,5 ± 0,02***

Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo.

Os valores médios foram significativamente diferentes dos da ração padrão (RP).

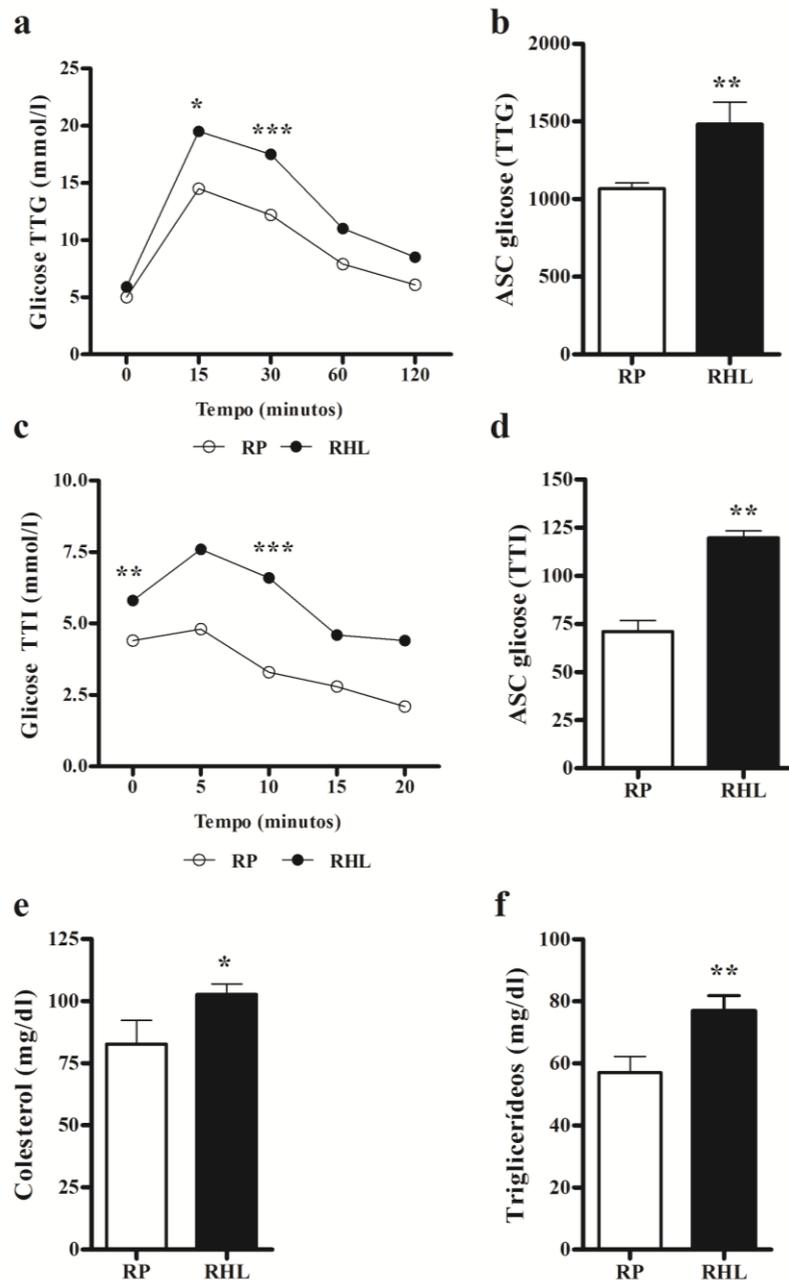
\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$

### 6.1.3 Glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Não observamos diferença na concentração de glicose avaliada após jejum (0 minutos, Fig. 4a) nos animais de ambos os grupos. Após o TTG, a taxa de glicose sistêmica estava maior no grupo RHL do que no RP (15 e 30 minutos, Fig. 4a) ( $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ ; respectivamente). O tempo total do teste para o decaimento da glicose estava era maior no grupo RHL em relação ao grupo RP; além disso, a área sobre a curva (ASC) entre 0 e 120 minutos para o TTG apresentava-se maior (38%) no grupo RHL, caracterizando esses animais como intolerantes à glicose ( $P < 0,01$ ; Fig. 4b).

Já o TTI demonstrou que a concentração de glicose estava elevada logo em seguida a injeção de insulina (0 minutos;  $P < 0,01$ ; Fig. 4c). Após 10 minutos da administração de insulina, a glicose sistêmica permaneceu maior no grupo RHL em relação ao grupo RP ( $P < 0,001$ ). A área sobre a curva (ASC) entre 0 e 20 minutos estavam maior (69%) no grupo RHL, indicando que os animais submetidos à ração hiperlipídica apresentam resistência à insulina ( $P < 0,01$ ; Fig. 4d).

Quanto às análises de colesterol e triglicerídeos totais realizadas no plasma dos animais de ambos os grupos 14 dias após a lesão; observamos que o grupo RHL apresentou maior (24%) concentração de colesterol total no plasma ( $P < 0,05$ ; Fig. 4e) quando comparamos com o grupo RP. Além disso, a concentração de triglicerídeos totais no plasma estava maior no grupo RHL em relação ao grupo RP ( $P < 0,01$ ; Fig. 4f). Essas análises também sugerem que a dieta hiperlipídica induz hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

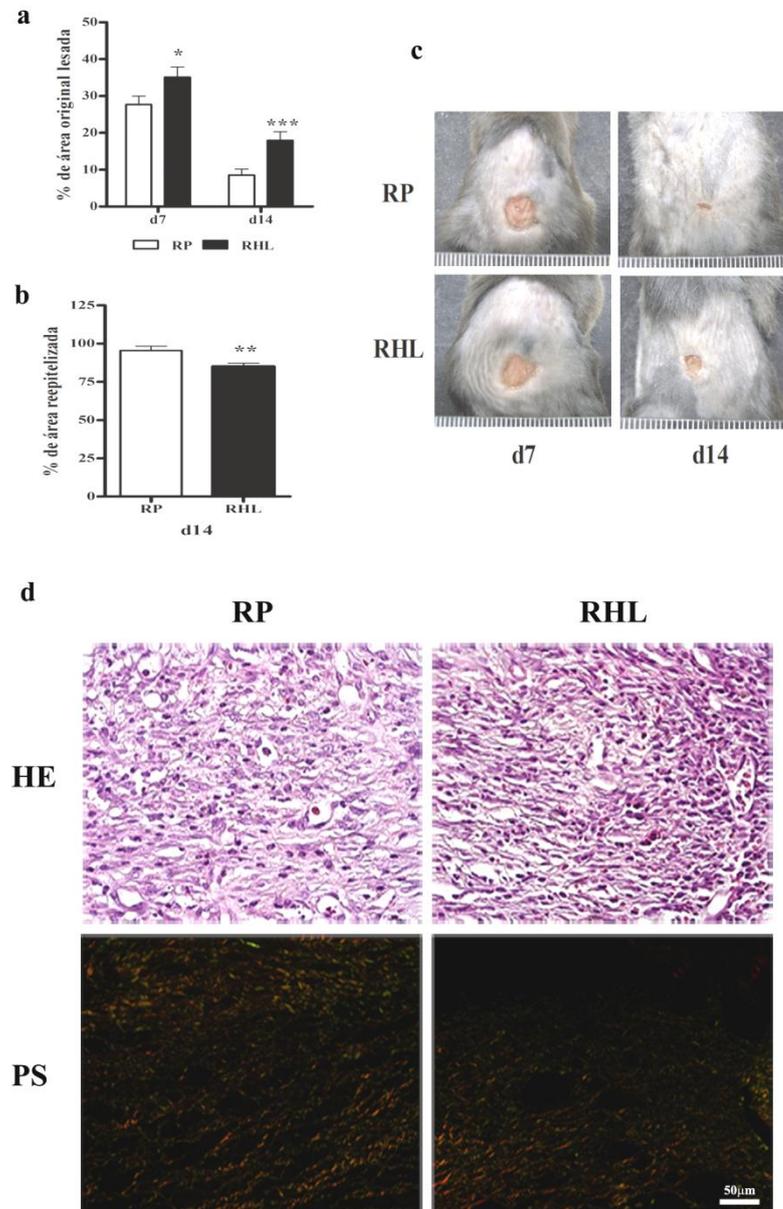


**Figura 4 – Análises bioquímicas.** Resposta da glicose no sangue para o TTG (a), área sobre a curva (ASC) do TTG (b), resposta da glicose no sangue para o TTI (c) e área sobre a curva (ASC) do TTI (d) (n=6; para cada grupo). Concentrações de colesterol total no plasma (e) e triglicerídeos (f) após 30 semanas de dieta. TTG, teste de tolerância à glicose (via oral). TTI, teste de tolerância à insulina (intraperitoneal). RP, ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

#### 6.1.4 Contração da lesão e reepitelização

Sete dias após a realização da lesão, a área da lesão estava 27% maior no grupo RHL e essa diferença aumenta para 110%, 14 dias após a lesão, em relação ao grupo RP ( $P<0,05$  e  $P<0,001$ , respectivamente; Fig. 5a, c). Os grupos não apresentaram sinais de reepitelização, 7 dias após a lesão. Porém, quatorze dias após a lesão o grupo RHL apresentou uma menor porcentagem (-11%) de área reepitelizada ( $P<0,01$ ; Fig. 5b). Tanto no grupo RP quanto RHL, observamos que a reepitelização não estava completa, 14 dias após a lesão. Essas análises corroboram com as análises macroscópicas, demonstrando retardo na contração e reepitelização tanto em 7 quanto 14 dias após a lesão nos animais submetidos à dieta hiperlipídica (Fig. 5c).

Quatorze dias após a realização da lesão, o grupo RP apresentou poucas células do infiltrado inflamatório (coloração com HE), fibroblastos e fibras do sistema colágeno, finas e alongadas no tecido de granulação em relação ao grupo RHL (Fig. 5d). Através dessas análises sob microscopia de luz polarizada observamos maior densidade das fibras do sistema colágeno no grupo RP em relação ao grupo RHL. No grupo RP, as fibras estavam vermelho-amareladas, alongadas, espessas e dispostas paralelamente à superfície. Já no grupo RHL, as fibras de colágeno estavam na sua grande maioria amarelo-esverdeadas, curtas, finas e dispostas aleatoriamente (Fig. 5d).



