UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas
experimentalmente

Francielle Rodrigues Guimarães

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas
experimentalmente

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Francielle Rodrigues Guimarães

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de
Barros Cardoso

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIALDESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Guimarães, Francielle Rodrigues
Papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente. Ribeirão Preto, 2013.
82p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Cardoso, Cristina Ribeiro de Barros

1. PPAR α 2. Cicatrização cutânea 3. Inflamação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Francielle Rodruigues Guimarães

Título do trabalho: Papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de
Barros Cardoso

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Primeiramente a **Deus**, pelo amor incondicional, pelo perdão e pela **força** nos momentos difíceis.

À mulher mais importante da minha vida, fonte de inspiração e admiração. **Mãe**, sem seu **apoio** e **carinho** nunca teria chegado até aqui.

Ao meu namorado, **Alysson**, por apoiar e acreditar nos meus sonhos, pela **paciência** nos dias de ansiedade/cansaço e pelo **carinho**.

Aos meus **amigos de laboratório**, colegas de trabalho e amigos pra vida toda. Pela **amizade**, pela colaboração e por compreenderem minhas limitações e mesmo assim permanecerem **ao meu lado**.

Agradecimentos

Aos colaboradores e ao suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Agradecimentos especiais

A **Deus**, Pai de misericórdia, pelo dom da vida, pela força e discernimento.

Aos meus pais, em especial minha **mãe**, pelo apoio, pelas orações e por compreender minha ausência nesses anos de dedicação ao meu trabalho.

A minha **orientadora** e amiga, Prof^á Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardosos, por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus **colegas de trabalho**, verdadeiros companheiros de luta e amigos pra vida toda. Em especial, agradeço a minha amiga e eterna vizinha **Patrícia**, pela amizade de todas as horas, pela força nos momentos difíceis e por todas as várias noites de longos experimentos em que sempre estive ao meu lado com dedicação e ânimo. Ao **Ton**, que apesar de conhecer a pouco tempo, trouxe grande alegria para os meus dias, está sempre disposto a ajudar e sua companhia em dia de experimentos faz toda diferença. Ao **Giuliano**, outro companheiro de “estrada”, amigo e grande colaborador deste trabalho. Eu não poderia me esquecer da Vivi, **Viviane**, técnica do laboratório, sempre disponível, grande amiga e excelente profissional.

Aos **meus amigos** de Ribeirão Preto que compartilharam os bons e maus momentos, mas sempre com muita alegria e disposição. **Manuela, Marcela Davoli, Marcela Françoze, Laís, Maria Cláudia, Tiago, Djalma, Diego, Maria do Carmo, Fernanda, Frederico e Lílian**.

Aos meus **amigos, irmãos** em Deus, **Camila e Washington**, que mesmo à distância sempre foram meu suporte, compreendem minha ausência sem cobranças e não me deixam desanimar nos momentos difíceis.

Aos **colaboradores** e aos **laboratórios** que eu passei durante estes 2 anos, em especial aos laboratórios do Prof^o Dr^o **João Santana**, da Prof^á Dr^a **Lúcia Faccioli** e do Prof^o Dr^o **Marcos Rossi** aonde realizei grande parte do meu trabalho e sempre fui bem recebida por eles e por toda sua equipe.

Aos **funcionários dos Biotérios**, pela colaboração e amizade. Aos outros **funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, em especial, ao **Henrique**, secretário da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pela compreensão e por realizar seu trabalho com humildade e dedicação.

Não é o ângulo reto que me atrai. Nem a linha reta, dura, inflexível, criada pelo homem.
O que me atrai é a curva livre e sensual. A curva que encontro nas montanhas do meu País, no curso sinuoso dos seus rios, nas ondas do mar, nas nuvens do céu, no corpo da mulher preferida. De curvas é feito todo o Universo - o Universo curvo de Einstein.

OSCAR NIEMEYER

RESUMO

GUIMARÃES, F.R. Papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Peroxisome proliferator-activated receptor-alfa (PPAR- α) é um fator de transcrição nuclear envolvido na regulação do metabolismo de lipídeos e da inflamação. PPAR α pode estar relacionado com a modulação da cicatrização de feridas cutâneas, que é um processo multifatorial, dependente de mecanismos de sinalização celular e de inflamação. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar o papel do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente e a sua relação com o metabolismo sistêmico após tratamento com agonista do PPAR α . Para tanto, foram realizadas feridas na pele da região dorsal de camundongos 129/SvEv, que foram tratados diariamente com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil, por via oral ou tópica. Os animais foram acompanhados durante 240h pós-cirúrgico (p.c.) para a análise do reparo cutâneo e alterações metabólicas que poderiam ser induzidas pela ativação de PPAR α . Os camundongos tratados apresentaram melhor cicatrização após ativação de PPAR α com 100 ou 50 mg/kg/dia de agonista por via oral ou tópica, respectivamente. O tratamento oral induziu cicatrização mais rápida somente após 24h, 48h e 72h p.c., enquanto que os animais tratados com Gemfibrozil tópico apresentaram cicatrização mais precoce em todos os tempos avaliados. A indução de feridas alterou o metabolismo sistêmico dos camundongos que demonstraram significativa perda de peso e redução de triglicérides, independentemente do tratamento. Porém, a ativação de PPAR α não alterou a glicemia ou a função hepática. Na análise histopatológica das feridas foi verificado infiltrado inflamatório, composto principalmente por neutrófilos e outras células polimorfonucleares. Entretanto, o tratamento com Gemfibrozil tópico levou a um menor infiltrado inflamatório e diferenciada deposição de colágeno após 10 dias p.c. Além disso, houve diminuição do acúmulo de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo. O tratamento tópico promoveu menor acúmulo de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e T $\gamma\delta$, e ainda diferenciado influxo de células dendríticas para a lesão. No entanto, não houve diferença em relação a células T reguladoras nos linfonodos drenantes, mas os animais tratados apresentaram diminuição de Foxp3 nas células CD4⁺CD25⁻. Em conclusão, PPAR α atua no reparo cutâneo, e sua ativação local acelera a cicatrização por meio da modulação da inflamação na pele. Finalmente, os resultados sugerem que PPAR α pode ser alvo importante para novas terapias que visam melhorar a cicatrização de feridas, especialmente quando ativado no local da lesão.

Palavras-chave: PPAR- α , cicatrização cutânea, inflamação.

ABSTRACT

GUIMARÃES, F.R. The role the receptor PPAR α in wound healing induced experimentally. 2013 82f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) is a nuclear transcription factor involved in the regulation of lipid metabolism and inflammation. PPAR α may be associated to the modulation of wound healing, which is a multifactorial process dependent on mechanisms of cell signaling and inflammation. Then this work aimed to analyze the role of PPAR α receptor in experimental cutaneous wound healing and its relationship to the systemic metabolism of mice treated with a PPAR α agonist. For this, skin wounds were performed in the dorsal region of 129/SvEv mice, treated daily with the PPAR α agonist, Gemfibrozil, by oral or topical route. Mice were followed for 240h post-surgery (p.s.) for skin repair and metabolic changes that could be induced by PPAR α activation. There was improved wound healing in mice treated with 100 or 50 mg/Kg of PPAR α agonist by oral or topical route respectively. The oral treatment induced a better repair in the early 24h, 48h and 72h p.s. while mice treated by topical application of Gemfibrozil presented faster healing in all times evaluated. Wound's induction affected the systemic metabolism of mice leading to significant weight loss. PPAR α agonist did not alter glucose, triglycerides or liver function, although all injured animals had a significant decrease on triglycerides levels in the early times p.s., independent on the treatment. In histopathological examination of the wounds it was observed inflammatory infiltrate, composed mainly of neutrophils and other polymorphonuclear cells. However, topical treatment with PPAR α agonist led to lower inflammatory infiltrate and differentiated collagen deposition 10 days p.s. Furthermore, there was decrease of neutrophil, macrophages and eosinophils influx when compared to untreated mice. Topical treatment led to decrease in the TCD4⁺, TCD8⁺ e T $\gamma\delta$ lymphocytes accumulation in the lesions, and differentiated dendritic cell influx to the wounds. However there was no difference regarding CD4+CD25+ T cells in lymph nodes, but treated mice showed decrease Foxp3 expression. In conclusion, the triglycerides serum level was altered in the course of wound healing and may be associated to skin lesion, while PPAR α agonist acts in wound repair by accelerating healing and modulating neutrophil influx to the skin. Finally, our results suggested that PPAR α may be an important target for novel therapies aimed at improved wound healing, especially when administered topically.

Keywords: PPAR- α , wound healing, inflammation.

RESUMEN

GUIMARÃES, F.R. El papel del receptor PPAR α en la cicatrización de la herida inducida experimentalmente. 2013 82f. Disertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) es un factor de transcripción nuclear implicado en la regulación del metabolismo de los lípidos y la inflamación. PPAR α puede estar relacionado con la regulación de la cicatrización de la herida, que es un proceso multifactorial dependiente de los mecanismos de señalización celular y la inflamación. Así, este estudio fue analizar el papel de receptor PPAR α en la cicatrización de las heridas inducidas experimentalmente y su relación con el metabolismo sistémico después de tratarse con agonista de PPAR α . Para esto, se realizaron heridas en la piel dorsal de ratones 129/SvEv que fueron tratados diariamente con PPAR α , Gemfibrozil, oralmente o tópicamente. Los animales fueron controlados durante 240h post-quirúrgico (p.c.) para el análisis de la reparación de la piel y los cambios metabólicos que podrían ser inducidos por la activación de PPAR- α . Los ratones tratados mostraron una mejor cicatrización después de ser tratados con 100 ó 50 mg / kg / día de PPAR α agonista oral o tópica, respectivamente. El tratamiento oral indujo una cicatrización más rápida sólo después de 24h, 48h y 72h p.c., mientras que los animales tratados con el Gemfibrozil tópico tenían una cicatrización más precoz en todos los tiempos evaluados. La inducción de heridas alteró el metabolismo sistémico de ratones que mostraron una pérdida de peso significativa. La activación de PPAR α no alteró la glucosa en sangre o la función del hígado. Todos los animales mostraron una reducción significativa en los niveles de triglicéridos después de la inducción de heridas, independientemente del tratamiento. En el examen histopatológico de las heridas se observó infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de los neutrófilos y otras células polimorfonucleares. Los animales tratados PPAR α agonistas para aplicación tópica mostraron menor infiltrado inflamatorio y deposición de colágeno después de 10 días. En cuanto a la infiltración de leucocitos, los ratones tratados mostraron una reducción de la afluencia de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos en comparación con los animales que recibieron sólo el vehículo. El tratamiento tópico redujo la acumulación de las células CD4⁺, CD8⁺ y T γ δ , así como también diferenciada afluencia de células dendríticas en la lesión. Sin embargo, no hubo diferencia en las células CD4⁺CD25⁺ en ganglios linfáticos de drenaje, pero los animales tratados mostraron una disminución de Foxp3 en las células CD4⁺CD25⁺. En conclusión, el nivel de triglicéridos en suero fue alterado en el curso de la cicatrización de la herida y puede estar asociado a lesión de la piel, mientras agonista PPAR actúa en la reparación de heridas mediante la aceleración de la curación y la afluencia de neutrófilos modulación a la piel. Nuestros resultados sugieren que el PPAR α puede ser un objetivo para nuevas terapias destinadas a mejorar la cicatrización de heridas, especialmente cuando se administra por vía tópica.