**Figura 5 - Avaliação da contração da lesão, reepitelialização, análises macroscópicas e microscópicas das lesões de ambos grupos.** Contração da lesão 7 e 14 dias após a lesão em ambos grupos (a), área reepitelializada 14 dias após a realização da lesão em ambos grupos (b), avaliação macroscópica das lesões 7 e 14 dias após a lesão em ambos grupos (c). Através das fotografias podemos observar menores lesões no grupo RP e retardo na reepitelialização no animais submetidos a dieta RHL. Análise histológica: Hematoxilina e Eosina (HE) e vermelho de picrosírius em ambos os grupos, 14 dias após a lesão (d). O infiltrado inflamatório estava discreto no grupo RP quando comparado com o grupo RHL. Quanto as análises de vermelho de picrosírius sob microscopia de luz polarizada observamos que as fibras colágenas estavam vermelho-amareladas, espessas e alongadas no grupo RP, enquanto que o grupo RHL apresentava por sua vez, fibras colágenas finas, curtas e amarelo-esverdeadas. (RP e RHL, n=10). RP; ração padrão e RHL; ração hiperlipídica. Os valores são médias com o seu erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

### 6.1.5 Análises bioquímicas

Com o intuito de confirmar a análise histológica das fibras do sistema colágeno, os níveis de hidroxiprolina foram quantificados, 14 dias após a lesão. O grupo RHL apresentou menor concentração (67%) de hidroxiprolina em relação ao grupo RP ( $P<0,05$ ; Tabela 4), confirmando a análise de histológica através da coloração com vermelho de picrossirius.

### 6.1.6 Peroxidação lipídica e proteínas carboniladas

A quantificação de TBARS e proteínas carboniladas foram analisadas com o intuito de obter um índice do dano oxidativo induzido pela ração padrão ou hiperlipídica. A peroxidação lipídica (dosagem de MDA) foi analisada 14 dias após a lesão em lisado de esponjas PU. Através da Tabela 4, observamos que o grupo RHL apresentou níveis elevados (+100%) de MDA quando comparado com o grupo RP ( $P<0,05$ ). Em relação as proteínas carboniladas (avaliadas em lisado de fragmentos de lesão) observamos que o grupo RHL apresentou 800% a mais de carbonilação proteica do que o grupo RP ( $P<0,001$ ; Tabela 4). Concluimos com esses dados que a dieta hiperlipídica é capaz de aumentar o dano tecidual quando comparada com a dieta padrão.

**Tabela 4. Análises bioquímicas**

Grupos	RP	RHL
	Média± EPM	Média±EPM
Hidroxiprolina (ng/mg)	6,0±1,0	2,0±0,2*
MPO (mU /mg)	1,0±0,5	1,5±0,6**
TBARS (nM/μg)	0,18±0,07	0,36±0,02*
Proteínas carboniladas (mmol/mg)	0,24x10 <sup>-3</sup> ±1,7x10 <sup>-5</sup>	2,2x10 <sup>-3</sup> ±5,5x10 <sup>-5***</sup>

MPO, mieloperoxidase; TBARS; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; RP, ração padrão; RHL, ração hiperlipídica.

Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo.

Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP).

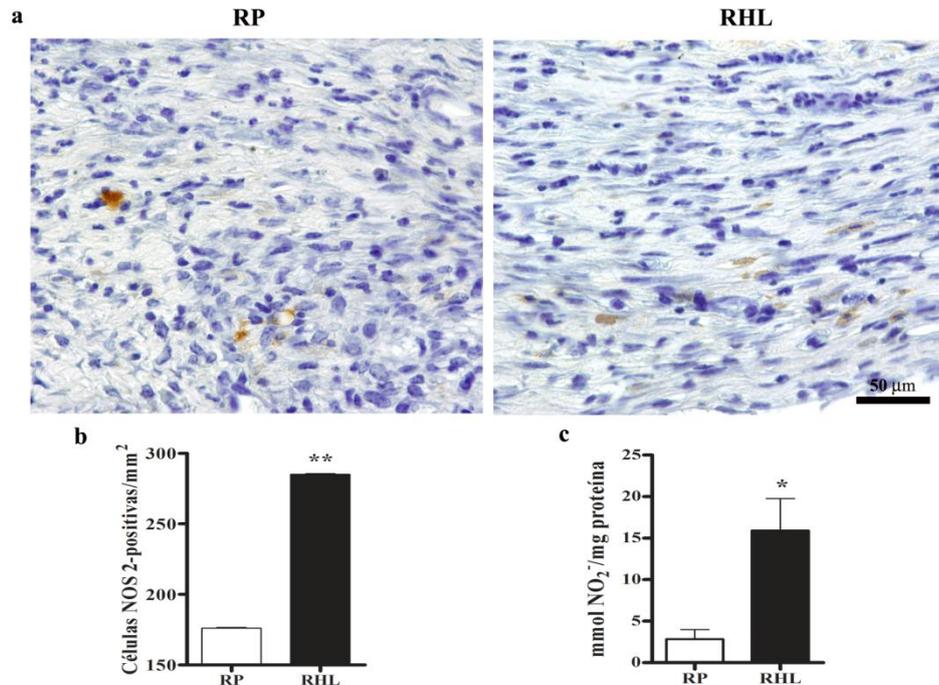
\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$  e \*\*\* $P<0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

### 6.1.7 Quantificação do infiltrado inflamatório

As fotomicrografias obtidas que representam as células inflamatórias em ambos os grupos estão apresentadas na Figura 6a. Já se sabe, que a NOS 2 é a principal enzima envolvida na produção de ON no tecido de granulação. Com o intuito de confirmar a dosagem de nitrito realizamos a quantificação de células NOS 2-positivas. O grupo RHL apresentou maior número de células NOS 2-positivas (62%) quando comparado com o grupo RP, 14 dias após a lesão ( $P<0,01$ ; Fig. 6b).

As análises de nitrito foram utilizadas como um índice de óxido nítrico já que o nitrito é uma molécula estável, sendo responsável por mais de 90% do nitrito e nitrato totais mensuráveis (Schaffer *et al.* 1997). Quatorze dias após a lesão, os níveis de nitrito estavam maiores (+400%) no grupo RHL do que no grupo RP ( $P<0,001$ ; Fig. 6c).

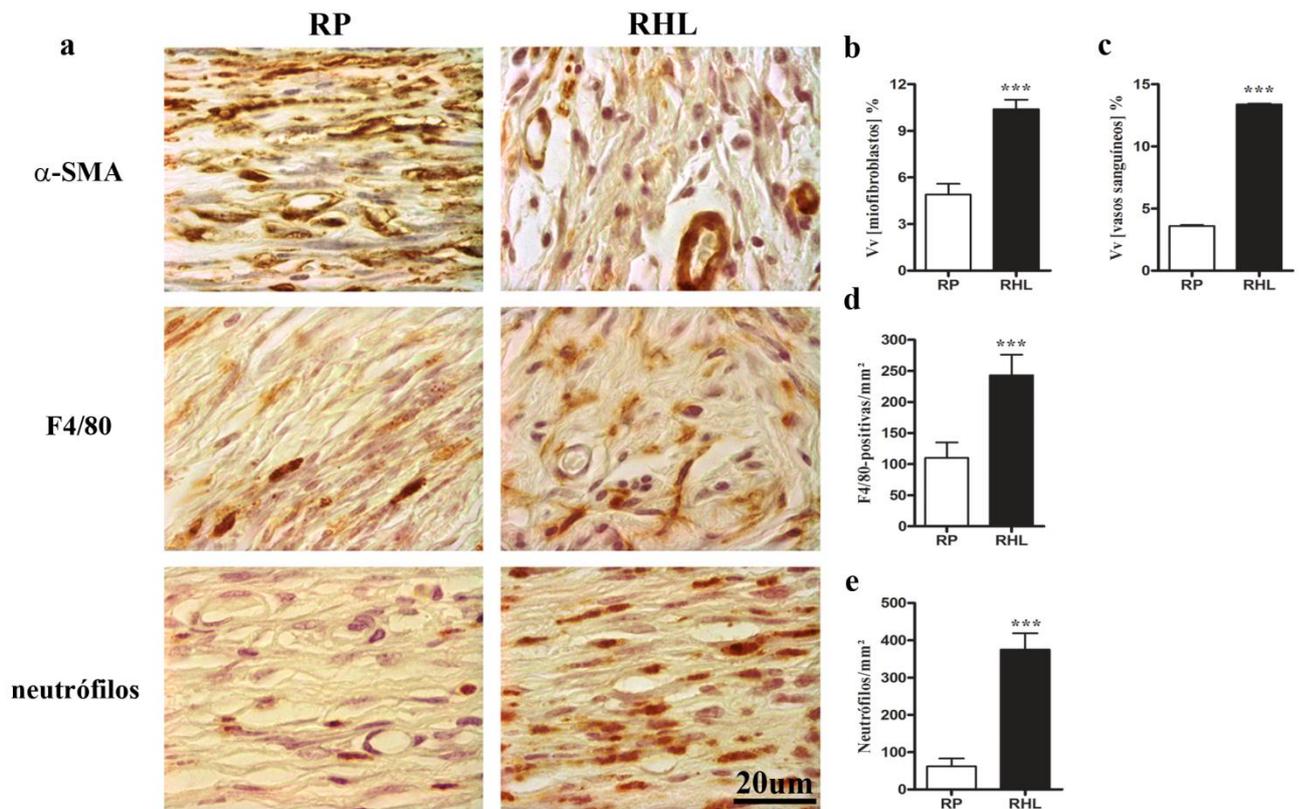
Além disso, realizamos a quantificação de macrófagos e neutrófilos através da contagem de células positivas para F4/80 e mieloperoxidase, respectivamente (Fig. 7a). O grupo RHL apresentava maior número de macrófagos e neutrófilos, quando comparado com o grupo RP ( $P<0,001$ ; Fig. 7d, e). A atividade de MPO foi analisada 14 dias após a lesão, com o objetivo de confirmar a análise histológica do infiltrado inflamatório. A atividade de MPO estava 62% maior no grupo RHL ( $P<0,01$ ; Tabela 4). Esta análise corrobora com os dados histológicos em relação a quantificação de neutrófilos (Fig. 7a, e).



**Figura 6 – Análise histológica e quantificação das células NOS 2-positivas e dosagem dos níveis de nitrito.** Imunohistoquímica contra células NOS 2-positivas (a) 14 dias após a realização da lesão tanto no grupo RP quanto no RHL. Dados das quantificações das células NOS 2-positivas (b) e dosagem de nitrito (d). Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo. RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP). \*\*\* $P < 0,001$  (teste não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado na quantificação das células NOS 2-positivas e teste  $t$  não-pareado com correção de Welch foi utilizado na dosagem de nitrito). Barra de escala = 20 μm.

### 6.1.8 Análise estereológica

As fotomicrografias obtidas dos miofibroblastos encontrados no tecido de granulação de ambos os grupos estão apresentados na Figura 7a. A densidade de volume foi utilizada para determinar o volume ocupado pelos miofibroblastos em cada grupo. A densidade de miofibroblastos observada no grupo RHL estava maior (140%) do que no grupo RP 14 dias após a realização da lesão ( $P < 0,001$ ; Fig. 7a). Já as fotomicrografias retiradas representando os vasos sanguíneos em ambos os grupos estão apresentados na Figura 7b. O volume ocupado pelos vasos sanguíneos presente no tecido de granulação dos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica estava maior (330%) em comparação com o grupo RP 14 dias após a lesão ( $P < 0,001$ ; Fig. 7b).