Palabras clave: PPAR- α , cicatrización de la piel, inflamación

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das estruturas da pele e população celular....	02
Figura 2. Esquema de ativação de <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> (PPARs) por ligantes específicos	10
Figura 3. Esquema representativo da linha do tempo da indução de feridas.....	21
Figura 4. Determinação da melhor dose do agonista de PPAR α para o tratamento por via oral.....	29
Figura 5. Influência do tratamento oral com o agonista de PPAR α no fechamento de feridas cutâneas.....	30
Figura 6. Variação do peso corporal após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α	31
Figura 7. Avaliação da concentração sérica de triglicérides, da glicemia e da função hepática após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α .	32
Figura 8. Aspectos microscópicos das feridas após 48h e 240h de lesão e tratamento oral com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil.....	33
Figura 9. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-Acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO).....	35
Figura 10. Determinação da melhor dose do agonista de PPAR α para o tratamento por tópico.....	36
Figura 11. Influência do tratamento tópico com o agonista de PPAR α	37
Figura 12. Variação do peso corporal após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	38
Figura 13. Avaliação da concentração sérica de triglicérides, da glicemia e da função hepática após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	39

Figura 14. Aspectos microscópicos das feridas 48h, 120h e 240h pós-cirúrgico após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α , coradas por hematoxilina-eosina (HE).....	40
Figura 15. Aspectos microscópicos das feridas dos animais após 240h pós-cirúrgico e tratamento tópico com o agonista de PPAR α , coradas por Picrosírius.....	41
Figura 16. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-Acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	42
Figura 17. Quantificação e avaliação fenótipo de células monocíticas no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes, coletadas de tecido íntegro (0h) e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α	44
Figura 18. Quantificação e avaliação fenótipo de linfócitos no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes, coletadas de tecido íntegro (0h) e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α	46
Figura 19. Quantificação e avaliação fenotípica de células T reguladoras nos linfonodos drenantes, coletados de tecido íntegro (0h) e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α	48
Figura 20. Comparação entre os grupos que receberam tratamento oral ou tópico com agonista de PPAR α	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição resumida dos grupos pilotos.....	19
Tabela 2. Descrição resumida dos grupos experimentais.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl (microlitro)

μm (micrômetro)

15dPGJ2 (15-deoxi-Δ-prostaglandina J2)

9-HODE (ácido hidroxil-octadeca-9Z,11E-dienóico)

ALT (alanina transaminase)

AP-1 (*activator protein 1*)

CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)

CO₂ (dióxido de carbono)

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal)

CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*)

CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

DCs (células dendríticas)

DNA (Ácido desoxiribonucleico)

EAE (Encefalite Autoimune Experimental)

EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético)

EGF (*Epidermal Growth Factor*)

EPM (Erro Padrão da média)

EPO (Eosinófilo peroxidase)

FCFRP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto)

FGF (*Fibroblast Growth Factor*)

Foxp3 (Forkhead box P3)

GEM (Gemfibrozil)

GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)

H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio)

H₂SO₄ (Ácido sulfúrico)

HCl (ácido clorídrico)

HE (hematoxilina & eosina)

HETEs (ácidos hidroxi-eicosatetraenóico)

H-TAB (Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio)

ICAM (*Intercellular adhesion molecule*)

IFN-γ (Interferon gama)

IκBα (*Inhibitor of nuclear factor kappa B*)

Kg (Quilograma)

KGF (*Keratinocyte Growth Factor*)

LT (Leucotrienos)

LTB₄ (Leucotrieno B₄)

M (Molar)

mg (miligrama)

mL (mililitro)

mM (mili-molar)

mm² (milímetros quadrados)

MMP (Metaloproteinases)

MPO (Mieloperoxidase)

NaCl (Cloreto de Sódio)

NAG (N- Acetilglicosaminidase)

NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*)

NF- κ B (*nuclear factor kappa B*)

nm (nanômetro)

°C (graus Celsius)

OPD (o-fenilenediamina dihidrocloridro)

p.c (pós cirúrgico)

PBS (*Phosphate buffered saline*)

PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)

PGs (Prostaglandinas)

pH (potencial hidrogeniônico)

PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)

RNA (ácido ribonucleico)

RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium)

SFB (Soro Fetal Bovino)

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)

TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*)

TIMP's (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)

TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina)

TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha)

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEI (veículo)

x g (força-g)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Pele.....	01
1.2. Cicatrização de feridas cutâneas.....	15
1.3. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> (PPAR).....	09
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Indução de feridas cirúrgicas.....	17
3.3. Administração do agonistas de PPAR α e dos veículos.....	18
3.4. Análise macroscópica da evolução das feridas.....	21
3.5. Análise do peso dos animais.....	21
3.6. Eutanásia dos camundongos e coleta do material.....	21
3.7. Análise histopatológica.....	22
3.8. Dosagem da glicemia.....	23
3.9. Dosagem de triglicérides sérico.....	23
3.10. Dosagem da alanina transaminase (ALT).....	23
3.11. Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	24
3.12. Ensaio de N- Acetilglicosaminidase (NAG).....	24
3.13. Ensaio de eosinófilo peroxidase (EPO).....	25

3.14. Separação de células para citometria de fluxo.....	25
3.15. Citometria de fluxo.....	26
3.16. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Determinação da melhor dose para o tratamento oral com o agonista de PPAR α	29
4.2. Influência da ativação de PPAR α por via oral no fechamento macroscópico de feridas cutâneas.....	30
4.3. Variação do peso corporal após indução das feridas cutâneas e tratamento oral com o agonista de PPAR α	31
4.4. Alterações metabólicas após indução das feridas e ativação sistêmica de PPAR α	32
4.5. Análise histopatológica das feridas após tratamento oral com o agonista de PPAR α	33
4.6. Quantificação da atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α	34
4.7. Determinação da melhor dose para o tratamento tópico.....	35
4.8. Influência da ativação local de PPAR α no processo de cicatrização.....	36
4.9. Variação do peso corporal após indução das feridas cutâneas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	37
4.10. Alterações metabólicas após indução das feridas e ativação tópica de PPAR α	38
4.11. Análise histopatológica das feridas após indução e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	39

4.12. Quantificação da atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	41
4.13. Avaliação fenotípica das células monocíticas dos tecidos lesados e dos linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	43
4.14. Análise quantitativa e fenotípica de linfócitos no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	45
4.15. Análise quantitativa e fenotípica de células T reguladoras nos linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α	47
4.16. Comparação entre os grupos que receberam tratamento oral ou tópico com agonista de PPAR α	49
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS.....	67
8. ANEXO.....	82
8.1. Anexo 1.....	82

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1. 1 PELE

A pele, também conhecida como *cútis* ou tegumento, é o maior órgão do corpo humano e possui importante papel na homeostase corporal (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; KENDALL; NICOLAOU, 2013). Este órgão é a primeira barreira anatômica entre o meio ambiente e o corpo, possui vários receptores de sensibilidade à dor, temperatura, texturas e constitui importante proteção física. Além disso, de forma semelhante ao pulmão e o intestino que possuem um diferenciado sistema imunológico, a pele também desempenha proteção importante contra trauma, toxinas, infecções, enquanto mantém a tolerância imunológica, prevenindo assim o desenvolvimento de alergias e doenças autoimunes. Ainda, possui importante papel nas funções metabólicas, como a síntese de hormônios e absorção de raios solares para produção de vitamina D (PROKSCH; BRANDNER et al., 2008; DI MEGLIO; PERERA; NESTLE, 2011; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

Esta capacidade de exercer múltiplas funções está relacionada à sua estrutura formada por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a camada mais externa, composta principalmente por queratinócitos, além de terminações nervosas (células de Merkel), de melanócitos e células do sistema imune; tais como células de Langerhans e dos linfócitos T (PROKSCH; BRANDNER et al., 2008; DI MEGLIO; PERERA et al., 2011; MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012; KENDALL; NICOLAOU, 2013). Já a camada subjacente, a derme, é composta por fibras de colágeno, vasos sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas, pequenos vasos sanguíneos, terminações nervosas e células do sistema imunológico; tais como células dendríticas, células $T\gamma\delta$, células B, natural killer (NK), neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. A camada mais interna é a hipoderme ou tecido subcutâneo, formada principalmente de vasos sanguíneos e tecido adiposo (PROKSCH; BRANDNER et al., 2008; DI MEGLIO; PERERA et al., 2011; MCLAFFERTY; HENDRY et al., 2012; KENDALL; NICOLAOU, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo das estruturas da pele e população celular.
 Adaptado de Kendall, A.C. e Nicolaou, A. (2013 p.143)

1.2 Cicatrização de feridas cutâneas

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo multifatorial, complexo onde há a participação de vários tipos celulares e das diferentes camadas da pele. Este processo envolve inflamação, proliferação e migração de queratinócitos, reepitelização, aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, deposição de matriz extracelular e resposta imune, dependentes de mecanismos diversos e sincronizados de sinalização celular (CARDOSO et al., 2011). Essa resposta imediata e dinâmica do organismo à lesão tecidual tem como objetivo restaurar a continuidade anatômica e funcional do tecido (BARBUL, 1990), sendo que a cicatrização inadequada e dificultada de feridas pode ocasionar consequências como morbidade, incapacidade, efeitos psicossociais, perda econômica dentre outros, além de acometer grande parte da população mundial, com alta incidência e prevalência (WERNER; GROSE, 2003; WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007; CARDOSO; FAVORETO et al., 2011)

O processo de reparo tecidual é dinâmico e interativo; envolve células inflamatórias e do parênquima lesado, além da complexa cadeia de mediadores solúveis, bem como a matriz extracelular (WERNER; KRIEG et al., 2007). A cicatrização de feridas pode ser dividida em pelo menos três etapas: reação inflamatória, fase proliferativa e remodelação tecidual. O processo ocorre nessa sequência, mas não separadamente, pois as etapas se interpõem e são reguladas por múltiplos fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e citocinas liberadas no local da ferida (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A cicatrização tem como objetivo, do ponto de vista histológico, a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso que restaure a homeostasia do organismo, sirva de base para as novas células e preserve a função do tecido normal (MARTIN, 1997; WERNER; KRIEG et al., 2007). Na cicatrização de feridas da pele e tecido subcutâneo, a formação de tecido cicatricial está ligada à regeneração epitelial. Esta resposta é considerada o modelo da cicatrização, que pode ser denominada primária ou por 1ª intenção, e secundária ou por 2ª intenção (LI; CHEN et al., 2007; CARDOSO; FAVORETO et al., 2011). O coágulo formado em ambas as lesões é proporcional à área da ferida e se ocorrer infecções, a reação inflamatória é exuberante. Nos dois casos, a exsudação de fagócitos é muito intensa

e forma-se grande quantidade de tecido de granulação, com possibilidade de cicatrizes maiores e deformantes (LI; CHEN et al., 2007).

O processo de reparo tecidual também envolve a sinalização de múltiplos fatores de crescimento, como GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), hormônios (corticosteróides), vitaminas como retinóides (WERNER; GROSE, 2003; ISHIDA et al., 2004; STURM; DIGNASS, 2008), citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-8, IFN- γ , TGF- β). Neste contexto, a resposta inflamatória é uma consequência inevitável da lesão tecidual e é essencial para o estabelecimento da homeostase do organismo. É um processo relativamente curto, com duração de poucos dias, que visa neutralização de patógenos e retirada das células mortas do local (MARTIN, 1997). Porém, a resolução completa da ferida somente é considerada após maturação e remodelação da matriz extracelular. Isto ocorre lentamente levando meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (LI; CHEN et al., 2007).

Logo após a lesão há sangramento que é interrompido pela agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e deposição de rede de fibrina, formando um coágulo sanguíneo (HYNES, 2002). Este servirá também como suporte para a intensa migração celular no local da ferida. As plaquetas que participam do processo de coagulação secretam vários mediadores, inclusive PDGF, que ativa e atrai os macrófagos e fibroblastos para o local da lesão. Da mesma forma, vários outros mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos são produzidos por células do parênquima lesado, pela cascata da coagulação e pela ativação do sistema complemento (MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007), que também contribui para o recrutamento de inúmeras células inflamatórias (HYNES, 2002; MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007).

As primeiras células que atuam na lesão são aquelas presentes no tecido lesado, como células de Langerhans da epiderme, linfócitos intra-epiteliais e macrófagos teciduais, que fagocitam as células danificadas e aquelas que sofreram necrose. Esses leucócitos também secretam citocinas inflamatórias e quimiocinas que atuam

nos vasos sanguíneos próximos à lesão e contribuem para o recrutamento de outras células (SIMPSON; ROSS, 1972). Estas regulam a reepitelização, a remodelação tecidual e angiogênese. Pela ação das citocinas e mediadores inflamatórios, os vasos sanguíneos passam a expressar moléculas de adesão (integrinas) específicas para as células imunes, que irão se ligar aos mesmos ao passarem pelo local. O fluxo sanguíneo diminuído pela vasodilatação, também em resposta a essas citocinas, contribuirá tanto para que essas células passem mais próximas às paredes dos vasos sanguíneos, quanto para que consigam migrar da luz dos vasos para o tecido adjacente (CHEN et al., 2001).

A migração celular é um dos primeiros sinais da atividade epitelial e ocorre aproximadamente 18 a 24 horas após a lesão, no homem (LI; CHEN et al., 2007). Nas primeiras 24 horas, há pequena reação inflamatória nas bordas da ferida, que se acentua com a exsudação de fluidos, depósito de fibrina e migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Esta fase da reação inflamatória aguda, ou seja, fase exsudativa, em resposta à lesão, precede a fase da demolição, na qual o coágulo sanguíneo é digerido por enzimas liberadas a partir da desintegração dos neutrófilos (LI; CHEN et al., 2007; CARDOSO; FAVORETO et al., 2011). Com 48 horas, o exsudato passa a ser constituído predominantemente por macrófagos, que digerem a fibrina restante, matriz extracelular danificada, hemácias e restos celulares. Sabe-se que os produtos das células lesadas, fibronectina e enzimas lisossomais dos neutrófilos, agem como substâncias quimiotáticas para esses macrófagos (WERNER; GROSE, 2003). Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, a população de linfócitos é uma das mais predominantes e crucial para a defesa do local lesado, que pode ficar exposto a diversos microrganismos (SIMPSON; ROSS, 1972). Isto ocorre pela presença de células de Langerhans e dendríticas que monitoram constantemente o microambiente da epiderme e derme, respectivamente. Estas células são capazes de fagocitar antígenos, transportá-los para os linfonodos drenantes regionais e apresentá-los às células T que, após serem ativadas, migram em grande quantidade para a pele (WOLLENBERG et al., 2002; CLARK, 2010). Além disso, em decorrência do próprio trauma ou da ativação celular, o microambiente tem sua composição físico-química alterada sendo esta também outra forma de sinalização para ativar as células envolvidas no reparo tissular (WERNER; GROSE, 2003).