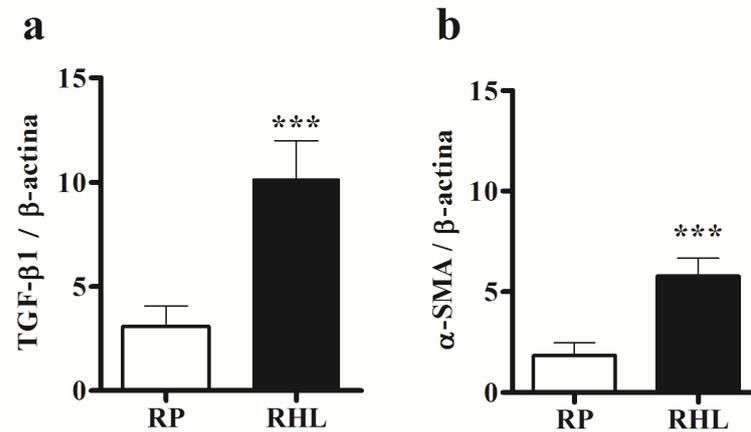


**Figura 7 – Imunohistoquímica e quantificações.** Imunohistoquímica contra células  $\alpha$ -SMA-positivas, F4/80-positivas e neutrófilos (a) 14 dias após a realização da lesão tanto no grupo RP quanto no RHL. A densidade de volume dos miofibroblastos (b) e vasos sanguíneos (c) do tecido de granulação nos grupos RP e RHL. Os dados das quantificações de macrófagos (d) neutrófilos (e). Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo. RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP). \*\*\* $P < 0,001$  (teste não-paramétrico Mann-Whitney). Barra de escala = 20  $\mu$ m.

### 6.1.9 Expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 e $\alpha$ -SMA

Quatorze dias após a realização da lesão, a expressão proteica de TGF-  $\beta$ 1 estava maior (220%) nas esponjas de PU que foram implantadas nos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica ( $P < 0,001$ ; Fig. 8a).

A expressão proteica de  $\alpha$ -SMA foi quantificada com o intuito de confirmar a análise histológica realizada através da imunohistoquímica contra  $\alpha$ -SMA (diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e vasos sanguíneos). O grupo RHL apresentou maior expressão proteica de  $\alpha$ -SMA (210%) quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 8b).

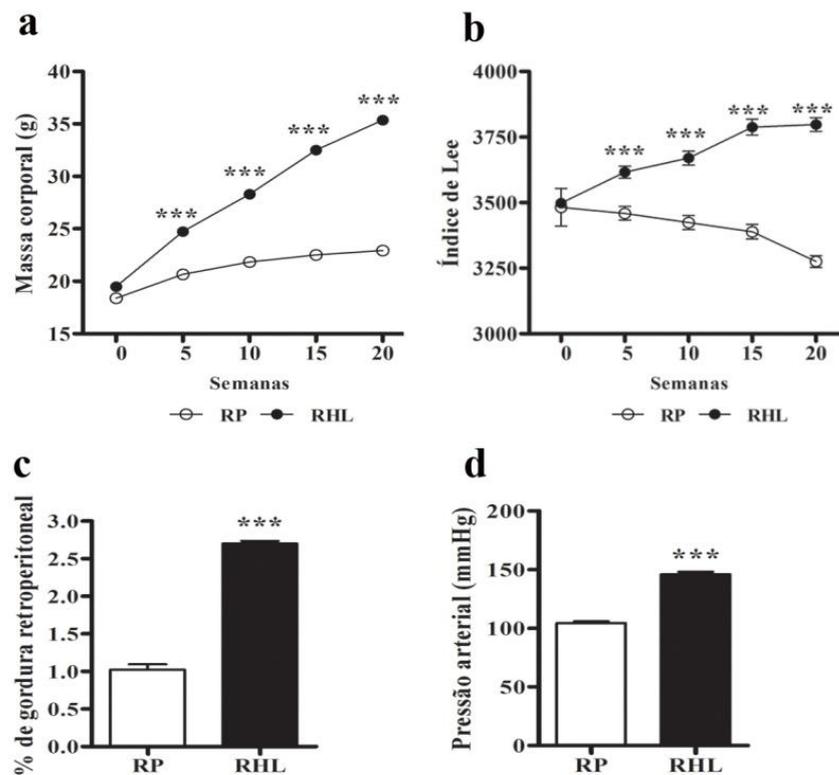


**Figura 8 – Expressão proteica de TGF-β1 e α-SMA.** A expressão proteica do fator de crescimento transformante-β1 (TGF-β1) (a) e da α-actina de músculo liso (α-SMA) (b) nos grupos RP e RHL 14 dias após a lesão. Densitometria é expressa em unidades arbitrárias (UA). Os dados são expressos como a média ± EPM. RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP). \*\*\* $P < 0,001$  (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

## **6.2. Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina**

### **6.2.1 Massa corporal, gordura retroperitoneal, Índice de Lee e pressão arterial**

A média da massa corporal inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos (18,4 g  $\pm$  0,4 no grupo RP e 19,5 g  $\pm$  0,5 no grupo RHL). Após 5 semanas de dieta, os animais do grupo RHL apresentam massa corporal superior ao grupo RP, e esse padrão foi mantido durante todo o período de dieta (20 semanas) ( $P < 0,01$ ; Fig. 9a). O Índice de Lee (equivalente do Índice de Massa Corporal para humanos) aumentou significativamente no grupo RHL 5 semanas após o início da administração da dieta e permaneceu elevado até a 20<sup>a</sup> semana ( $P < 0,001$ ; Fig. 9b) quando comparado com o grupo RP. Essa análise pode explicar a grande quantidade de gordura retroperitoneal observada no grupo RHL em relação ao grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 9c). A pressão arterial sistólica basal estava maior no grupo alimentado com ração hiperlipídica em relação ao grupo RP no dia da realização da lesão (19<sup>a</sup> semana, dia 0), indicando hipertensão ( $P < 0,001$ ; Fig. 9d).



**Figura 9 - Alterações metabólicas.** A massa corporal (a), Índice de Lee (b) a cada cinco semanas de dieta. A percentagem de gordura retroperitoneal (c) após 20 semanas de dieta e a pressão sanguínea sistólica (d) na 19ª semana (d0) do período experimental (RP e RHL; n=20, para cada grupo). RP; ração padrão e RHL; ração hiperlipídica. Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes dos da ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foi utilizado para análise da massa corporal e Índice de Lee, já o teste  $t$  não-pareado com correção de Welch foi utilizado para as outras análises.

### 6.2.2 Ganho de peso, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar

O aumento observado na massa corporal dos animais RHL pode ser explicado através da densidade (alta) de gordura (Tabela 5), por outro lado o consumo energético (kJ) foi 28% maior no grupo RHL quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ), entretanto as análises de consumo alimentar (g) apresentaram o mesmo padrão em ambos os grupos (Tabela 5). A eficiência alimentar (ganho de peso em gramas dividido por quilocalorias consumidas x 100) estava maior no grupo RHL do que no grupo RP ( $P < 0,001$ ; Tabela 5). Todos os animais do grupo RHL toleraram a ração sem desenvolver qualquer sintoma físico.

**Tabela 5 - Ganho de peso total, consumo alimentar e energético e eficiência alimentar nos grupos ração padrão (RP) e ração hiperlipídica (RHL)**

Grupos	RP	RHL
Parâmetros analisados	Média ± EPM	Média ± EPM
Ganho de peso total (g)	4,5 ± 0,2	15,8 ± 0,3***
Consumo alimentar (g/animal/d)	3,1 ± 0,01	2,9 ± 0,01
Consumo energético (kJ/animal/d)	47,3 ± 0,04	67,4 ± 0,04***
Eficiência alimentar (%)	0,1 ± 0,01	0,83 ± 0,02***

Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 20 animais por grupo.

Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão (RP).

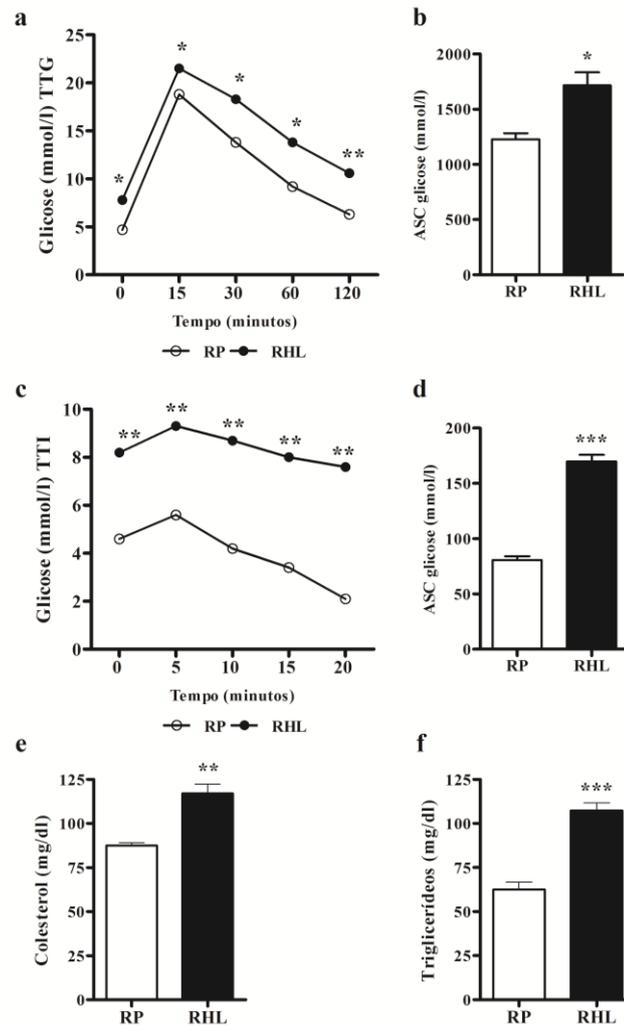
\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$

### 6.2.3 Metabolismo glicêmico e análises bioquímicas

A concentração de glicose sistêmica estava maior nos animais do grupo RHL do que no grupo RP (Fig. 10a). Após o TTG, a área sobre a curva (ASC) entre 0 e 120 minutos estava 40% maior no grupo RHL ( $P < 0,01$ ; Fig. 10b), caracterizando esses animais como intolerantes à glicose.

O TTI demonstrou que a concentração de glicose no grupo RHL estava elevada em relação ao grupo RP logo em seguida a injeção de insulina (0 minutos;  $P < 0,01$ ; Fig. 10c). A área sobre a curva (ASC) entre 0 e 20 minutos após o TTI estava 110% maior no grupo RHL ( $P < 0,01$ ; Fig. 10d), indicando que os animais após 20 semanas sendo submetidos a ração hiperlipídica tornam-se resistentes à insulina.