Outra forma de sinalização é realizada pela ação das quimiocinas, que exercem papel fundamental na integração dos eventos inflamatórios e de reparo na cicatrização cutânea, pelo recrutamento de leucócitos para o local da lesão durante a resposta inflamatória (GILLITZER; GOEBELER, 2001). Animais deficientes de CXCR2 exibem dificuldades no recrutamento de neutrófilos, secreção alterada de IL-1 β , deficiência na reepitelização das feridas e diminuição da angiogênese, levando ao atraso do fechamento das lesões e evidenciando o papel relevante deste receptor na cicatrização de feridas cutâneas (DEVALARAJA et al., 2000). O receptor de quimiocinas CCR1 é pouco expresso em peles não feridas, mas sua expressão aumenta significativamente após indução de lesões cutâneas (KAESLER et al., 2004). Por outro lado, a quimiocina CCL6 parece exercer importante papel no reparo tecidual, já que sua expressão é aumentada em feridas cutâneas, sendo provavelmente responsável pelo grande influxo de macrófagos no sítio da lesão (KAESLER et al., 2002). Ainda há, após lesões cutâneas induzidas por queimaduras, aumento da expressão de CCL3, CCL2 e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), que contribuem para o recrutamento de monócitos para o local da ferida (HEINRICH et al., 2003). No entanto, embora seja detectado aumento destas quimiocinas, apenas animais deficientes de CCL2 apresentam alterações no processo cicatricial, com atraso na reepitelização, diminuição da angiogênese e da síntese de colágeno, embora o recrutamento de macrófagos não seja alterado pela ausência desta (ROBINSON; GRIMSHAW, 1975; GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Além do TNF- α , durante a cicatrização de feridas há aumento da expressão de IFN- γ (*Interferon gama*) por macrófagos e células T, com consequente aumento da expressão gênica de IL-12 e IL-18 (WERNER; GROSE, 2003; ISHIDA; KONDO et al., 2004). IFN- γ pode modular negativamente o processo cicatricial suprimindo a produção e atividade funcional de TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor-beta 1*). Desta forma, o bloqueio da via de sinalização de IFN- γ pode ser uma importante estratégia na indução de fechamento mais rápido de feridas cutâneas, por meio do aumento de produção de TGF- β 1 (SATISH; YAGER; WELLS, 2003; ISHIDA; KONDO et al., 2004; STURM; DIGNASS, 2008). Já foi demonstrado que várias propriedades pró-fibrinogênicas de TGF- β são devidas à indução de CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), proliferação de fibroblastos e produção de matriz extracelular (WANG et al., 2004; PARK et al., 2005). A quimiocina induzida por IFN-

γ , CXCL9, age como mediadora da comunicação derme/epiderme durante a cicatrização de lesões cutâneas (SATISH; YAGER et al., 2003). O TNF- α , que é produzido por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células T, mastócitos e queratinócitos (MORI et al., 2002) é responsável, juntamente à IL-1, pelo aumento significativo de moléculas de adesão na inflamação. Por outro lado, IL-10 e TGF- β são produzidas por macrófagos e células T para regular o processo inflamatório (WERNER; GROSE, 2003). O papel da IL-17 na inflamação ainda não foi completamente esclarecido, mas alguns efeitos da sua ativação vêm sendo delineados em modelos experimentais (YANG et al., 2008). A sua presença na resposta inflamatória está associada à elevada expressão de quimiocinas como CCL2, CCL7, CCL20 e metaloproteinases como MMP3 e MMP13. Em experimentos *in vivo* a presença de IL-17 foi relacionada ao aumento do infiltrado de leucócitos e expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (KOLLS; LINDEN, 2004; YANG; CHANG et al., 2008). Além disso, a IL-17 pode estar relacionada à síntese de colágeno do tipo I quando associada a TNF- α e IL-1 (CHEVREL; GARNERO; MIOSSEC, 2002; TODA et al., 2003).

Durante o processo de cicatrização também há contração da ferida. Os fibroblastos chegam até o local através dos vasos sanguíneos e são ativados por fatores de crescimento, como o PDGF e TGF- β . Essas células se proliferam nas margens, onde ocorre certo grau de hiperplasia, devido à grande quantidade de fatores de crescimento, liberados a partir das células exsudadas (GREEN et al., 2004). Acerca de uma semana após a lesão, por toda extensão da ferida são identificados fibroblastos que sintetizam colágeno para preencher o local e realizar o remodelamento tecidual. Pela ação do TGF- β alguns fibroblastos se transformam em miofibroblastos que, por possuírem capacidade de contração, contribuem para a aproximação das bordas das feridas (MARTIN, 1997). A síntese de colágeno pelos fibroblastos começa dentro de 24 horas após a lesão, mas não há deposição significativa no tecido antes do 3º ou 4º dia. São produzidos colágenos do tipo I e III, embora o tipo III seja o principal sintetizado. As fibras de colágeno se cruzam na linha da incisão e ajudam a unir as bordas aproximadamente ao final da primeira semana após a lesão. A quantidade de colágeno aumenta com o tempo e, por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar na matriz extracelular. O colágeno tipo I passa a predominar em relação ao tipo III, as fibras colágenas são

mais grossas e mais compactas e as novas fibras são orientadas de acordo com as linhas de estresse mecânico (LI; CHEN et al., 2007).

Além da fibrose tecidual, genes relacionados à migração e proliferação de leucócitos e queratinócitos modulam receptores de fatores de crescimento, integrinas, matriz extracelular e metaloproteinases para o fechamento da ferida e regeneração cutânea (SANTORO; GAUDINO, 2005). Dessa forma, várias citocinas, quimiocinas, proteínas de matriz extracelular e fatores de crescimento têm sua expressão diminuída ou aumentada durante a cicatrização. A expressão de metaloproteinases (MMP's) como MMP-2 e MMP-9 nestes tecidos é elevada, sendo que a presença destas proteases e de seus inibidores (TIMP's) é fator crucial na remodelação que ocorre após lesão do tecido cutâneo (YAGER; NWOMEH, 1999; LONDAHL et al., 2010).

1.3 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)

Os PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) são receptores nucleares com ampla variedade de efeitos sobre a resposta imune/inflamação, metabolismo, proliferação e diferenciação celular. PPARs pertencem à superfamília de receptores nucleares de hormônios que inclui esteróides, vitamina D, ácido retinóico e hormônios da tireóide (LAUDET et al., 1992; DESVERGNE; WAHLI, 1999). Até o momento, três isoformas de PPAR foram identificadas: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3) (DREYER et al., 1992). Essas isoformas possuem alta homologia, mas são codificadas por genes independentes, em cromossomos distintos, sendo únicas em seu padrão quantitativo de distribuição nos tecidos (KLIEWER et al., 1994; BRAISSANT et al., 1996). Todos os receptores pertencentes a essa superfamília compartilham a propriedade de formar heterodímero com outro receptor nuclear do mesmo subgrupo, o receptor 9-cis do ácido retinóico (RXR; NR2B) e este fato está associado a diversas funções bioquímicas de PPARs (MIYATA et al., 1994). Quando ocorre formação do complexo PPAR-RXR, pode haver regulação positiva ou negativa da expressão de genes por ligação a PPRES (*PPAR response elements*) (TUGWOOD et al., 1992; MIYATA; MCCAWE et al., 1994; JONES; DING; DAYNES, 2002). Estes PPRES são encontrados em regiões promotoras de muitos genes alvos regulados por PPAR (GERVOIS et al., 1999; MASCARO et al., 1999) (Figura 2).

Figura 2. Esquema de ativação de *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPARs) por ligantes específicos. Após formação do complexo PPAR-RXR pode ocorrer regulação positiva ou negativa da expressão de genes por ligação a PPRES (*peroxisome proliferator response element*). Adaptado de KUENZLI, S.K. e SAURAT, J.H. (2003 p.230)

PPAR α , o primeiro a ser clonado, é conhecido por regular o catabolismo de ácidos graxos e aumentar a transcrição de genes envolvidos no transporte intracelular de ácidos graxos para peroxissomos e mitocôndria durante a β -oxidação (DESVERGNE; WAHLI, 1999). Trabalhos recentes sugerem que o PPAR α esteja envolvido não somente no metabolismo de lipídios, mas também de carboidratos e aminoácidos (KERSTEN; DESVERGNE; WAHLI, 2000; KERSTEN et al., 2001). PPAR α é alvo de uma classe de drogas conhecidas como fibratos, tais como Gemfibrozil e Fenofibrato, que são clinicamente utilizados para o tratamento de hipertrigliceridemia e diabetes mellitus, seguros e bem tolerados pelos pacientes (ISSEMAN; GREEN, 1990; FORMAN; CHEN; EVANS, 1997; LEHMANN et al., 1997; BARISH; NARKAR; EVANS, 2006; BENSINGER; TONTONZOZ, 2008). PPAR γ regula a adipogênese, promovendo o estoque de lipídeos por estimular a expressão de CD36, aumentando assim a diferenciação de adipócitos e a transcrição de genes que são importantes para lipogênese. Estes fatores estão diretamente envolvidos em diversos processos bioquímicos, incluindo sensibilização à insulina e diferenciação celular (KERSTEN; MANDARD et al., 2001). PPAR β/δ são expressos ubiquamente e apresentam um importante papel na regulação da energia da homeostase, termogênese, proliferação e diferenciação de queratinócitos, bem

como na estimulação da β -oxidação de ácidos graxos e reversão do transporte de colesterol (BARISH; NARKAR et al., 2006). PPAR α e γ são expressos por macrófagos, células dendríticas (DCs), linfócitos T e B (DELERIVE et al., 1999; GOSSET et al., 2001; HARRIS; PHIPPS, 2001; JONES; DING et al., 2002) (CLARK, 2002; NARALA et al., 2010; WAGNER et al., 2010), sugerindo que estes receptores possam estar envolvidos em diferentes aspectos da imunorregulação, por meio de sua habilidade de regular a energia e homeostase, composição da membrana lipídica, proliferação celular, sensibilidade à apoptose e modulação dos vários fatores de transcrição, tais como AP-1, NFAT, STATs e NF- κ B (JONES; DING et al., 2002). A regulação negativa da atividade desses fatores de transcrição é mediada por um mecanismo chamado transrepressão, no qual receptores nucleares de hormônios ativados antagonizam várias vias de transdução de sinais por mecanismos dependentes e independentes da interação com o DNA (JONES; DING et al., 2002).

Vários tipos de ácidos graxos podem ligar-se naturalmente e ativar PPARs, incluindo alguns eicosanóides, que são derivados do metabolismo do ácido araquidônico, como leucotrienos (LTs), ácidos hidroxi-eicosatetraenóico (HETEs) e prostaglandinas (PGs). PPAR γ é melhor estimulado por 9-HODE (ácido hidroxil-octadeca-9Z,11E-dienóico), 13-HODE e 15-deoxi- Δ -prostaglandina J2 (15dPGJ2) (KLIEWER et al., 1995). Recentemente foi demonstrado *in vitro* que 15dPGJ2 é produzida em grande quantidade por macrófagos (SHIBATA et al., 2002), comprovando a hipótese de que há ligantes endógenos para tal receptor. PPAR α pode ser ativado seletivamente por leucotrieno B4 (LTB4) e 8(S) HETE. Além disso, a ativação de PPAR α por LTB4 pode ocorrer como autorregulação da atividade pro-inflamatória deste tipo de leucotrieno (NARALA; ADAPALA et al., 2010), que parece exercer papel fundamental no reparo tecidual, de acordo com nossos estudos prévios (manuscrito submetido). De forma interessante, todas as três isoformas de PPAR podem participar na regulação da resposta inflamatória. Dependendo do tecido afetado e da isoforma envolvida, esses receptores nucleares podem modular a intensidade, duração e consequências de eventos inflamatórios.

A ativação de PPAR α com ligante sintético pode inibir a produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ por linfócitos TCD4⁺ ativados por induzir produção de IL-4 em células do

baço, sugerindo a habilidade destes agonistas de levar a um fenótipo tipo Th2 (MARX et al., 2002; LOVETT-RACKE et al., 2004; NARALA; ADAPALA et al., 2010). Além disso, já foi observado que a administração oral de agonistas de PPAR α pode prevenir o desenvolvimento de encefalite autoimune experimental (EAE, “*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*”) (LOVETT-RACKE; HUSSAIN et al., 2004; GOCKE et al., 2009). Os agonistas de PPAR α podem regular parcialmente a inflamação por sustentar a expressão do regulador negativo I κ B α , por meio da prevenção da translocação nuclear e ativação de NF- κ B, um dos principais fatores de transcrição envolvidos na iniciação da resposta imunológica pro-inflamatória (DELERIVE; DE BOSSCHER et al., 1999; JONES; DING et al., 2002). Neste contexto, experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando agonistas isoforma-específicos e animais geneticamente deficientes em PPAR demonstram que a ativação deste receptor nuclear pode regular negativamente a inflamação (DEVCHAND et al., 1996; STAELS et al., 1998).