Quanto às análises de colesterol e triglicerídeos totais realizadas no plasma dos animais de ambos os grupos 7 dias após a lesão; observamos que o grupo RHL apresentou maior concentração de colesterol total (34%) em relação ao grupo RP ( $P < 0,01$ ; Fig. 10e). Além disso, a concentração de triglicerídeos totais estava 72% maior no grupo RHL quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 10f). Essas análises sugerem que a dieta hiperlipídica induz hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

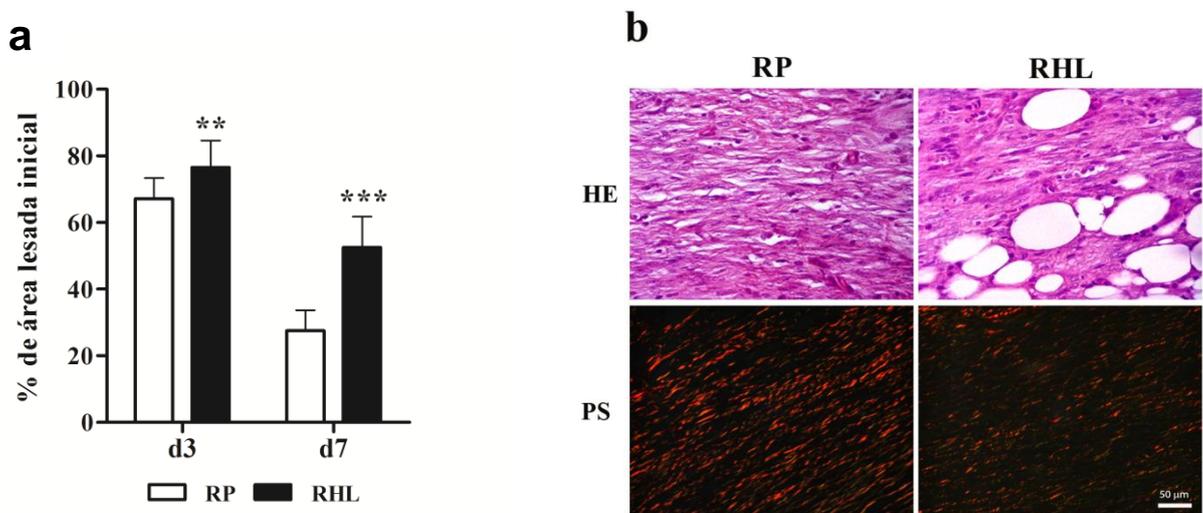


**Figura 10 – Metabolismo glicêmico e análises bioquímicas.** Resposta da glicose no sangue para o TTG (a), área sobre a curva (ASC) do TTG (b), resposta da glicose no sangue para o TTI (c) e área sobre a curva (ASC) do TTI (d) (n=6; para cada grupo), concentrações de colesterol total no plasma (e) e triglicerídeos (f) após 20 semanas de dieta. TTG, teste de tolerância à glicose (via oral). TTI, teste de tolerância à insulina (intraperitoneal). RP; ração padrão e RHL; ração hiperlipídica. Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes dos da ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

#### 6.2.4 Contração da lesão e análise histológica

Três dias após a realização da lesão, a área da lesão estava 14% maior no grupo RHL e essa diferença aumenta para 91%, 7 dias após a lesão, em relação ao grupo RP ( $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente; Fig. 11a). Nem mesmo 7 dias após a realização da lesão, nenhum dos grupos apresentou sinais de reepitelização.

A análise histológica foi realizada para observarmos alguns aspectos gerais no tecido de granulação de ambos os grupos. Sete dias após a lesão, o grupo RP apresentou poucas células inflamatórias e fibroblastos (coloração com HE) em relação ao grupo RHL (Fig. 11b). De maneira surpreendente, os animais do grupo RHL apresentaram muitos adipócitos (Fig. 11b). No grupo RP, as fibras estavam vermelho-amareladas, alongadas, espessas e dispostas paralelamente à superfície. Já no grupo HFC, as fibras de colágeno estavam amarelo-esverdeadas, curtas e finas (Fig.11b). Através dessas análises sob microscopia de luz polarizada observamos maior organização e densidade das fibras do sistema colágeno no grupo RP em relação ao grupo RHL, indicando um atraso na síntese e remodelamento da matriz extracelular nos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica.



**Figura 11 - Avaliação da contração da lesão e microscópicas das lesões de ambos grupos.** Contração da lesão 3 e 7 dias após a lesão em ambos grupos (a). Análise histológica: Hematoxilina e Eosina (HE) e pricosírius red em ambos os grupos, 7 dias após a lesão (b). O infiltrado inflamatório estava discreto no grupo RP quando comparado com o grupo RHL. Quanto a análise do vermelho de pricosírius sob microscopia de luz polarizada observamos que as fibras colágenas estavam vermelho-amareladas, espessas e alongadas no grupo RP, enquanto que o grupo RHL apresentava por sua vez, fibras colágenas finas, curtas e amarelo-esverdeadas. (RP e RHL, n=20). RP; ração padrão e RHL; ração hiperlipídica. Os valores são médias com o seu erro padrão da média (EPM). Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão (RP). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

### 6.2.5 Parâmetros bioquímicos

A expressão de TNF- $\alpha$  no plasma estava 150% maior nos animais submetidos à uma dieta hiperlipídica em relação ao grupo RP ( $P<0,001$ ; Tabela 6).

As análises de nitrito foram utilizadas como um índice de óxido nítrico já que o nitrito é uma molécula estável, sendo responsável por mais de 90% do nitrito e nitrato totais mensuráveis (Schaffer *et al.* 1997). Sete dias após a lesão, os níveis de nitrito estavam maiores (270%) no grupo RHL do que no grupo RP ( $P<0,001$ ; Tabela 6).

Com o intuito de confirmar a análise histológica das fibras do sistema colágeno através da coloração de vermelho de picrossírius, os níveis de hidroxiprolina foram avaliados 7 dias após a realização da lesão em ambos os grupos. Os níveis de hidroxiporlina estavam 250% maior no grupo RP em relação ao grupo RHL ( $P<0,01$ ; Tabela 6).

### 6.2.6 Peroxidação lipídica e carbonilação proteica

A quantificação de TBARS e proteínas carboniladas foram analisadas com o intuito de obter um índice do dano oxidativo induzido pela ração padrão ou hiperlipídica. A peroxidação lipídica (dosagem de MDA) foi analisada 7 dias após a lesão, em lisado de fragmentos de lesões de ambos os grupos. Como mostrado na Tabela 6, o grupo RHL apresentou níveis elevados (+350%) de MDA quando comparado com o grupo RP ( $P<0,01$ ). Em relação as proteínas carboniladas (também avaliadas em lisado de fragmentos de lesão) observamos que o grupo RHL apresentou 130% a mais de carbonilação proteica do que o grupo RP ( $P<0,05$ ; Tabela 6). Através desses dados podemos sugerir que a dieta hiperlipídica é capaz de aumentar o dano oxidativo quando comparada com a dieta padrão.

**Tabela 6 - Parâmetros bioquímicos**

Grupos	RP	RHL
	Média ± EPM	Média ± EPM
Parâmetros		
TNF- $\alpha$ plasmática	2920,0 ± 410,0	7480,0 ± 418,0***
Nitrito (mmol/mg)	4,0 ± 0,3	15,1 ± 1,0**
Hidroxi prolina (ng/mg)	2,1 ± 0,3	0,6 ± 0,1**
MPO (mU/mg)	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1**
TBARS (nM/ $\mu$ g)	2,8 ± 0,4	13,8 ± 2,4**
Carbonilação de proteínas (mmol/mg)	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2*

MPO, mieloperoxidase; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; RP, ração padrão; RHL, ração hiperlipídica.

(Os valores são médias com o erro padrão da média (EPM) de 20 animais por grupo)

Os valores médios foram significativamente diferentes em relação a ração padrão (RP).

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

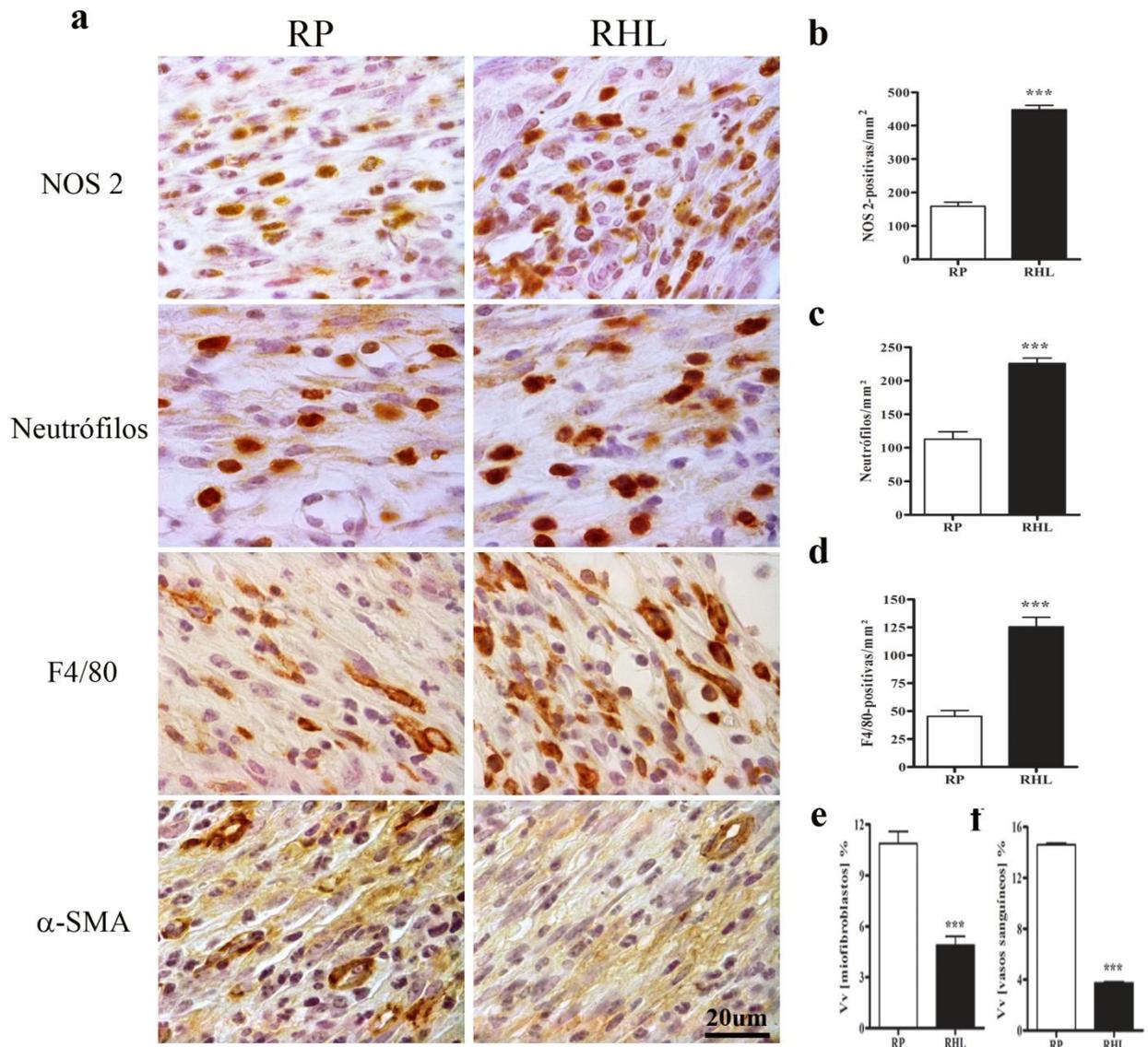
### 6.2.7 Quantificação das células inflamatórias

As fotomicrografias obtidas sobre as células inflamatórias são apresentadas na Figura 12a. Já se sabe, que a NOS 2 é a principal enzima envolvida na produção de ON no tecido de granulação, com o intuito de confirmar a dosagem de nitrito realizamos a quantificação das células NOS 2-positivas. O número de células NOS 2-positivas estava 170% maior grupo RHL em relação ao grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 12b).