Recentemente, foi demonstrado o envolvimento desses receptores no controle do metabolismo e na regulação das diferentes fases do reparo tecidual cutâneo (WAHLI, 2002). Alguns trabalhos utilizaram como modelos experimentais animais geneticamente deficientes de PPAR e sugeriram que estes receptores, em especial PPAR α , exercem função relevante na cicatrização da pele (DEVCHAND; KELLER et al., 1996; STAELS; KOENIG et al., 1998). Porém, os mecanismos precisos e o papel exato de PPAR α na modulação da resposta imunoinflamatória na cicatrização ainda são pouco conhecidos. Além disso, estudos sobre a utilização de agonistas e antagonistas de PPAR α por via sistêmica (oral) ou tópica como possível nova abordagem terapêutica para o reparo tecidual são incipientes ou até mesmo inexistentes. Logo, sabendo que alterações na fase inflamatória da cicatrização podem levar a deficiências no processo de reparo, como em pacientes com úlceras de pressão e diabéticos (LONDAHL; KATZMAN et al., 2010) e tendo em vista a importante participação de PPAR como modulador de vários processos inflamatórios, é sugerido que a ativação deste receptor possa interferir no curso do reparo tecidual cutâneo. Dessa forma, com o intuito de verificar a importância de PPAR α na cicatrização de feridas da pele, buscamos avaliar, no presente trabalho, a modulação do reparo tecidual cutâneo após ativação deste receptor por seu agonista Gemfibrozil. Sendo assim, a elucidação do papel de PPAR α na cicatrização

de lesões pode se constituir em uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de tratamento de feridas, como aquelas de difícil cicatrização em pacientes portadores de diabetes, úlceras de decúbito, queimaduras, reparo tecidual pós-cirúrgico e elucidação de processos cicatriciais desregulados como cicatrizes hipertróficas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a participação do receptor PPAR α na cicatrização de feridas cutâneas induzidas experimentalmente.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o fechamento macroscópico das feridas após a ativação de PPAR α pela via sistêmica ou tópica.
- Avaliar as alterações metabólicas consequentes das lesões cutâneas e/ou do tratamento pela via sistêmica ou tópica com agonista de PPAR α .
- Verificar a influência da ativação de PPAR α na resposta inflamatória e infiltração leucocitária no local da ferida e linfonodos drenantes durante o reparo tecidual em camundongos tratados com agonistas pela via sistêmica ou tópica.
- Analisar a fibrose durante o reparo tecidual após a indução de feridas cutâneas e ativação tópica de PPAR α .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para realização do projeto foram utilizados camundongos da linhagem 129/SvEv, fêmeas, selvagens, entre 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas. Estes animais foram divididos em grupos, sendo um tratado com o fármaco Gemfibrozil (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*), agonista de PPAR α ; identificado nos resultados como grupo “GEM” e o grupo tratado apenas com o veículo; identificado como “VEI”. Além disso, estes grupos foram subdivididos e nomeados de acordo com a via de administração (oral ou tópica) e de acordo com a cinética da eutanásia, para avaliação do fechamento das feridas em 0h, 24h, 48h, 120h e 240h pós-cirúrgico (p.c.). Para cada grupo foram selecionados aleatoriamente 5 animais (n=5) e os experimentos foram repetidos no mínimo 2 vezes para se verificar a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, todos os experimentos foram desenvolvidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, com número de protocolo 11.1.523.53.7) (Anexo 1). Os camundongos foram obtidos e mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCRP-USP.

3.2 Indução das feridas cirúrgicas

Para realização das feridas, os animais foram pesados, anestesiados com cloridrato de quetamina-100 mg/Kg (*Happyvet-Pharma, Buenos Aires, Argentina*) e cloridrato de xilazina-10 mg/Kg (*Virbac do Brazil, São Paulo, Brasil*), depilados e logo em seguida foram realizadas incisões na pele do dorso dos camundongos respeitando o plano anatômico areolar em nível supra facial. A área destas incisões era elíptica, previamente delimitada por um carimbo de aproximadamente 19 mm², que pela fórmula de Meeh (GILPIN, 1996; CHEUNG et al., 2009) correspondia a 3% da área corporal total do camundongo utilizado para o estudo. Todos os materiais

usados na cirurgia foram desinfetados e os procedimentos cirúrgicos realizados em capela de fluxo laminar horizontal. Ao fim do procedimento cirúrgico, cada camundongo foi colocado em uma gaiola individual esterilizada sem maravalha, para evitar possíveis infecções e dessa forma os animais permaneceram até o momento da eutanásia. Os camundongos foram monitorados durante toda a recuperação anestésica em uma sala com pouca luz e silenciosa.

3.3 Administração do agonistas de PPAR α e dos veículos

O agonista de PPAR α (Gemfibrozil) foi administrado por duas vias, sistêmica (oral, por gavagem) ou tópica, a fim de se estabelecer a forma de administração que resultava em melhor prognóstico do fechamento das feridas com redução de efeitos adversos. Para a determinação das melhores doses a serem administradas pelas duas vias, foram realizados experimentos de dose-resposta (Tabela 1). Os dados obtidos foram comparados considerando-se o fechamento macroscópico das lesões com o grupo que recebia apenas o respectivo veículo. Para administração do fármaco foram utilizados como veículos os géis de carboximetilcelulose a 1,5% e hidroxietilcelulose a 1%, para os tratamentos por via oral e tópica respectivamente. Logo após a indução das feridas os animais foram tratados por gavagem ou com aplicação tópica da droga diariamente no mesmo horário até o momento da eutanásia como demonstrado na Tabela 2 e Figura 3.

Tabela 1. Descrição resumida dos grupos pilotos:

Identificação do Experimento	Quantidade de animais por grupo	Grupos	Período de Experimentação
Grupo piloto oral	3	Veículo carboximetilcelulose 1,5% (VEI)	240h (10 dias)
		10 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		50 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		100 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		200 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
Grupo piloto tópico	3	Veículo hidroxietilcelulose 1% (VEI)	240h (10 dias)
		10 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		50 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		100 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	
		200 mg/Kg/dia de Gemfibrozil	

Tabela 2. Descrição resumida dos grupos experimentais:

Identificação do Experimento	Quantidade de animais por grupo	Tratamento	Momento da eutanásia
Grupo Oral	5	Veículo carboximetilcelulose 1,5% (VEI)	0h (Tecido íntegro)
			24h (1 dia)
			48h (2 dias)
			120h (5 dias)
			240h (10 dias)
		Gemfibrozil 100 mg/Kg/dia GEM	0h (Tecido íntegro)
			24h (1 dia)
			48h (2 dias)
			120h (5 dias)
			240h (10 dias)
Grupo Tópico	5	Veículo hidroxietilcelulose 1% (VEI)	0h (Tecido íntegro)
			24h (1 dia)
			48h (2 dias)
			120h (5 dias)
			240h (10 dias)
		Gemfibrozil 50 mg/Kg/dia GEM	0h (Tecido íntegro)
			24h (1 dia)
			48h (2 dias)
			120h (5 dias)
			240h (10 dias)

Figura 3. Esquema representativo da indução de feridas, tratamento e eutanásia para coleta das amostras. As feridas foram induzidas no momento inicial (0h), quando foi iniciado o tratamento com o agonista de PPAR α , gemfibrozil, ou apenas o veículo (setas). A eutanásia e coleta das amostras dos animais foram realizadas nos períodos indicados na figura (Coleta amostra”). p.c. = pós-cirúrgico.

3.4 Análise macroscópica da evolução das feridas

A regressão das feridas e o processo cicatricial foram acompanhados sistematicamente, através dos aspectos macroscópicos, como edema e formação de fibrina. Para a quantificação das áreas das mesmas, foram realizados registros fotográficos diários e a análise morfométrica para o cálculo das áreas foi realizada por meio do programa *ImageJ* (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

3.5 Análise do peso dos animais

Além da análise macroscópica, todos os animais foram pesados diariamente para avaliar a influência sistêmica da indução de feridas e/ou do tratamento no peso dos camundongos durante a cicatrização. Para isto, o peso de cada animal foi calculado a partir de sua massa corporal no momento da indução da ferida e representado nos gráficos por variação do peso inicial em porcentagem.

3.6 Eutanásia dos camundongos e coleta do material

Para coleta do material da área ferida, os animais foram eutanasiados com gás carbônico (CO₂), nos 5 momentos pós-cirúrgicos já descritos anteriormente. O material coletado das lesões foi embebido em meio de conservação de RNA (Trizol),

em meio de cultura RPMI para citometria (linfonodos e pele), fixado em formaldeído 10% para posterior inclusão em parafina ou ainda, congelado para os ensaios de mieloperoxidase (MPO), N- Acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo peroxidase (EPO). Além do material das feridas, foi coletado o sangue dos animais para a quantificação da glicemia, dosagem de triglicérides e alanina transaminase (ALT) sérica, como descrita abaixo.

3.7 Análise histopatológica

A avaliação histológica e a observação da morfologia do infiltrado inflamatório foram realizadas após coloração de lâminas com hematoxilina & eosina (HE) ou picrosírius vermelho. Inicialmente, as amostras foram fixadas em PBS/formaldeído 10% e, após 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e xilol. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina e cortes de 5 µm de espessura dos tecidos foram obtidos com o auxílio de micrótomo. Em seguida os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%) até em água corrente. Para coloração com H&E, os cortes foram então corados com Hematoxilina e Eosina, desidratados com concentrações crescentes de álcool (de 70% ao absoluto), lavados com xilol e montados em lamínula e Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). Já para coloração com picrosírius vermelho, os cortes foram colocados em solução de ácido fosfomolibdico a 2% por 2 minutos e lavados novamente em água corrente. Em seguida, estes foram colocados em solução vermelho da Síria a 0,1% por 90 minutos, lavados em água corrente, e passados pelo HCl 0,01M por 2 minutos e lavados novamente em água corrente. Por último, foram desidratados, diafanizados e as lâminas foram montadas com o mesmo Bálsamo do Canadá. A análise qualitativa das amostras foi realizada e as imagens dos cortes histológicos foram capturadas em microscópio de luz convencional Leica (Leica DMR; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Para avaliação da produção de colágeno nas feridas em cicatrização, as imagens dos cortes corados por Picrosírius foram capturadas em luz polarizada e as análises comparativas foram descritas por um patologista.

3.8 Determinação da glicemia

A determinação diária de glicemia foi realizada utilizando kits para dosagem de glicose sérica da Optium Medisense (*Abbott Diabetes Care Ltd., South Loop Road Alameda, USA*). Para isto, era realizada a assepsia da ponta da cauda dos camundongos e, logo em seguida, um pequeno corte para a coleta de uma gota de sangue colocada diretamente na tira de dosagem do kit. Quando a amostra é aplicada na tira-teste, a glicose presente no sangue reage com os produtos químicos contidos na mesma, produzindo uma pequena corrente elétrica. Esta corrente é medida e o resultado é mostrado pelo monitor, sendo que a intensidade da corrente é proporcional à quantidade de glicose presente na amostra de sangue.

3.9 Dosagem de triglicérides sérico

Para a quantificação de triglicérides sérico foi utilizado kit de dosagem da Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este kit utiliza um sistema enzimático para determinação dos triglicérides presentes nas amostras. Assim, ao colocar as amostras de soro em contato com as enzimas do teste, se houver a presença de triglicérides, o produto final da reação produz uma intensidade de cor vermelha lida em absorvância de 505nm.

3.10 Dosagem da alanina transaminase (ALT)

Para a quantificação da ALT também foi utilizado kit de dosagem da Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O teste quantifica por absorvância em 340nm o produto da reação enzimática entre a enzima presente nas amostras e os reagentes químicos presentes no teste. Seguindo as recomendações do fabricante, foi utilizado o soro dos animais coletado logo após a eutanásia.

3.11 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Para quantificação de neutrófilos, foi avaliada a atividade da enzima MPO no tecido íntegro (0h) e em cicatrização. Segmentos de pele foram cortados em pequenos pedaços, pesados e imersos em solução tampão contendo fosfato de sódio e EDTA para homogeneização. Em seguida, o tecido foi centrifugado a 600 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensão por agitação no vórtex em solução tampão contendo fosfato de sódio e EDTA, sendo em seguida adicionada solução de NaCl 0,2% gelada para lisar as hemácias. O *pellet* obtido após centrifugação foi ressuspensão em solução tampão contendo fosfato de sódio e o detergente H-TAB (Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Para finalizar a extração das proteínas, a amostra foi congelada e descongelada 3 vezes e centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático, realizado em placas de 96 poços, contendo 25 µl de amostra e revelada pela adição de TMB (3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.12 Ensaio de N- Acetilglicosaminidase (NAG)

O sobrenadante final do ensaio de MPO também foi utilizado para quantificação de macrófagos nas feridas, verificada pela atividade da enzima N-Acetilglicosaminidase (NAG) no tecido íntegro (0h) e em cicatrização. Para isto, foram utilizados 25 µL deste sobrenadante que foram colocados em placas de 96 poços. Nesses poços foram adicionados 25 µl de solução 2,24 mM de NAG (p-nitrophenyl-2-acetamide-β-D-glucopiranoside) (Sigma-Aldrich) e 100 µl de tampão citrato (50 mM, pH 4,5). A seguir, foram incubadas a 37° C durante 60 minutos. Por último, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina (200 mM, pH 10.4), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

3.13 Ensaio de eosinófilo peroxidase (EPO)

Para quantificação de eosinófilos, foi avaliada a atividade da enzima EPO no tecido íntegro (0h) e em cicatrização. Para tal, os tecidos foram removidos, pesados e ressuspensos em tampão *Hanks* (Sigma-Aldrich) sem vermelho de fenol, contendo 10 mM de Hepes (Sigma-Aldrich) e então homogeneizados. Esta suspensão resultante foi novamente centrifugada a 1950 g por 10 min e o *pellet* ressuspenso em tampão Hanks contendo 0,5% de H-TAB. Foi realizado choque térmico das amostras seguido por centrifugação, sendo o sobrenadante utilizado para as reações. As amostras foram incubadas, em placas de 96 poços, com OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão Tris/HCl 0,05 mM e H₂O₂ durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4M e a absorbância determinada em 492 nm.

3.14 Separação de células para citometria de fluxo

A análise quantitativa e fenotípica das células extraídas das amostras de pele do local da ferida e dos linfonodos drenantes (linfonodos axilares) foi realizada por citometria de fluxo. Para tal, os tecidos retirados das feridas foram incubados com meio incompleto, RPMI 1640, (Gibco, Grand Island, NY, USA) e a enzima liberase (50 µg/mL) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) a 37° C durante 2 horas. Após a incubação, estes foram colocados em trituradores (Medcons - BD Biosciences, San Jose, CA, USA) juntamente com RPMI 1640 enriquecido com 5% de SBF e triturados na Medmachine (BD Biosciences) por 4 minutos. O líquido foi aspirado com uma seringa de 1mL, filtrado duas vezes, primeiramente em *cell strainers* (BD Biosciences) e em seguida em *filcons* (BD Biosciences). Por último, a suspensão celular foi centrifugada à 500 x g, por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 2mL de PBS EDTA, homogeneizado e centrifugado novamente. O *pellet* formado foi ressuspenso com RPMI 1640 enriquecido com 5% de SBF e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Para a fenotipagem das células dos linfonodos drenantes, os mesmos foram retirados, macerados e filtrados com RPMI 1640 em *cell strainers* (BD Biosciences). A suspensão celular foi centrifugada

à 500 x g, por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* formado foi ressuspensão em meio completo e as células também foram contadas em câmara de Neubauer.

3.15 Citometria de fluxo

Para caracterização fenotípica das células extraídas das amostras de pele do local da ferida e dos linfonodos drenantes, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS1X Molico® 1% (para bloquear ligações inespecíficas) por 20 minutos a 4°C. Em seguida, foram adicionados anticorpos monoclonais específicos aos marcadores CD11b e CD11c (macrófagos e dendríticas); CD3, CD4, CD8 e $\gamma\delta$ (linfócitos T CD4, TCD8 ou T $\gamma\delta$ respectivamente); CD4 e CD25 (células T reguladoras) conjugados com PE, PerCP, PE-Cy7 ou FITC por 30 minutos a 4°C (BD Biosciences, San Diego, EUA). Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas com PBS1X. Para a marcação de moléculas intracelulares, CTLA-4 e Foxp3, as células anteriormente marcadas com anti-CD4 e anti-CD25 foram incubadas por 11 minutos, no gelo e no escuro com PBS1x/Formaldeído 4% para fixação das mesmas. As células foram lavadas com PBS1x e incubadas por 20 minutos, no escuro com tampão de permeabilização (PBS1x + 1% de SFB + 0,1% de azida sódica + 0,2% de saponina), seguida de nova incubação de 30 minutos, no escuro, com anticorpos para CTLA-4 e Foxp3 (BD Biosciences). Após a incubação as células foram novamente lavadas com PBS1x, centrifugadas e adicionado PBS1x/formaldeído 1% para fixação. Logo após, os leucócitos foram adquiridos em FACScalibur (Becton & Dickson®, San Jose, CA, USA) e as análises foram feitas usando o software FlowJo 7.6.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.16 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa “Prisma” versão 5 da *Graphpad* (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal utilizando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando a distribuição dos dados foi considerada normal e com variância homogênea foi utilizado o teste “*t*” paramétrico não pareado (*Unpaired t test*), com resultados expressos em média $\pm$

erro padrão da média (EPM). Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da melhor dose para o tratamento oral com o agonista de PPAR α

Para determinar qual seria a melhor dose utilizada por via oral para o tratamento das lesões cutâneas, optamos por realizar um experimento piloto, com as doses de 10mg/Kg, 50mg/Kg, 100mg/Kg ou 200mg/Kg dia (Fig. 4A). Os resultados mostraram que os animais tratados com veículo obtiveram melhor fechamento macroscópico quando comparado aos camundongos tratados com 10mg/Kg dia de GEM (Fig. 4B). A dose de 50mg/Kg dia de GEM apresentou resultado similar ao do grupo VEI (Fig. 4C). As doses de 100mg/Kg e 200mg/Kg dia de GEM apresentaram melhor fechamento macroscópico quando comparado ao grupo que recebeu veículo (Fig. 4D e E). Porém, a dose escolhida a partir dos resultados deste experimento foi de 100mg/Kg/dia, pois esta induziu melhor cicatrização das lesões cutâneas quando comparadas ao grupo controle, que recebeu apenas o veículo (grupo VEI) (Fig. 4D).

Figura 4. Determinação da melhor dose do agonista de PPAR α para o tratamento por via oral. Os camundongos foram feridos, divididos em grupos e tratados por gavagem com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil, (10mg/Kg, 50mg/Kg, 100mg/Kg ou 200mg/Kg por dia) e comparados ao grupo tratado somente com o veículo (carboximetilcelulose 1,5%). Os animais foram acompanhados diariamente por meio de documentação fotográfica digital durante 10 dias (240h). As áreas das lesões foram quantificadas por meio do programa *ImageJ* em imagens previamente calibradas. VEI = veículo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 1 experimento independente. n= 3 animais por grupo.

4.2 Influência da ativação de PPAR α por via oral no fechamento macroscópico de feridas cutâneas

Com o objetivo de avaliar a influência da ativação sistêmica de PPAR α na cicatrização de feridas da pele, foram realizados os grupos tratados por via oral com GEM na dose escolhida (100 mg/Kg/dia) ou tratados apenas com o veículo (carboximetilcelulose a 1,5%). Os resultados destes experimentos mostraram que o agonista de PPAR α atuou principalmente no início do processo de cicatrização, pois comparando-se os dois grupos, o grupo tratado com o agonista de PPAR α por via oral apresentou fechamento macroscópico das feridas significativamente maior em 24, 48 e 72 horas após a cirurgia (Fig. 5A e B).

Figura 5. Influência do tratamento oral com o agonista de PPAR α no fechamento de feridas cutâneas. Lesões com áreas previamente delimitadas foram realizadas no dorso de camundongos que foram tratados por via oral com o agonista de PPAR α (100mg/Kg/dia) para avaliação do processo cicatricial. As feridas foram medidas e fotografadas diariamente nos tempos de 0h, 24h, 48h, 120h e 240h pós-cirúrgico (p.c.). Nota-se em (A) fechamento mais rápido das feridas em 24h, 48 e 72h (p.c.) nos camundongos tratados quando comparados aos camundongos que receberam apenas veículo e em (B) quantificação das áreas das feridas. VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.3 Variação do peso corporal após indução das feridas cutâneas e tratamento oral com o agonista de PPAR α .

Após a indução das lesões, o peso dos animais foi monitorado diariamente para avaliar a influência sistêmica da indução de feridas e/ou do tratamento durante a cicatrização. Os camundongos dos dois grupos apresentaram redução de peso às 24h, 48h, 72h, 96h e 120h p.c. e estas diferenças foram estatisticamente significantes em 24h e 48h p.c. em comparação ao peso no momento inicial (0h). Logo após 120h p.c. (5 dias) foi possível notar que os pesos dos camundongos de ambos os grupos retornaram ao valor inicial e que, apesar de não ser estatisticamente significativo, os animais que receberam apenas o veículo (grupo VEI) possuíram tendência ao aumento de peso após 5 dias de tratamento (Fig.6).

Figura 6. Variação do peso corporal após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α . Os animais tratados com o agonista de PPAR α (100mg/Kg/dia de Gemfibrozil) ou apenas com o veículo (VEI) por via oral e foram avaliados quanto à variação de peso em relação ao momento inicial (0h). VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.4 Alterações metabólicas após indução das feridas e ativação sistêmica de PPAR α

A partir dos resultados obtidos em relação à variação dos pesos dos animais, decidimos avaliar melhor as alterações sistêmicas ocorridas após a lesão cutânea e tratamento oral com Gemfibrozil. Em relação aos triglicérides sanguíneos, os dois grupos não apresentaram diferenças significativas entre eles (Fig.7A), demonstrando que o tratamento não influenciou na concentração sérica de triglicérides. No entanto, os resultados mostraram que o modelo de indução de feridas utilizado no projeto não induz apenas uma resposta inflamatória no local das lesões, mas também alteração metabólica sistêmica, visualizada pela queda significativa de triglicérides após 24h, 48h e 120h p.c. independentemente da ativação de PPAR α . Ainda, a dose oral utilizada não foi capaz de gerar diferenças significativas entre os grupos em relação ao metabolismo de glicose sanguínea e a função hepática, identificadas pela determinação da glicemia e da enzima ALT (alanina transaminase) sérica (Fig.7B e C, respectivamente).

Figura 7. Avaliação da concentração sérica de triglicérides, da glicemia e da função hepática após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α . Durante o processo de cicatrização das feridas (0 a 240h), os animais tratados com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil (GEM) ou veículo (VEI) por via oral, foram avaliados quanto à variação de triglicérides, glicemia e da concentração da enzima ALT (alanina transaminase) no sangue periférico. VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.5 Análise histopatológica das feridas após tratamento oral com o agonista de PPAR α .

Para avaliar as alterações histológicas das lesões em cicatrização após tratamento oral com GEM, os tecidos foram processados, submetidos à coloração com H&E ou picrosírius e logo após analisados qualitativamente. Desta maneira, foi possível visualizar a formação de tecido reacional espesso com intensa resposta inflamatória e produção de fibrina, além da presença de rede de vasos sanguíneos congestionados e grande quantidade de células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos e outros polimorfonucleares em 48h e 240h p.c. em ambos os grupos. A presença de fibroblastos intercalados por fibras de colágeno só foi melhor evidenciada após 240h p.c., caracterizando sinais de reparo tecidual, em ambos os grupos (Fig. 8). Contudo, microscopicamente, não houve diferença significativa entre as feridas após indução e tratamento oral com o agonista de PPAR α ou veículo.

Figura 8. Aspectos microscópicos das feridas após 48h ou 240h de lesão e tratamento oral com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil. O infiltrado inflamatório, formação de tecido reacional e produção de fibrina foram visualizados nos tecidos processados, incluídos em parafina e corados por HE. Aumento original 5X, barra=400 μ m e aumento de 20X, barra de aumento = 100 μ m.

4.6 Quantificação da atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α

Tendo em vista o intenso infiltrado inflamatório nas feridas pós-lesão, buscamos quantificar a atividade de células da resposta imune inata envolvidas no reparo tecidual. Ao avaliar a quantidade de neutrófilos pelo ensaio enzimático de mieloperoxidase (MPO), foi detectada menor quantidade dessas células às 24h p.c. nas feridas dos animais tratados com o fármaco quando comparadas às dos camundongos tratados com o veículo, apesar de não ter sido estatisticamente significativo (Fig. 9A). Ambos os grupos apresentaram acúmulo desses granulócitos no decorrer do processo de cicatrização, embora a ativação de PPAR α por via oral não tenha exercido grande influência no seu infiltrado local (Fig. 9A).

Já em relação aos macrófagos, houve crescente acúmulo dessas células nas feridas no decorrer no processo de cicatrização. Os animais tratados com GEM apresentaram, aparentemente, menor quantidade dessas células, visualizado pela menor atividade de N- acetilglicosaminidase (NAG) 240h p.c. em relação ao grupo tratado com veículo (Fig. 9B).