Além disso, a quantificação de neutrófilos e macrófagos foi realizada através da contagem de células positivas para mieloperoxidase e F4/80, respectivamente (Fig. 12a). O grupo RHL apresentava maior número de neutrófilos e células F4/80-positivas quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 12c, d; respectivamente). Além disso, a atividade de MPO foi analisada 7 dias após a lesão, com o objetivo de confirmar a análise histológica em relação ao infiltrado inflamatório. A atividade de MPO estava maior no grupo RHL ( $P < 0,001$ ; Tabela 6). Esta análise corrobora com os dados histológicos em relação a quantificação de neutrófilos (Fig. 12a, c).

### 6.2.8 Estereologia

As fotomicrografias obtidas dos miofibroblastos e vasos sanguíneos encontrados no tecido de granulação de ambos os grupos estão apresentados na Figura 12a. A densidade de volume foi utilizada para determinar o volume ocupado pelos miofibroblastos em cada grupo. A densidade de miofibroblastos observada no grupo RHL estava maior (120%) do que no grupo RP, 7 dias após a realização da lesão ( $P < 0,001$ ; Fig. 12e). O volume ocupado pelos vasos sanguíneos presente no tecido de granulação dos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica estava maior (280%) em comparação com o grupo RP, 7 dias após a lesão ( $P < 0,001$ ; Fig. 12f).

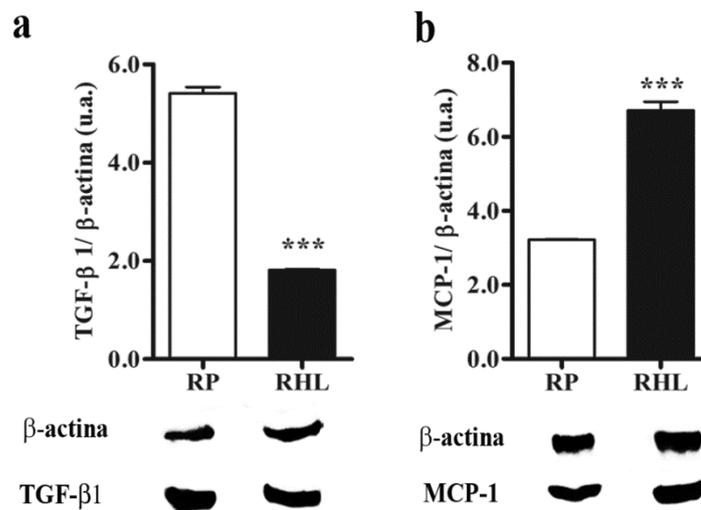


**Figura 12 – Imunomarcações e quantificações.** Imunohistoquímica contra células NOS 2-positivas, neutrófilos, células F4/80-positivas e  $\alpha$ -SMA (a) 7 dias após a realização da lesão tanto no grupo RP quanto no RHL. Os dados das quantificações das células NOS 2-positivas (b) de neutrófilos (c) células F4/80-positivas (d). A densidade de volume dos miofibroblastos (e) e vasos sanguíneos (f) do tecido de granulação nos grupos RP e RHL. Os valores apresentados são médias com o erro padrão da média (EPM) de 20 animais por grupo. RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão (RP). \*\*\* $P < 0,001$  (teste não-paramétrico Mann-Whitney). Barra de escala = 20  $\mu$ m.

### 6.2.9 Western blotting

Sete dias após a realização da lesão, a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 estava maior (200%) nas esponjas de PU que foram implantadas nos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica ( $P < 0,001$ ; Fig. 13a).

A expressão proteica de MCP-1 foi analisada para confirmar a análise histológica realizada através da imunohistoquímica contra F4/80 (específico para macrófagos de camundongos). O grupo RHL apresentou maior expressão proteica de MCP-1 (110%) quando comparado com o grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 13b).

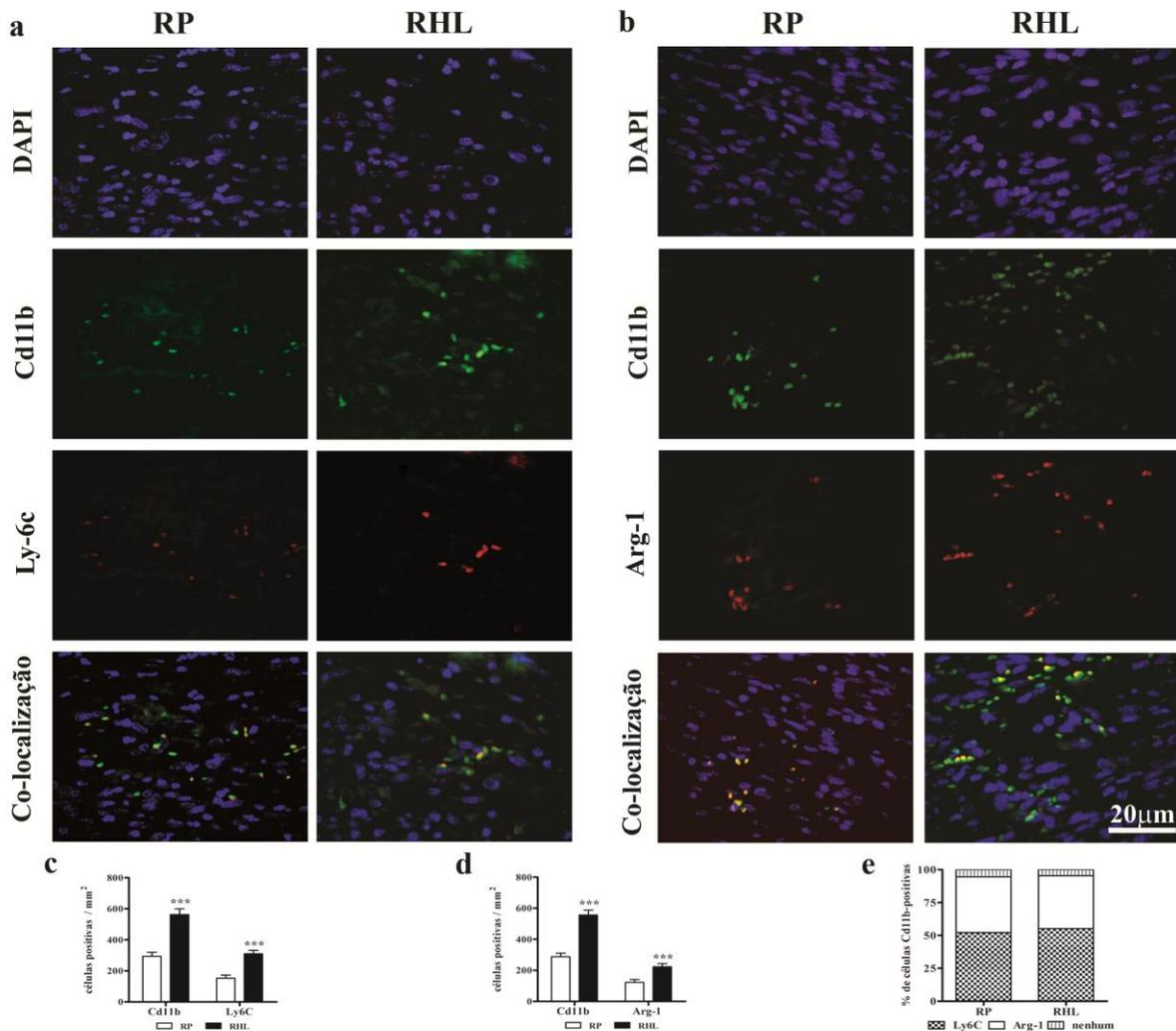


**Figura 13 - Western blotting.** Expressões proteicas do factor de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (a) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (b) nos grupos RP e RHL 7 dias após a lesão. Densitometria é expressa em unidades arbitrárias (UA). Os dados são expressos como a média  $\pm$  EPM. RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão (RP). \*\*\* $P < 0,001$  (teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

### 6.2.10 Identificação e quantificação dos tipos de macrófagos

O Cd11b é amplamente utilizado como um marcador de macrófagos independente dos fenótipos (Lucas *et al.* 2010). Para caracterizar fenotipicamente os macrófagos presentes no tecido de granulação 7 dias após a realização da lesão, as expressões de Cd11b/Ly-6c ou Cd11b/Arg-1 foram analisadas, já que esses marcadores foram previamente descritos como confiáveis para macrófagos classicamente ou alternativamente ativados (M1 e M2), respectivamente (Misson *et al.* 2004). Através da co-localização observamos que os macrófagos Cd11b-positivos que expressam Ly-6c ou Arg-1 estavam presentes nas no tecido de granulação de

ambos grupos. O grupo RHL apresentou maior quantidade de macrófagos Cd11b/Ly-6c-positivos e Cd11b/Arg-1-positivos quando comparado com grupo RP ( $P < 0,001$ ; Fig. 14c, d; respectivamente). Isto é de maneira surpreendente, sete dias após a realização da lesão, a proporção de macrófagos Cd11b/Ly-6c-positivos e Cd11b/Arg-1-positivos foi semelhante nos dois grupos (Fig. 14e).