Ambos os grupos apresentaram aumento de eosinófilos após 48h p.c., porém, não houve diferença na quantidade de eosinófilos entre os grupos durante o tempo de cicatrização avaliado, embora tenha sido visível um pico de eosinófilo-peroxidase (EPO) às 120h p.c. (Fig. 9C).

Figura 9. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N- Acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento oral com o agonista de PPAR α . Parte das feridas de ambos os grupos, tratados com Gemfibrozil (GEM) ou veículo (VEI) por via oral, foi coletada às 0h, 24h, 48h, 120h e 240h (p.c.) e triturada para a realização dos ensaios enzimáticos MPO, NAG e EPO, que determina a atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no tecido, respectivamente. O resultado foi expresso em densidade ótica (DO) das reações com leitura em 450, 405 e 492 nm por miligrama de tecido, respectivamente. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.7 Determinação da melhor dose para o tratamento tópico

Para determinar a melhor dose para o tratamento tópico foi também realizado um experimento piloto, com as 4 doses (10mg/Kg, 50mg/Kg, 100mg/Kg ou 200mg/Kg dia) do agonista PPAR α (Gemfibrozil) descritas anteriormente (Fig. 10A). Após tratamento com a dose de 10mg/Kg dia os animais apresentaram fechamento mais rápido das lesões, principalmente no final do período avaliado (Fig. 10B). Ainda, os camundongos tratados com 100mg/Kg (Fig. 10D) ou 200mg/Kg (Fig. 10E) também apresentaram fechamento mais rápido da lesão quando comparados ao grupo que recebeu apenas veículo. Entretanto, a dose escolhida a partir dos resultados macroscópicos das lesões foi de 50mg/Kg/dia, pois esta induziu melhor cicatrização das lesões cutâneas quando comparada às demais doses e ao grupo controle (Fig. 10C).

Figura 10. Determinação da melhor dose do agonista de PPAR α para o tratamento por tópico. Os camundongos foram feridos e divididos em grupos e tratados no local da lesão com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil, (10mg/Kg, 50mg/Kg, 100mg/Kg ou 200mg/Kg por dia) e comparados ao grupo tratado somente com o veículo (hidroxietilcelulose 1,0%). Os animais foram acompanhados diariamente por meio de documentação fotográfica digital durante 10 dias (240h). As áreas das lesões foram quantificadas por meio do programa *ImageJ* em imagens previamente calibradas. VEI = veículo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 1 experimento independente. n= 3 animais por grupo.

4.8 Influência da ativação local de PPAR α no processo de cicatrização

Logo em seguida, foram realizados os grupos tratados por via tópica com 50mg/Kg do agonista de PPAR α ou veículo (hidroxietilcelulose a 1%). Os camundongos tratados com Gemfibrozil apresentaram fechamento macroscópico mais rápido das feridas em todos os tempos avaliados (Fig. 11A e B). Além disso, foram visualizados menor edema, menor formação de fibrina e maior contração da ferida nos camundongos tratados com GEM quando comparado aos animais do grupo VEI (Fig. 11A).

Figura 11. Influência do tratamento tópico com o agonista de PPAR α . Lesões com áreas previamente delimitadas foram realizadas no dorso de camundongos que foram tratados no local da lesão com o agonista de PPAR α (50mg/Kg/dia) para avaliação do processo cicatricial. As feridas foram medidas e fotografadas diariamente nos tempos de 0h, 24h, 48h, 120h e 240h pós-cirúrgico (p.c.). Nota-se em (A) fechamento mais rápido das feridas nos camundongos tratados em todos momentos avaliados quando comparados aos camundongos que receberam apenas veículo e em (B) quantificação das áreas das feridas. VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.9 Variação do peso corporal após indução das feridas cutâneas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α .

Após a indução das lesões, os camundongos apresentaram redução significativa de peso, em especial às 24h e 48h p.c. em comparação com o peso no momento inicial (0h), sendo este efeito independente da ativação de PPAR α . Mas diferentemente dos grupos tratados por via oral, os pesos dos camundongos de ambos os grupos retornaram ao valor inicial somente após 240h (10 dias) de tratamento (Fig.12).

Figura 12. Variação do peso corporal após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α . Os animais tratados com o agonista de PPAR α (50mg/Kg/dia de Gemfibrozil) ou apenas com o veículo (VEI) no local da lesão e foram avaliados quanto à variação de peso em relação ao momento inicial (0h). VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.10 Alterações metabólicas após indução das feridas e ativação tópica de PPAR α

Ao avaliar a reação sistêmica por meio da concentração sérica de triglicérides, da glicemia e da função hepática após a lesão cutânea e o tratamento tópico com o Gemfibrozil, verificamos que novamente não havia diferença significativa entre os grupos (Fig. 13A). No entanto, mais uma vez os resultados mostraram que o modelo de indução de feridas utilizado no projeto não induz apenas uma resposta inflamatória no local das lesões, mas também alteração metabólica sistêmica, visualizada pela queda de triglicérides durante 24h, 48h, 120h e 240h p.c. em ambos os grupos, independentemente do tratamento. Ainda, as feridas ou a dose tópica utilizada para ativar PPAR α localmente não foram capazes de gerar diferenças significativas entre os grupos em relação ao metabolismo de glicose sanguínea ou em relação à indução de danos hepáticos (Fig. 13B e C, respectivamente).

Figura 13. Avaliação da concentração sérica de triglicérides, da glicemia e da função hepática após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α . Durante o processo de cicatrização das feridas (0 a 240h), os animais tratados com o agonista de PPAR α , Gemfibrozil (GEM) ou veículo (VEI) no local da lesão, foram avaliados quanto à variação de triglicérides, glicemia e da concentração da enzima ALT (alanina transaminase) no sangue periférico. VEI = veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.11 Análise histopatológica das feridas após indução e tratamento tópico com o agonista de PPAR α .

Para avaliar as alterações histológicas após a indução das feridas e tratamento tópico com GEM, os tecidos foram processados, submetidos à coloração com H&E ou picrossírius e em seguida analisados qualitativamente. Novamente, foi possível visualizar a formação de tecido reacional espesso com intensa resposta inflamatória e produção de fibrina em camundongos em ambos os grupos, principalmente após 48h p.c.. Porém, os camundongos tratados apenas com o veículo apresentaram maior quantidade de rede de vasos sanguíneos congestionados e grande quantidade de células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos e outros polimorfonucleares, principalmente em 48h e 120h p.c. (Fig. 14). Ainda, havia produção de fibrina na crosta das feridas com infiltrado neutrofílico e outros polimorfonucleares em ambos os grupos. Após 10 dias de reparo, esta crosta estava minimamente conectada ao tecido em reparo. Entretanto, apenas os camundongos que receberam tratamento com o agonista de PPAR α apresentavam uma regressão mais rápida desta crosta e o infiltrado neutrofílico presente neste local era menor. Além de apresentar menor infiltrado inflamatório, o grupo tratado com GEM, no qual o receptor PPAR α foi localmente ativado, apresentou maior quantidade de fibras de colágeno do tipo I

(áreas amarelo avermelhadas), enquanto que o grupo VEI apresentava maior quantidade de colágeno do tipo III (áreas verdes). A presença de fibroblastos intercalados por fibras de colágeno foi melhor evidenciada após 240h p.c., caracterizando o reparo tecidual propriamente dito, em ambos os grupos (Fig. 15).

Figura 14. Aspectos microscópicos das feridas 48h, 120h e 240h pós-cirúrgico após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α , coradas por hematoxilina-eosina (HE). O infiltrado inflamatório e alterações na pele dos camundongos tratados por via oral com o agonista de PPAR α (GEM) ou apenas com o veículo (VEI) foram visualizados nos tecidos processados, incluídos em parafina e corados por HE. Aumento original 5X e 20X, barra = 400 e 100 μ m, respectivamente.

Figura 15. Aspectos microscópicos das feridas dos animais após 240h pós-cirúrgico e tratamento tópico com o agonista de PPAR α , coradas por Picrosírius. A produção de colágeno na pele lesada dos camundongos tratados por via tópica com o agonista de PPAR α (GEM) ou apenas com o veículo (VEI) foi visualizada nos tecidos processados, incluídos em parafina e corados por Picrosírius. As imagens foram capturadas em luz convencional (linha superior) e em luz polarizada (linha inferior). À luz convencional, as fibras de colágenos são vermelhas e à luz polarizada, as fibras delgadas do colágeno tipo III são verdes e as fibras densas do colágeno tipo I são amarelas e vermelhas. Aumento original 5X.

4.12 Quantificação da atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α

Os ensaios enzimáticos de mieloperoxidase (MPO), N- acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) foram novamente utilizados para avaliar a quantidade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos presentes nas lesões, respectivamente. Ao avaliar a quantidade de neutrófilos, observou-se aumento da

gradual da atividade destas células em ambos os grupos durante o processo cicatricial. Entretanto, foi visualizada quantidade estatisticamente menor de neutrófilos em 24h, 48h, 120h e 240h p.c. após ativação do receptor PPAR α nas feridas dos animais tratados com o fármaco quando comparadas às dos animais tratados apenas com o veículo (Fig. 16A).

Em relação aos macrófagos presentes nas feridas, observou-se aumento constante destes durante o período avaliado. Porém, novamente a ativação local de PPAR α induziu menor atividade de macrófagos após 24h, 48h e 120h p.c., como observado nos ensaios de NAG (Fig. 16B).

A atividade de eosinófilos aumentava em ambos os grupos após 48h de lesão, assim como observado no tratamento oral. Ainda, os camundongos que receberam tratamento com o agonista do receptor PPAR α apresentaram menor atividade da enzima EPO após 5 dias (120h p.c.), quando comparados aos animais do grupo controle (VEI) (Fig. 16C).

Figura 16. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N- Acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) na pele em cicatrização após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α . Parte das feridas de ambos os grupos, tratados com Gemfibrozil (GEM) ou veículo (VEI) no local da lesão, foi coletada às 0h, 24h, 48h, 120h e 240h (p.c.) e triturada para a realização dos ensaios enzimáticos MPO, NAG e EPO, que determina a atividade de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no tecido, respectivamente. O resultado foi expresso em densidade ótica (DO) das reações com leitura em 450, 405 e 492 nm por miligrama de tecido, respectivamente. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 2 experimentos independentes. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.13 Avaliação fenotípica das células monocíticas dos tecidos lesados e dos linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α

Ao imunofenotipar as células monocíticas da pele e dos linfonodos drenantes foi possível distinguir 4 tipos de populações diferentes: CD11b⁺CD11c⁻ (macrófagos), CD11b⁺CD11c⁺ (células dendríticas), CD11b^{High}CD11c⁺ (possíveis células dendríticas epidermais) e CD11b^{Low}CD11c⁺ (possíveis células de Langerhans) (Fig.17A). Observou-se que houve aumento significativo da frequência de células CD11b⁺CD11c⁻ (macrófagos) em ambos os grupos, quando comparamos a presença desta população na pele íntegra (0h) e após 48h p.c. Porém, nos linfonodos drenantes isso ocorreu de forma contrária, pois após 48h p.c. os dois grupos apresentavam diminuição significativa desse subtipo celular (Fig.17B). De maneira geral, houve aumento significativo da frequência de células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) na pele de ambos os grupos após 48h p.c. Por outro lado, apenas os animais tratados com o agonista de PPAR α apresentaram diminuição significativa desta população nos linfonodos no mesmo momento avaliado em relação ao momento inicial (0h) (Fig.17B). Ao analisar mais profundamente a população de células dendríticas, dividindo-as em dois grupos, CD11b^{High}CD11c⁺ (possíveis células dendríticas epidermais) e CD11b^{Low}CD11c⁺ (possíveis células de Langerhans), observou-se que houve aumento significativo da frequência de células CD11b^{High}CD11c⁺ na pele lesada de ambos os grupos após 48h p.c.; entretanto os camundongos nos quais PPAR α foi ativado localmente apresentaram diminuição significativa destas células nos linfonodos drenantes em comparação àqueles tratados apenas com veículo (Fig.17B). Quanto à população de células CD11b^{Low}CD11c⁺, foi observado aumento significativo da frequência destas na pele em ambos os grupos após 48h p.c., mas o tratamento não interferiu no seu acúmulo nos linfonodos drenantes nos períodos avaliados (Fig.17B).