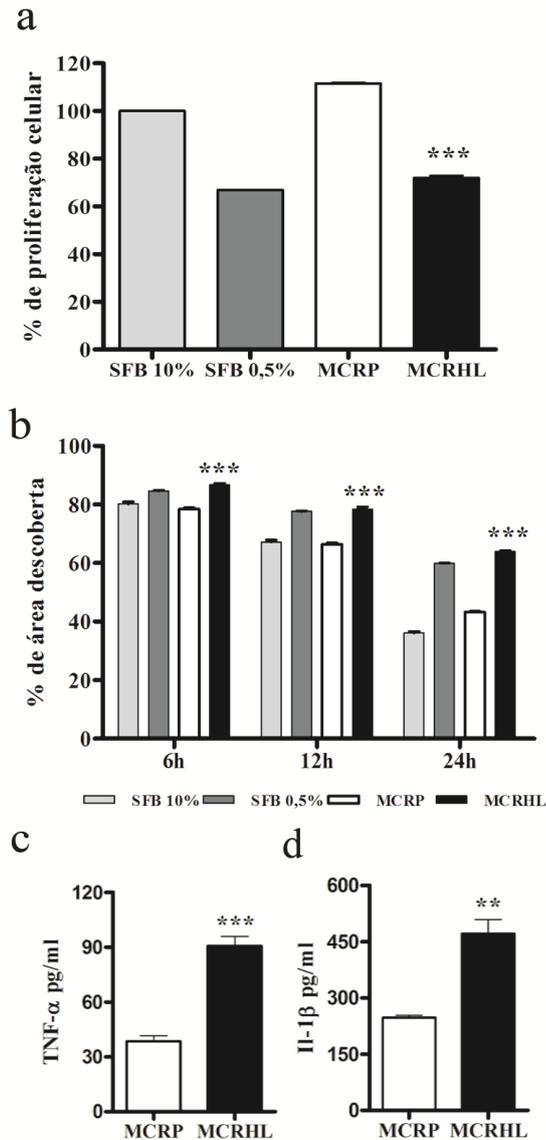


**Figura 14 – Identificação e quantificação dos fenótipos de macrófagos de lesão.** Dupla marcação para células Cd11b/Ly-6c-positivas (a) ou as células Cd11b/Arg-1-positivas (b) 7 dias após a lesão nos grupos RP e RHL. As quantificações das células Cd11b/Ly-6c-positivas (c) e Cd11b/Arg-1-positivas (d) em ambos os grupos. A proporção dos fenótipos de macrófagos de lesões em ambos os grupos (e). Os valores apresentados são médias com o erro padrão da média (EPM). RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão: \*\*\*  $P < 0,001$  (teste não-paramétrico Mann-Whitney). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.11 Ensaio *in vitro*

Uma vez que não foram observadas alterações em populações de macrófagos Cd11b-positivos que expressam Ly-6c ou Arg-1 no tecido de granulação dos animais de ambos grupos, foram realizados ensaios *in vitro* a fim de avaliar se os factores solúveis, produzidos por macrófagos isolados a partir da cavidade peritoneal dos animais de ambos grupos podem ter efeitos sobre os fibroblastos (células cruciais para o processo de cicatrização cutânea).

A taxa de proliferação celular estava maior em células L929 tratadas com meio condicionado recolhido a partir de macrófagos isolados do grupo RP (MCRP), quando comparado com RHL (MCRHL) ( $P < 0,05$ ; Fig. 15a). Além disso, o tratamento com MCRP aumenta acentuadamente a taxa de migração de fibroblastos em 6, 12 e 24 horas, quando comparado com o tratamento com MCRHL ( $P < 0,05$ ; Fig. 15b). Os níveis de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  estavam mais elevados (135% e 90%; respectivamente) no MCRHL do que no MCRP ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ ; respectivamente) (Fig. 15c, d). Proteína IL-10 não foi detectada no MCRHL, e foi detectada no MCRP, mas os níveis estavam abaixo do primeiro ponto da curva padrão.



**Figura 15 – Análise dos experimentos *in vitro*.** Avaliação da proliferação celular (a) ensaio de migração (b) das células L929 tratadas com meio condicionado coletado de macrófagos isolados a partir da cavidade peritoneal dos animais dos grupos RP (MCRP) e RHL (MCRHL). Dosagens das proteínas TNF- $\alpha$  (c) e IL-1 $\beta$  (d) foram medidas no MCRP e MCRHL através dos kits comerciais de ELISA. A percentagem proliferativa das L929 (a), quando tratadas com MCRP foi superior quando comparada com com MCRHL. Os valores apresentados são médias com o erro padrão da média (EPM). MCRP, meio condicionado coletado de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais do grupo ração padrão. MCRHL, meio condicionado coletado de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais do grupo RHL. Os valores médios foram significativamente diferentes do grupo ração padrão: \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ . RP; ração padrão. RHL, ração hiperlipídica. (one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foi utilizado para as análises da proliferação celular e do ensaio de migração. Para as outras análises utilizamos o teste  $t$  não-pareado com correção de Welch).

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Resistência à insulina prejudica o reparo tecidual cutâneo em camundongos

A prevalência da obesidade diminui dramaticamente a esperança de vida devido a diabetes e hipertensão (Zeyda & Stulnig 2009). No presente estudo, os experimentos foram realizados com o intuito de simular estas condições. A obesidade, a resistência à insulina e a hipertensão foram induzidas por uma dieta hiperlipídica em camundongos C57Bl/6 adultos, e seus efeitos foram investigados em relação a contração da lesão, reepitelização, infiltrado inflamatório, formação de tecido de granulação e neovascularização.

O nosso estudo demonstra claramente que a resistência à insulina, a obesidade e a hipertensão comprometem o processo de reparo da lesão excisional cutânea, atrasando a contração, a reepitelização da lesão e a formação de tecido de granulação, prolongando a fase inflamatória, aumentando os níveis de peroxidação lipídica e a expressão TGF- $\beta$  e prejudicando neovascularização.

Estudos anteriores demonstraram que a obesidade resulta de um desequilíbrio crônico entre a ingestão de alimentos e o gasto de energia (Oscari *et al.* 1984). Estes dados corroboram com os nossos resultados, já que o grupo de RHL apresentou um maior consumo de energia e não houve diferença no consumo de alimentos entre os grupos experimentais. Além disso, o Índice de Lee (equivalente a IMC em humanos) mostrou que a administração da RHL induz a obesidade. A resistência à insulina é estritamente associada com outras anormalidades metabólicas culminando na síndrome metabólica. Entre elas, as mais importantes estão relacionadas com o metabolismo de lipoproteínas e são caracterizadas principalmente por elevadas taxa de triglicerídeos e colesterol (Riccardi *et al.* 2004). Os nossos resultados demonstraram que os níveis de triglicerídeos e de colesterol no grupo RHL estavam elevados em comparação com o grupo RP, confirmando a indução da síndrome metabólica.

Embora a menor deposição de colágeno nas lesões de animais diabéticos esteja associada à redução da síntese de óxido nítrico (ON) nessas lesões (Schaffer *et al.* 1997), os resultados observados no nosso estudo apresentam níveis elevados de nitrito e de células NOS 2-positivas no grupo RHL em comparação com o grupo

RP. Estes resultados podem ser explicados pela maior quantidade de infiltrado inflamatório presente no grupo RHL, sugerindo que as células, tais como macrófagos, que sintetizam óxido nítrico, e a produção excessiva de ON prejudicam a deposição de colágeno.

Logo após a lesão, os neutrófilos seguidos pelos macrófagos são atraídos para o local da lesão. Neutrófilos e macrófagos liberam vários fatores de crescimento, por exemplo, TGF- $\beta$  e citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que estimulam a formação de tecido de granulação (Reinke & Sorg 2012). Esta liberação corrobora com os nossos resultados, já que o grupo RHL apresentou maiores níveis de nitrito, expressão TGF- $\beta$ 1 e atividade da MPO em comparação com o grupo RP, indicando que o prolongamento da fase inflamatória durante a cicatrização de lesões cutâneas, como já descrito anteriormente em animais obesos (Paulino do Nascimento & Monte-Alto-Costa 2011).

Além dos estudos anteriores que demonstram que o “burst” inflamatório está associado à ruptura da sinalização de insulina; a produção de EROs também parece ser um fenômeno importante nas alterações da homeostase do metabolismo da glicose associadas com o desenvolvimento da massa gorda (Wellen & Hotamisligil 2005). O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina e das complicações do diabetes (Maritim *et al.* 2003). O estresse oxidativo consiste no aumento da produção de EROs através da intervenção de mecanismos enzimáticos e/ou não-enzimáticos (isto é, hiperglicemia e oxidação da glicose) (Fardoun 2007). Os nossos resultados apresentam maiores níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, o que indica um aumento do estresse oxidativo e de danos oxidativos na lesão do grupo RHL.

Obesidade e diabetes afetam a fisiologia da pele, incluindo efeitos sobre a função de barreira da pele, estrutura e função do colágeno, a cicatrização de lesões e a neovascularização.(Schaffer *et al.* 1997; Yosipovitch *et al.* 2007). No presente estudo, observou-se um atraso no processo de reparo de lesões no grupo RHL, indicando que a expressão de proteínas TGF- $\beta$ 1 e  $\alpha$ -SMA ainda estava aumentada 14 dias após a realização da lesão no grupo RHL, que é confirmado pela elevada densidade de miofibroblastos e vasos sanguíneos observada.

Como já está bem descrito na literatura, o desenvolvimento do tecido de granulação normal requer uma sequência de eventos precisamente orquestrada que envolve diversos processos, tais como inflamação, proliferação celular e contração

da lesão. A apoptose de células do tecido de granulação, principalmente de miofibroblastos e células endoteliais ocorre após a completa reepitelização (Desmouliere *et al.* 1995), portanto, uma elevada quantidade de miofibroblastos e vasos sanguíneos numa fase tardia da cicatrização de lesão é um exemplo característico de cicatrização retardada (Toriseva *et al.* 2012), como foi observado em nossos resultados. A reepitelização é um processo que restaura a epiderme e consiste na proliferação e migração dos queratinócitos (Li *et al.* 2007), este processo só começa a ocorrer quando o número de células do sistema imunológico e os níveis de citocinas pró-inflamatórias diminuem (Gurtner *et al.* 2008). No nosso estudo, observou-se um maior quantidade de células inflamatórias e NOS 2-positivas no grupo de RHL em comparação com o grupo RP, o que pode explicar o fato do grupo RHL ter apresentado reepitelização retardada.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que a administração de dieta rica em gordura induz a resistência à insulina e prejudica a cicatrização de lesões, atrasando a contração e reepitelização e prolongando a fase inflamatória. Além disso, mostramos que os distúrbios metabólicos, tais como a obesidade, resistência à insulina e hipertensão induzida por uma dieta rica em gordura causa um importante dano oxidativo nas lesões. No entanto, estudos posteriores são necessários para identificar os mecanismos que causam o prolongamento da fase inflamatória observado nesse animais submetidos à dieta hiperlipídica.

## **7.2. Macrófagos contribuem para o retardo do processo de cicatrização induzido pela resistência à insulina**

Este modelo experimental de indução de resistência à insulina em camundongos C57Bl/6 também foi bem sucedido. Apesar do período de administração de ambas as dietas, hiperlipídica e padrão, ter sido menor (apenas 20 semanas) e do teor de gordura da dieta hiperlipídica ter sido maior (60% ao invés de 42%) do que o modelo experimental utilizado no primeiro artigo, os nossos resultados demonstram que esse método também induziu hipertensão, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia além de ter alterado o metabolismo da glicose, indicando intolerância à glicose e resistência à insulina em animais submetidos a ração hiperlipídica.

Além das alterações metabólicas, os nossos resultados mostraram que a dieta rica em gordura também prejudica a cicatrização, aumentando a quantidade de infiltrado inflamatório, bem como o dano oxidativo como foi observado no modelo utilizado anteriormente. Um outro ponto importante analisado somente no segundo artigo foi a síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento através de ensaios *in vitro*. Os nossos resultados demonstram claramente que os fatores solúveis produzidos por macrófagos isolados a partir de animais resistentes à insulina inibem a proliferação a migração de fibroblastos.