Figura 17. Quantificação e avaliação do fenótipo de células monocíticas no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes, coletadas de tecido íntegro (0h) e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α . As feridas e os linfonodos drenantes dos camundongos foram coletados e digeridos para extração de leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD11b (PE) ou CD11c (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células CD11b⁺CD11c⁻, CD11b⁺CD11c⁺, CD11b^{High}CD11c⁺ e CD11b^{Low}CD11c⁺ foi avaliada pelo software *FlowJo*, como demonstrado em (A e B). VEI=veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 1 experimento independente. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.14 Análise quantitativa e fenotípica de linfócitos no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α

Após quantificar macrófagos e células dendríticas, buscamos avaliar as populações celulares relacionadas à resposta imune adaptativa, também envolvida no reparo tecidual. Ao imunofenotipar a população de linfócitos no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes (Fig. 18A), observou-se aumento significativo da frequência de células CD3⁺CD4⁺ na pele e nos linfonodos drenantes dos camundongos tratados apenas com o veículo (grupo VEI), após 48h p.c., (Fig. 18B). De forma interessante, ambos os grupos apresentaram diminuição significativa da frequência de células CD3⁺CD8⁺ após 48h p.c. em relação à pele íntegra, porém quando comparamos entre os grupos, esta diminuição foi ainda maior nos animais tratados com GEM. Entretanto, nos linfonodos drenantes, para esta população de células, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados (Fig. 18B). Observou-se ainda que ambos os grupos apresentaram aumento significativo na frequência de células CD3⁺T γ δ ⁺ após 48h p.c. na pele lesada e nos linfonodos drenantes quando comparados à pele íntegra (0h). Contudo, a ativação de PPAR α levou a uma menor frequência dessas células às 48h p.c., quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo do agonista, em ambos os locais, pele e linfonodos drenantes das feridas (Fig. 18B).

Figura 18. Quantificação e avaliação fenotípica de linfócitos no infiltrado inflamatório das feridas e linfonodos drenantes, nos períodos 0h e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α . As feridas e os linfonodos dos camundongos foram coletados e digeridos para extração de leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE), CD4 (PerCP), CD8 (PE-Cy7) ou T $\gamma\delta$ (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺T $\gamma\delta$ ⁺ foi analisada pelo software *FlowJo*, como demonstrado em (A e B). VEI=veículo. GEM= Gemfibrozil Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 1 experimento independente. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.15 Análise quantitativa e fenotípica de células T reguladoras nos linfonodos drenantes após indução das feridas e tratamento tópico com o agonista de PPAR α

Com o intuito de avaliar o potencial anti-inflamatório e imunossupressor da ativação de PPAR α na pele, foi realizada imunofenotipagem das células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ nos linfonodos drenantes para verificar a participação de células T reguladoras no fechamento das feridas (Fig. 19A e B). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à frequência destas células após 48h p.c. (Fig. 19A e C). Por outro lado, observou-se diminuição significativa da frequência de CTLA-4 após 48h p.c. na população de células CD4⁺CD25⁻ em ambos os grupos, porém não houve diferença entre os grupos na população de células CD4⁺CD25⁺ para o mesmo marcador (Fig. 19C). De forma interessante, ao analisar a expressão de Foxp3, notou-se frequência significativamente menor deste fator de transcrição, na população CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ dos animais tratados com GEM após 48h p.c., quando comparados com aqueles que receberam apenas o veículo do fármaco (Fig. 19C). Além disso, os animais do grupo VEI apresentaram aumento significativo na frequência de Foxp3 na população de células CD4⁺CD25⁺ após 48h p.c. quando comparado a 0h (Fig. 19C).

Figura 19. Quantificação e avaliação fenotípica de células T reguladoras nos linfonodos drenantes, coletados de tecido íntegro (0h) e 48h p.c. de camundongos tratados por via tópica com agonista de PPAR α . Os linfonodos drenantes dos camundongos foram coletados e digeridos para extração de leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD4 (PerCP), CD25 (PE-Cy7), Foxp3 (FITC) ou CTLA-4 (PE). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ foi determinada após análise na “gate” de linfócitos (A), seguida por histogramas da frequência de expressão de Foxp3 e CTLA-4 (B), todas analisadas pelo software *FlowJo* como demonstrado em (C). VEI=veículo. GEM= Gemfibrozil. Estes resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de 1 experimento independente. n= 5 animais por grupo. * p < 0.05.

4.16 Comparação entre os grupos que receberam tratamento oral ou tópico com agonista de PPAR α

Por último, com a finalidade de verificar e comparar a eficiência do tratamento oral e tópico avaliou-se o fechamento macroscópico das feridas de todos os grupos (VEI oral, GEM oral, VEI tópico e GEM tópico) (Fig. 20). Notou-se que o tratamento tópico com o agonista de PPAR α (GEM) promoveu cicatrização de feridas mais rápida e significativamente melhor em todos os tempos p.c. quando comparado com os grupos tratados sistemicamente, sugerindo que a ativação direta de PPAR α na pele resulta em controle da resposta inflamatória local e melhora significativa do processo cicatricial.

Figura 20. Comparação entre os grupos que receberam tratamento oral ou tópico com agonista de PPAR α . Feridas com áreas previamente delimitadas foram realizadas no dorso de camundongos que foram tratados por via oral ou tópica com o agonista de PPAR α (100 ou 50mg/Kg/dia, respectivamente) para avaliação do processo cicatricial. As lesões foram medidas e fotografadas diariamente. GEM = Gemfibrozil; VEI = veículo.

5. DISCUSSÃO

Por ser um processo complexo e dinâmico, a cicatrização de feridas cutâneas envolve mudanças macroscópicas e uma sequência de eventos moleculares e celulares, que incluem inflamação, migração celular, angiogênese e síntese de matriz extracelular (MARTIN, 1997; WERNER; GROSE, 2003; CARDOSO; FAVORETO et al., 2011). Durante a reação inflamatória há ativação de fatores de transcrição nuclear tipo PPAR (CLARK, 2002), que supostamente podem estar envolvidos na modulação de vários processos biológicos, como a cicatrização. Além disso, PPAR α está relacionado a várias funções da epiderme, tais como a proliferação e diferenciação de queratinócitos; maturação e recuperação da barreira epidérmica; atividade das glândulas sebáceas e diferenciação dos melanócitos (KOMUVES et al., 2000; MICHALIK et al., 2001; WAHLI, 2002; MICHALIK; WAHLI, 2007).

Comercializado com o nome fantasia “Lopid (Pfizer®)”, o Gemfibrozil é um agonista de PPAR α , popularmente conhecido como “*Lopid*®”, clinicamente utilizado para o tratamento de hipertrigliceridemia, uma vez que sua administração por via oral é capaz de reduzir os níveis de triglicérides do plasma (ISSEMAN; GREEN, 1990; FORMAN; CHEN et al., 1997; LEHMANN; LENHARD et al., 1997; BENSINGER; TONTONNOZ, 2008). Por outro lado, estudos têm demonstrado o envolvimento deste fármaco em outras doenças, incluindo aterosclerose (NASH, 1982), diabetes (DE SALCEDO et al., 1976), artrite (MILLER-BLAIR; WHITE; GREENSPAN, 1992), câncer (DELLAVALLE; NICHOLAS; SCHILLING, 2003) e distúrbios do sistema nervoso central (DASGUPTA et al., 2007). Porém, os efeitos diretos da ativação de PPAR α durante o reparo cutâneo, até o momento, ainda não foram totalmente elucidados. Sendo assim, no presente trabalho, avaliamos a potencial utilização do agonista de PPAR α , Gemfibrozil, na cicatrização de feridas cutâneas.

Neste contexto, primeiramente, com o intuito de definir qual seria a melhor dose de Gemfibrozil a ser utilizada durante os ensaios, foram realizados experimentos pilotos para as vias de administração oral e tópica. Tendo por base dados da

literatura para o tratamento experimental com Gemfibrozil e a dose utilizada atualmente para pacientes com dislipidemia, quatro doses do fármaco foram testadas (HODGES, 1976; FENDERSON et al., 1982; KESANIEMI; GRUNDY, 1984; LEISS et al., 1985; PAWAR; JUMP, 2003). Observamos que houve fechamento macroscópico mais rápido nos animais que receberam 100 e 50mg/Kg/dia do agonista de PPAR α , por via oral e tópica respectivamente, quando comparados aos grupos que receberam apenas os respectivos veículos. A quantidade de fármaco utilizado pela via tópica para se obter uma melhor resposta de cicatrização cutânea correspondeu à metade daquela necessária para uma melhor resposta sistêmica, indicando que a aplicação tópica de Gemfibrozil foi mais eficiente que o tratamento sistêmico. Por ser uma terapia localizada, praticamente sem absorção sistêmica, com eliminação portanto de possíveis efeitos colaterais sistêmicos e da metabolização hepática do fármaco administrado, o uso tópico do fármaco pode ser considerado a melhor opção para o tratamento de feridas (HODGES, 1976; FENDERSON; DEUTSCH et al., 1982; KESANIEMI; GRUNDY, 1984; LEISS; VON BERGMANN et al., 1985; PAWAR; JUMP, 2003). Nossos estudos mostram que justamente pela melhor biodisponibilidade do fármaco no local da ferida quando aplicado topicamente, a sua dose eficaz passa a ser reduzida (50%), tornando a terapia economicamente mais viável também.

O tratamento sistêmico com o Gemfibrozil proporcionou fechamento macroscópico mais rápido das feridas apenas no início do reparo tecidual. Isto provavelmente ocorreu porque o fármaco pode ter sido metabolizado antes de chegar ao local da lesão, sendo necessária alta dose do Gemfibrozil oral para obtenção de uma resposta razoável inicial na cicatrização cutânea. Por outro lado, o tratamento tópico ocasionou fechamento significativamente mais rápido das feridas durante todo o processo de cicatrização, indicando a possibilidade de uma nova aplicação deste fármaco, bem como uma nova estratégia de tratamento para lesões cutâneas.

A realização de lesões cutâneas no dorso dos camundongos induziu diminuição significativa do peso corporal, independentemente do tratamento com o Gemfibrozil, indicando que o próprio estresse cirúrgico ou a extensão da ferida poderiam, por si só, ser fatores modificadores do metabolismo animal. Quando o agonista de PPAR α

foi administrado topicamente, a recuperação da massa corporal foi mais demorada, enquanto que a administração oral de Gemfibrozil ou seu veículo foi capaz de induzir ganho de peso, com retorno ao peso inicial no sexto dia p.c., sugerindo que o veículo utilizado por via oral também já poderia apresentar algum efeito anabólico. Porém, vale ressaltar que, após este período, os camundongos tratados com o veículo do fármaco continuaram ganhando peso, enquanto a ativação sistêmica de PPAR α foi capaz de controlar este aumento posterior de massa corporal. Esses dados sugerem que Gemfibrozil pode ter contribuído para o controle do peso dos animais tratados por via oral, assim como ocorre em modelos experimentais e com pacientes quando tratados com agonistas de PPAR α (VIDAL-PUIG et al., 1997; VERRETH et al., 2004). Porém, este controle somente é efetivo quando as necessidades metabólicas básicas dos animais já foram supridas, após primeiros momentos pós-cirúrgicos. Corroborando com estes dados, sabe-se que a pele possui importante papel na homeostase corporal (GOTTSCHLICH; ALEXANDER, 1987; PROKSCH; BRANDNER et al., 2008; DI MEGLIO; PERERA et al., 2011; KENDALL; NICOLAOU, 2013) e lesões neste órgão podem comprometer o metabolismo sistêmico, como as alterações metabólicas verificadas em pacientes queimados (GOTTSCHLICH; ALEXANDER, 1987; KOWAL-VERN et al., 1994) e com psoríase (PIETRZAK et al., 2010). A lesão realizada neste trabalho correspondeu a 3% da área corporal dos camundongos e comprometeu todas as camadas da pele. Em humanos, lesões por queimadura de terceiro grau, ou seja, aquelas que comprometem as três camadas da pele também são capazes de alterar o metabolismo sistêmico (GOTTSCHLICH; ALEXANDER, 1987; KOWAL-VERN; WALENGA et al., 1994; JESCHKE et al., 2007; MENDONCA MACHADO; GRAGNANI; MASAKO FERREIRA, 2011) com concomitante perda significativa de massa corporal (HART et al., 2000; DICKERSON et al., 2002; MENDONCA MACHADO; GRAGNANI et al., 2011). Deste modo, concluímos que a lesão cutânea utilizada para o desenvolvimento deste trabalho estava possivelmente produzindo alterações sistêmicas nos camundongos e era independente do tratamento. Além disso, a ativação sistêmica de PPAR α poderia contribuir para o controle de peso corporal após lesão cutânea de grande extensão, capaz de induzir alteração metabólica sistêmica.