Estudos anteriores demonstraram que animais geneticamente modificados como *ob/ob* e submetidos a dietas de alto teor de gordura apresentaram diferenciação miofibroblástica comprometida (Seitz *et al.* 2010). Estas observações são consistentes com os nossos resultados, uma vez que os animais do grupo RHL apresentaram atraso na contração da lesão, e isto pode ter ocorrido devido à menor diferenciação miofibroblástica e angiogênese também observada nesses animais. O TGF- $\beta$ 1 é a principal citocina que induz a expressão de  $\alpha$ -SMA e diferenciação miofibroblástica (Desmouliere *et al.* 1993), os animais do grupo RHL apresentaram baixa expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 sendo uma das possíveis causas da diferenciação miofibroblástica comprometida.

Os nossos resultados mostraram que os animais submetidos a uma ração hiperlipídica apresentam menor deposição de colágeno e altos dos níveis de nitrito e de células NOS 2-positivas, 7 dias após a realização da lesão. Estes resultados

podem ser explicados pela maior quantidade de infiltrado inflamatório observado no grupo RHL, uma vez que já se sabe que macrófagos e os neutrófilos são capazes de sintetizar ON. Recentemente foi descrito que a produção excessiva de ON prejudica deposição de colágeno (Park *et al.* 2012).

A resposta inflamatória envolve o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão, e é supostamente um efeito benéfico na erradicação de organismos infecciosos e na limpeza de restos celulares (Eming *et al.* 2007). Observamos maior quantidade de neutrófilos, assim como a atividade da MPO e macrófagos de ambos os fenótipos (M1 e M2) foi evidente no grupo RHL, 7 dias após a realização da lesão. A resposta inflamatória exagerada observada na lesão dos animais submetidos a RHL, nos levou a avaliar a expressão proteica do TGF- $\beta$ 1 e MCP-1. A expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 estava reduzida enquanto que a expressão da proteína MCP-1 foi significativamente maior no grupo de RHL quando comparado ao grupo RP. Os dados de TGF- $\beta$ 1 corroboram com estudos anteriores que demonstraram que em lesões diabéticas a expressão proteica de TGF- $\beta$ 1 estava extremamente reduzida (Gordon & Taylor 2005). Além disso, os dados de MCP-1, também corroboram com estudos anteriores que demonstraram que animais submetidos a uma dieta rica em gordura aumenta a concentração plasmática de MCP-1 (Kamei *et al.* 2006).

Outros estudos já demonstraram que o “burst” inflamatório está associado a altos níveis de EROs em lesões diabéticas. Além disso, já está bem descrito que macrófagos M2 também produzem grandes quantidades de EROs (Wellen & Hotamisligil 2005). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo: o alto teor de gordura além de induzir a resistência à insulina aumenta a quantidade de infiltrado inflamatório e dos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no local da lesão, indicando um aumento do dano oxidativo na lesão.

Já foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  contribui com a resistência à insulina em modelos de camundongos obesos (Morin *et al.* 1997). Além disso, a obesidade é descrita como uma inflamação crônica de baixo grau caracterizada pela síntese anormal de adipocinas e a ativação de vias pró-inflamatórias que por sua vez induzem a produção e liberação de fatores e citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  (Clark *et al.* 2005). Estas observações são consistentes com os nossos resultados, uma vez que os animais do grupo resistentes à insulina apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  no plasma (Goren *et al.* 2006).

Surpreendentemente, nossos resultados demonstram a mesma proporção de macrófagos M1 e M2, sete dias após a realização da lesão, identificados por imunofluorescência com dupla marcação para Cd11b/Ly6C ou Cd11b/Arg-1, respectivamente, em ambos os grupos. Por este motivo, decidiu-se investigar as interações entre os fibroblastos e os fatores solúveis sintetizados por macrófagos isolados a partir de animais de ambos os grupos. No presente estudo observou-se que o tratamento com o meio condicionado a partir do grupo RHL inibe a proliferação e a migração de fibroblastos em comparação com o tratamento com o meio condicionado derivado de grupo RP. Graças à essas análises sugerimos que os fatores solúveis sintetizados pelos macrófagos isolados de animais do grupo RHL podem modular negativamente a proliferação e a migração de fibroblastos. É importante salientar que, embora o número de macrófagos originalmente plaqueados tenha sido o mesmo, os marcadores dos macrófagos M1 (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) estavam significativamente maiores no meio condicionado coletado a partir de macrófagos isolados a partir do grupo RHL.

Através desses resultados sugerimos que os animais submetidos a uma dieta hiperlipídica apresentaram resistência à insulina, cicatrização retardada e elevada quantidade de macrófagos nas lesões (7 dias após a realização da lesão). Além disso, demonstramos que os fatores solúveis produzidos por macrófagos isolados dos animais resistentes à insulina comprometem as funções dos fibroblastos. Por isso, podemos sugerir que os macrófagos isolados de animais submetidos a uma dieta com alto teor de gordura estão diretamente envolvidos na cicatrização retardada. Nossos dados corroboram com a idéia de que a resistência à insulina induzida pela dieta de alto teor de gordura atrasa a resolução da inflamação durante o processo de cicatrização de lesões cutâneas e esses fenômenos podem contribuir para a não cicatrização de lesões diabéticas.

## 8. CONCLUSÕES FINAIS

Através dos dados apresentados nesse estudo observamos que a administração de uma dieta rica em gordura induz a resistência à insulina e prejudica a cicatrização de lesões, atrasando a contração da lesão e reepitelização, e prolongando a fase inflamatória. Além disso, mostramos que os distúrbios metabólicos, tais como a obesidade, resistência à insulina e hipertensão induzida por uma dieta rica em gordura causa um importante dano oxidativo nas lesões. No entanto, estudos posteriores são necessários para identificar os mecanismos que causam o prolongamento da fase inflamatória observado nesse animais submetidos à dieta hiperlipídica.

Demonstramos ainda que os fatores solúveis produzidos por macrófagos isolados dos animais resistentes à insulina comprometem as funções dos fibroblastos. Através desses resultados, podemos sugerir que os macrófagos isolados de animais submetidos a uma dieta com alto teor de gordura estão diretamente envolvidos na cicatrização retardada.

Nossos dados corroboram com a idéia de que a resistência à insulina induzida pela dieta de alto teor de gordura atrasa a resolução da inflamação durante o processo de cicatrização de lesões cutâneas e esses fenômenos podem contribuir para a não cicatrização de lesões crônicas ou diabéticas.

## Referências

Acosta J.B., del Barco D.G., Vera D.C., Savigne W., Lopez-Saura P., Guillen Nieto G., Schultz G.S. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *Int. Wound J.* 2008; 5, 530-539.

Anwer T., Sharma M., Pillai K.K., Iqbal M. Effect of *Withania somnifera* on insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008;102, 498-503.

Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* 2003;55, 241-269.

Barrett J.R. POPs vs. Fat: Persistent Organic Pollutant Toxicity Targets and Is Modulated by Adipose Tissue. *Environ. Health Perspect.* 2013;121, a61.

Bhatt P.A. & Makwana D. Comparative influence of propranolol and verapamil on glycemic control and histamine sensitivity associated with L-thyroxine-induced hyperthyroidism - an experimental study. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008;22, 53-59.

Broughton G., 2nd, Janis J.E., Attinger C.E. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117, 12S-34S.

Cattaneo L., De Gennaro Colonna V., Zoli M., Muller E.E., Cocchi D. Hypothalamo-pituitary-IGF-1 axis in female rats made obese by overfeeding. *Life Sci.* 1997;61, 881-889.

Clark J., Vagenas P., Panesar M., Cope A.P. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64(Suppl 4), iv70-76.

Cooney R., Iacono J., Maish G., Smith J.S., Ehrlich P. Tumor necrosis factor mediates impaired wound healing in chronic abdominal sepsis. *J. Trauma* 1997;42, 415-420.

Daley J.M., Brancato S.K., Thomay A.A., Reichner J.S., Albina J.E. The phenotype of murine wound macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2010;87, 59-67.

Daley J.M., Reichner J.S., Mahoney E.J., Manfield L., Henry W.L., Jr., Mastrofrancesco B., Albina J.E. Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J. Immunol.* 2005;174, 2265-2272.

de Luca C. & Olefsky J.M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008;582, 97-105.

DeFronzo R.A. & Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14, 173-194.

Desmouliere A., Chaponnier C., Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13, 7-12.

Desmouliere A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1993; 122, 103-111.

Desmouliere 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, 56-66.

Draper H.H., Squires E.J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* 1993;15, 353-363.

Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127, 514-525.

Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998;101, 890-898.

Fardoun R.Z. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Exp. Hypertens.* 2007;29, 135-148.

Fellmann L., Nascimento A.R., Tibirica E., Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Ther.* 2012;137(3):331-340.

Frank S., Hubner G., Breier G., Longaker M.T., Greenhalgh D.G., Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 1995;270, 12607-12613.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 2003;200, 500-503.

Gonzalez-Gay M.A., De Matias J.M., Gonzalez-Juanatey C., Garcia-Porrúa C., Sanchez-Andrade A., Martin J., Llorca J. Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2006;24, 83-86.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3, 23-35.

Gordon S. & Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5, 953-964.

Goren I., Allmann N., Yogev N., Schurmann C., Linke A., Holdener M., Waisman A., Pfeilschifter J., Frank S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am. J. Pathol.* 2009;175, 132-147.

Goren I., Kampfer H., Podda M., Pfeilschifter J., Frank S. Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. *Diabetes.* 2003;52, 2821-2832.

Goren I., Muller E., Pfeilschifter J., Frank S. Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol.* 2006;168, 765-777.

Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126, 131-138.

Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453, 314-321.

Halberg N., Wernstedt-Asterholm I., Scherer P.E. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 2008;37, 753-768, x-xi.

Hoehn K.L., Salmon A.B., Hohnen-Behrens C., Turner N., Hoy A.J., Maghzal G.J., Stocker R., Van Remmen H., Kraegen E.W., Cooney G.J., Richardson A.R., James D.E. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106, 17787-17792.

Hotamisligil G.S., Arner P., Caro J.F., Atkinson R.L., Spiegelman B.M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995;95, 2409-2415.

Hotamisligil G.S., Budavari A., Murray D., Spiegelman B.M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest.* 1994;94, 1543-1549.

Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259, 87-91.

Inouye K.E., Shi H., Howard J.K., Daly C.H., Lord G.M., Rollins B.J., Flier J.S. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes.* 2007;56, 2242-2250.

Juge-Aubry C.E., Somm E., Chicheportiche R., Burger D., Pernin A., Cuenod-Pittet B., Quinodoz P., Giusti V., Dayer J.M., Meier C.A. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89, 2652-2658.

Kamei N., Tobe K., Suzuki R., Ohsugi M., Watanabe T., Kubota N., Ohtsuka-Kowatari N., Kumagai K., Sakamoto K., Kobayashi M., Yamauchi T., Ueki K., Oishi Y., Nishimura S., Manabe I., Hashimoto H., Ohnishi Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Murakami K., Nagai R., Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 2006;281, 26602-26614.

Kanda H., Tateya S., Tamori Y., Kotani K., Hiasa K., Kitazawa R., Kitazawa S., Miyachi H., Maeda S., Egashira K., Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 2006;116, 1494-1505.

Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C., Bhasker V., Gordillo G.M., Sen C.K., Roy S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One.* 2010;5, e9539.

Kim H.J., Higashimori T., Park S.Y., Choi H., Dong J., Kim Y.J., Noh H.L., Cho Y.R., Cline G., Kim Y.B., Kim J.K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 2004;53, 1060-1067.

Ko S.H., Nauta A., Wong V., Glotzbach J., Gurtner G.C., Longaker M.T. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg* 2011;127(Suppl 1), 10S-20S.

Koh T.J. & DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011;13, e23.

Kurihara T. & Bravo R. Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC. *J. Biol. Chem.* 1996;271, 11603-11607.

Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186, 464-478.

Li J., Chen J., Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 2007; 25, 9-18.

Lovvorn H.N., 3rd, Cheung D.T., Nimni M.E., Perelman N., Estes J.M., Adzick N.S. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J. Pediatr. Surg.* 1999; 34, 218-223.

Lucas T., Waisman A., Ranjan R., Roes J., Krieg T., Muller W., Roers A., Eming S.A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J. Immunol.* 2010;184, 3964-3977.

Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 2007;117, 175-184.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B., 3<sup>rd</sup>. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2003;17, 24-38.

Marra M., Campanati A., Testa R., Sirolla C., Bonfigli A.R., Franceschi C., Marchegiani F., Offidani A. Effect of etanercept on insulin sensitivity in nine patients with psoriasis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2007;20, 731-736.

Martin M.U. & Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 2002;1592, 265-280.

Martin P. & Leibovich S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005;15, 599-607.

Meszaros A.J., Reichner J.S., Albina J.E. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1999;65, 35-42.

Mirza R., DiPietro L.A., Koh T.J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am. J. Pathol.* 2009;175, 2454-2462.

Misson P., van den Brule S., Barbarin V., Lison D., Huaux F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J. Leukoc. Biol.* 2004;76, 926-932.

Morin C.L., Eckel R.H., Marcel T., Pagliassotti M.J. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. *Endocrinology.* 1997;138, 4665-4671.

Nascimento A.P. & Costa A.M. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br. J. Nutr.* 2006;96,1069-1077.

Oscari L.B., Brown M.M., Miller W.C. Effect of dietary fat on food intake, growth and body composition in rats. *Growth.* 1984;48, 415-424.

Otranto M., Do Nascimento A.P., Monte-Alto-Costa A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2010;18, 629-636.

Park J.E., Abrams M.J., Efron P.A., Barbul A. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. *J. Surg. Res.* 2012; dx.doi.org/10.1016/j.jss.2012.11.056,

Paulino do Nascimento A. & Monte-Alto-Costa A. Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. *Br. J. Nutr.* 2011;106, 603-611.

Profyris C., Tziotzios C., Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012; 66, 1-10; quiz 11-12.

Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Whiting Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 1993;123, 1939-1951.

Reinke J.M. & Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012;49, 35-43.

Riccardi G., Giacco R., Rivellese A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 2004;23, 447-456.

Romana-Souza B., Otranto M., Vieira A.M., Filgueiras C.C., Fierro I.M., Monte-Alto-Costa A. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav. Immun.* 2010;24, 427-437.

Savill J.S., Wyllie A.H., Henson J.E., Walport M.J., Henson P.M., Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 1989; 83, 865-875.

Schaffer M.R., Efron P.A., Thornton F.J., Klingel K., Gross S.S., Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J. Immunol.* 1997;158, 2375-2381.

Schaffer M.R., Tantry U., Efron P.A., Ahrendt G.M., Thornton F.J., Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery.* 1997;121, 513-519.

Scherer P.E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006;55, 1537-1545.

Schottelius A.J., Mayo M.W., Sartor R.B., Baldwin A.S., Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* 1999;274, 31868-31874.

Seitz O., Schurmann C., Hermes N., Muller E., Pfeilschifter J., Frank S., Goren I. Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Exp. Diabetes Res.* 2010;2010, 476969.

Shoelson S.E., Herrero L., Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132, 2169-2180.

Sonnemann K.J. & Bement W.M. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2010;27, 237-263.

Spranger J., Kroke A., Mohlig M., Hoffmann K., Bergmann M.M., Ristow M., Boeing H., Pfeiffer A.F. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52, 812-817.

Stanley T.L., Zanni M.V., Johnsen S., Rasheed S., Makimura H., Lee H., Khor V.K., Ahima R.S., Grinspoon S.K. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96, E146-150.

Stark J.M., van Egmond A.W., Zimmerman J.J., Carabell S.K., Tosi M.F. Detection of enhanced neutrophil adhesion to parainfluenza-infected airway epithelial cells using a modified myeloperoxidase assay in a microtiter format. *J. Virol. Methods.* 1992;40, 225-242.

Stout R.D. & Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 2012;76, 509-513.

Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2009;86, 1105-1109.

Swift M.E., Burns A.L., Gray K.L., DiPietro L.A. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J. Invest. Dermatol.* 2001;117, 1027-1035.

Tajiri Y., Mimura K., Umeda F. High-sensitivity C-reactive protein in Japanese patients with type 2 diabetes. *Obes. Res.* 2005;13, 1810-1816.

Toriseva M., Laato M., Carpen O., Ruohonen S.T., Savontaus E., Inada M., Krane S.M., Kahari V.M. MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS One.* 2012;7, e42596.

Trengove N.J., Bielefeldt-Ohmann H., Stacey M.C. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound. Repair Regen.* 2000;8, 13-25.

Tsuboi R. & Rifkin D.B. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J. Exp. Med.* 1990;172, 245-251.

Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W., Hotamisligil G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997;389, 610-614.

van Exel E., Gussekloo J., de Craen A.J., Frolich M., Bootsma-Van Der Wiel A., Westendorp R.G. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002;51, 1088-1092.

Wang P., Mariman E., Renes J., Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J. Cell Physiol.* 2008;216, 3-13.

Weisberg S.P., Hunter D., Huber R., Lemieux J., Slaymaker S., Vaddi K., Charo I., Leibel R.L., Ferrante A.W., Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 2006;116, 115-124.

Wellen K.E. & Hotamisligil G.S. nflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2005;115, 1111-1119.

Werner S., Breeden M., Hubner G., Greenhalgh D.G., Longaker M.T. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J. Invest. Dermatol.* 1994;103, 469-473.

Wetzler C., Kampfer H., Stallmeyer B., Pfeilschifter J., Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J. Invest. Dermatol.* 2000;115, 245-253.

Woessner J.F., Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961;93, 440-447.

Yosipovitch G., DeVore A., Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007;56, 901-916; quiz 917-920.

Zeyda M. & Stulnig T.M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology.* 2009;55, 379-386.

**ANEXO A – Carta de aceite do artigo**

Andrea Monte Alto Costa <andreamacosta@gmail.com>

---

**Acceptance of Manuscript in WRR (WRR-12-05-0170.R1)**

6 mensagens

---

**wrreditor@woundheal.org** <wrreditor@woundheal.org>

30 de janeiro de 2013 19:31

Para: amacosta@uerj.br  
Cc: editorialoffice@woundheal.org

Dear Dr. Monte-Alto-Costa,

WRR-12-05-0170.R1

I am pleased to inform you that your manuscript, "INSULIN RESISTANCE IMPAIRS CUTANEOUS WOUND HEALING IN MICE", has been accepted for publication in Wound Repair and Regeneration and will appear in an upcoming issue.

Please make certain that you sign the "Assignment of Copyright" and "Color Charges" forms which are attached. Once you have completed and signed these forms, fax these documents to our editorial office at (+1) 781-338-8491. You may also email them to the editorial office as pdf files. Returning these forms quickly is critical to ensure timely publication. Your manuscript will not enter the production stream until both forms have been received.

Thank you for your contribution to Wound Repair and Regeneration.

Sincerely,

Patricia A. Hebda, Ph.D.  
Editor-in-Chief  
Wound Repair and Regeneration

---

**2 anexos**

 \* WRR-Color-Charge-Form2012.pdf  
34K

 \* WRR-Copyright-Form.pdf  
45K

## ANEXO B – Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



### COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/012/2010** sobre "**Efeitos da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica no reparo cutâneo em camundongos**", sob a responsabilidade de **Andréa Monte Alto Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **01/03/2010**. Este certificado expira em **01/03/2014**.

Rio de Janeiro, 01 de Março de 2010.

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

*Prof<sup>ª</sup> Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Prof<sup>ª</sup> Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
Matricula 34765-8*

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mat. 2887-8

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br

## ANEXO C – Resumo em francês

L'obésité est associée à des altérations métaboliques tels que la résistance à l'insuline et des changements significatifs de la peau. L'objectif initial était d'étudier les effets de la résistance à l'insuline induit par un régime riche en graisses sur la cicatrisation cutanée et d'analyser ensuite, le rôle des macrophages pendant le processus de réparation tissulaire. Les résultats ont montré que les animaux soumis à un régime riche en graisses (RRG) présentaient une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une augmentation du cholestérol et des triglycérides plasmatiques par rapport aux animaux soumis à un régime standard (RS). Le groupe RRG avait un taux de contraction et de ré-épithélialisation plus faible que le groupe RS. De plus, le groupe RRG présentait un nombre plus grand de cellules inflammatoires (cellules NOS 2- et F4/80-positives, et neutrophiles), une densité de fibres de collagène plus faible et une densité supérieure de myofibroblastes et des vaisseaux sanguins. Les dommages oxydatifs et l'expression du TGF- $\beta$ 1 et de l' $\alpha$ -SMA étaient supérieurs dans le groupe RRG. Le groupe RRG présentait aussi un taux plasmatique de TNF- $\alpha$  supérieur par rapport au groupe RS. Par ailleurs, la proportion de cellules M1 (macrophages activés classiquement) et M2 (macrophages activés alternativement) était la même dans les deux groupes. De plus, en ce qui concerne la synthèse et la libération de cytokines et de facteurs de croissance évalués par des tests *in vitro*, nous avons observé que les taux de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  ont été plus élevés dans le milieu conditionné en macrophages isolés à partir d'animaux du groupe RRG (MCRRG) par rapport au milieu conditionné en macrophages isolés à partir d'animaux du groupe RS (MCRS). Nos résultats démontraient clairement que des facteurs solubles produits par les macrophages isolés à partir d'animaux résistants à l'insuline inhibaient la prolifération et la migration des fibroblastes. Nous pouvons suggérer que le phénomène d'insulino-résistance conduit à une cicatrisation cutanée retardée et que les macrophages sont directement impliqués dans cet effet, en augmentant la phase inflammatoire du processus de réparation tissulaire.

Mots-clé: Peau. Plaie. Réparation. Inflammation. Tissue de granulation. Macrophages.