No intuito de esclarecer melhor estes resultados e considerando que o fármaco utilizado também está envolvido no controle do metabolismo sistêmico de lipídios e carboidratos (ISSEMAN; GREEN, 1990; FORMAN; CHEN et al., 1997; LEHMANN; LENHARD et al., 1997; BENSINGER; TONTONZOZ, 2008), foram avaliados os valores de triglicérides e glicose no sangue periférico destes animais. Corroborando com a perda de peso, ambos os grupos apresentaram diminuição significativa de triglicérides após a indução das feridas até 5 dias após a cirurgia e isto ocorria novamente independentemente do tratamento utilizado. Por outro lado, nem a lesão cutânea, nem o tratamento com o fármaco ou a via de administração proporcionaram alteração na glicemia dos animais. Pacientes que apresentam queimaduras de grande extensão podem apresentar hipertrigliceridemia ou até mesmo resistência insulina transitórias; nestes casos, o uso de Gemfibrozil para ativação de PPAR α poderia contribuir para o reparo tecidual e para o controle do metabolismo sistêmico de carboidratos (CREE; WOLFE, 2008). Ainda, para os pacientes queimados que apresentam hipotrigliceridemia, o uso deste fármaco não comprometeria ainda mais a concentração sistêmica, já que os animais não apresentaram hipotrigliceridemia nem mesmo hipoglicemia após o tratamento com o fármaco quando comparados aos camundongos que receberam apenas o veículo (GOTTSCHLICH; ALEXANDER, 1987; KOWAL-VERN; WALENGA et al., 1994; JESCHKE; MLCIAK et al., 2007; MENDONÇA MACHADO; GRAGNANI et al., 2011). Dessa forma, a utilização clínica de Gemfibrozil seria segura e eficiente para tratamento de feridas cutâneas que comprometem o metabolismo sistêmico, como ocorre em pacientes com queimaduras de grande porte.

Quando administrado por via oral, Gemfibrozil é metabolizado no fígado e dados da literatura já demonstraram que a alta dose ou o uso prolongado deste fármaco podem causar lesões hepáticas (SCHINDHELM et al., 2006). A enzima alanina transaminase (ALT) está presente no citoplasma de hepatócitos e é liberada após dano celular (SCHINDHELM; DIAMANT et al., 2006). Logo, para avaliar a função hepática foi realizada a dosagem desta enzima após indução das feridas cutâneas e o tratamento sistêmico com o fármaco (SENIOR, 2012). Os resultados demonstraram que a dose de 100mg/Kg/dia oral, apesar de superior à dose utilizada para humanos, não foi capaz de causar dano hepático aos camundongos. Por outro lado, esta é mais uma vantagem da aplicação tópica, pois esta forma de tratamento

diminui a possibilidade de efeitos colaterais do medicamento, caso estes ocorressem.

Michalik e colaboradores observaram que camundongos deficientes de PPAR α apresentavam comprometimento da cicatrização cutânea e que este receptor estava envolvido principalmente na fase inicial do processo, ou seja, durante a fase de inflamação (MICHALIK; DESVERGNE et al., 2001). Neste contexto, os aspectos microscópicos das feridas dos camundongos tratados por via oral ou tópica foram avaliados para a melhor compreensão do papel do receptor PPAR α na cicatrização cutânea. Após o tratamento oral com o agonista de PPAR α não havia diferença microscópica significativa entre os grupos, diferentemente dos resultados encontrados no grupo tratado no local da lesão com Gemfibrozil. Estes apresentaram menor infiltrado inflamatório após 2, 5 e 10 dias da indução da lesão e tratamento, corroborando com dados da literatura que afirmam o papel anti-inflamatório do PPAR α (KOMUVES; HANLEY et al., 2000; MICHALIK; DESVERGNE et al., 2001; WAHLI, 2002; MICHALIK; WAHLI, 2007). Ainda, para a resolução eficiente do processo de cicatrização, são necessárias a produção e deposição de colágeno, assim como a produção de matriz extracelular para a formação e sustentação do tecido de granulação (PEARLSTEIN, 1976; SMOLA et al., 1998; WERNER; GROSE, 2003; LI; CHEN et al., 2007). Após 24h de lesão inicia-se a produção de colágeno do tipo I e III, porém esta só é significativa após o 3º ou 4º dia. As fibras de colágeno produzidas são importantes para a aproximação das bordas, pois cruzam a linha da incisão e servem como suporte para as células. No início da fase de remodelamento, embora haja produção de ambos os colágenos, o colágeno do tipo III é sintetizado em maior quantidade. Ao longo da fase de remodelamento, as fibras colágenas são mais grossas e mais compactas e as novas fibras são orientadas de acordo com as linhas de estresse mecânico e o colágeno tipo I passa a predominar em relação ao tipo III (LI; CHEN et al., 2007). O grupo no qual o receptor PPAR α foi localmente ativado, apresentou maior quantidade de fibras de colágeno do tipo I após 10 dias de lesão e tratamento, enquanto que o grupo que recebeu apenas o veículo apresentou maior quantidade de colágeno do tipo III. Desta forma, os animais tratados topicamente com Gemfibrozil apresentaram melhor remodelamento tecidual, caracterizado por fibras colágenas mais maduras e próximas em qualidade das fibras do tecido íntegro. Segundo a literatura, a ativação

de PPAR γ pelo seu agonista pode diminuir a produção de TGF- β , inibindo assim a produção de fibrose tecidual em modelos de fibrose pulmonar (CHEN et al., 2004; BURGESS et al., 2005; ROCKEY, 2008; SURAZYNSKI et al., 2009). No entanto, é importante ressaltar que a relação entre a ativação do receptor PPAR α e o remodelamento tecidual cutâneo foi descrito pela primeira vez no presente trabalho.

O controle da resposta inflamatória gerado pela ativação do receptor PPAR α levou ao fechamento mais rápido das feridas cutâneas, observado pelo acúmulo e/ou menor atividade de leucócitos, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos presentes no local da lesão ou nos linfonodos drenantes. A ativação de PPAR α e PPAR γ modula de forma negativa a inflamação por meio da regulação da atividade de células do sistema imune (DELERIVE; FRUCHART; STAELS, 2001; CLARK, 2002), como linfócitos T (CLARK et al., 2000; CLARK, 2002; JONES; DING et al., 2002), monócitos/macrófagos (CHINETTI et al., 1998; MOORE et al., 2001; JONES; DING et al., 2002), células dendríticas (FAVEEUW et al., 2000), mastócitos (SUGIYAMA et al., 2000) e eosinófilos (SUGIYAMA; NONAKA et al., 2000).

Neutrófilos são importantes fontes de mediadores lipídicos, proteases, citocinas pro-inflamatórias, acumulam-se na pele lesada após poucos minutos e permanecem em grande quantidade no local até a resolução da inflamação. Contudo, apesar do seu importante papel contra patógenos, o acúmulo de neutrófilos no tecido pode gerar mais dano tecidual e dificultar ou até mesmo atrasar a cicatrização (WERNER; GROSE, 2003; FOLCO; MURPHY, 2006; LI; CHEN et al., 2007; DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012). No presente trabalho, após a indução das feridas todos os camundongos apresentaram aumento da atividade de neutrófilos, verificada pelos altos níveis de mieloperoxidase, independentemente do tratamento. Porém, os animais tratados com Gemfibrozil apresentaram menor acúmulo dessas células nas feridas após a ativação local de PPAR α . Já os camundongos tratados sistemicamente com o agonista apresentaram menor atividade de neutrófilos apenas em 24h p.c.. É provável que isto ocorra porque a ativação de PPAR α pela via sistêmica não seja capaz de modular a resposta imune na pele de forma tão eficiente quanto a ativação local. Segundo Paterniti e colaboradores, a atividade de mieloperoxidase aumenta significativamente em camundongos geneticamente

deficientes do receptor PPAR α após lesão experimental na medula espinhal, comprovando uma relação inversa da ativação do receptor PPAR α e a atividade de neutrófilos (PATERNITI et al., 2013).

Neutrófilos também desempenham a função de recrutar macrófagos para o local da ferida (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010), que por sua vez, estão presentes em todos os estágios da cicatrização cutânea; fagocitam patógenos e células mortas do local da lesão, produzem importantes citocinas e quimiocinas (RIGAMONTI; CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2008; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010). Corroborando com dados da literatura, após a indução de lesão cutânea todos os camundongos apresentaram aumento da frequência e atividade de macrófagos nas feridas; visualizadas pela imunofenotipagem de células CD11b⁺CD11c⁻ e atividade enzimática da N-acetilglicosaminidase, respectivamente. Porém, a ativação do receptor PPAR α pelo tratamento tópico levou a uma menor atividade de macrófagos no tecido em reparo dos camundongos tratados. Por outro lado, observou-se diminuição significativa na frequência destas células nos linfonodos drenantes, independentemente do tratamento, indicando suposta migração destas células para a ferida. Ao contrário, os animais tratados por via oral só apresentaram menor atividade de macrófagos nas feridas após 10 dias de lesão. Durante o reparo tecidual, a determinação da atividade pro ou anti-inflamatória dos macrófagos está relacionada ao microambiente, pela produção de citocinas (ADAMSON, 2009; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010; MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011). Alterações nas funções de macrófagos podem ocasionar distúrbios no processo de cicatrização, como formação de úlceras por pressão, feridas crônicas ou cicatrizes hipertróficas (MAHDAVIAN DELAVARY; VAN DER VEER et al., 2011). Ainda, além do seu papel imune, os macrófagos estão envolvidos no metabolismo de lipídios (NAGY et al., 2012) e a ativação do receptor PPAR α presente nestas células pode diminuir a produção de várias citocinas pro-inflamatórias por inibir fatores de transcrição como AP1 e NF- κ B (MARX et al., 2001; NEVE et al., 2001). Logo, é possível que a redução da atividade de macrófagos (NAG) nas feridas após tratamento com Gemfibrozil tenha contribuído para reduzir a inflamação local e acelerar o processo cicatricial.

Eosinófilos também fazem parte da população de leucócitos presente na pele íntegra e do infiltrado inflamatório após lesão cutânea (BASSETT; BAKER; DE SOUZA, 1977), além de serem fontes de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias (HOGAN et al., 2008). Porém, neste estudo, a ativação sistêmica de PPAR α não interferiu no acúmulo dessas células na pele em cicatrização. Ao contrário, após ativação do receptor PPAR α pela via tópica houve diminuição significativa da atividade de eosinófilo-peroxidase nas lesões, sugerindo que o acúmulo de eosinófilos é regulado por PPAR α na pele. Corroborando com estes dados, PPAR α e PPAR γ são expressos em eosinófilos e sua ativação *in vitro* é capaz de inibir a quimiotaxia e a citotoxicidade celular destas células (WOERLY et al., 2003).

Células dendríticas são células apresentadoras de antígeno profissionais pela sua habilidade de capturar, processar e apresentar antígenos no tecido periférico e transportá-los até os órgãos linfoides secundários (HEATH; CARBONE, 2009). Na pele, estas células podem ser divididas em populações distintas, como células de Langerhans (LC) e as células dendríticas epidermais inflamatórias (IDEC) (WOLLENBERG et al., 1996; HEATH; CARBONE, 2009). As células de Langerhans monitoram constantemente a epiderme, transportam antígenos deste local para os linfonodos drenantes (STOITZNER et al., 2002) e possuem importante papel na produção de citocinas envolvidas na inflamação cutânea (ZABA; KRUEGER; LOWES, 2009). Estudos recentes têm demonstrado também importante papel destas células na manutenção da tolerância imunológica na pele (STEINMAN; NUSSENZWEIG, 2002). Por apresentarem distintos fenótipos e conseqüentemente, diferentes marcadores, a caracterização das células dendríticas ainda é controversia (ZABA; KRUEGER et al., 2009). Contudo, com base na literatura os marcadores CD11b e CD11c mostram-se eficientes para a distinção da população de LCs e IDECs (WOLLENBERG; WAGNER et al., 2002). Corroborando com os dados da literatura, após a indução da lesão cutânea, ocorreu acúmulo de células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) na pele dos camundongos de ambos os grupos. Contudo, os animais tratados com o agonista de PPAR α apresentaram diminuição desta população nos linfonodos e isto pode ter contribuído para o controle posterior do processo inflamatório na pele. Por outro lado, o tratamento não interferiu no acúmulo de LCs (CD11b^{low}CD11c⁺) nos linfonodos drenantes ou pele no período avaliado.

Diferentemente das LCs, as IDECs só estão presentes na pele em grande quantidade durante determinadas condições, como por exemplo, na inflamação (WOLLENBERG; KRAFT et al., 1996; STEINMAN; NUSSENZWEIG, 2002; STOITZNER; PFALLER et al., 2002). Normalmente, não migram para os linfonodos drenantes com tanta intensidade e quando ativadas produzem citocinas relacionadas à resposta imune do tipo Th1 (BIEBER, 2010). De fato, nossos resultados demonstraram aumento significativo da frequência destas células na pele lesada e concomitante diminuição nos linfonodos drenantes de ambos os grupos, em especial naqueles tratados com agonista de PPAR α após 48h de lesão. Dados da literatura já consideram a hipótese do envolvimento de PPARs na atividade de células dendríticas, pois o tratamento com agonista de PPAR γ foi capaz de diminuir significativamente a síntese de IL-12 por essas células (FAVEEUW; FOUGERAY et al., 2000). Logo, nossos resultados sugerem que as IDEC são diferencialmente moduladas por PPAR α durante o processo de cicatrização cutânea. Porém, estudos posteriores ainda são necessários para melhor elucidação da função destas células frente à ativação deste receptor em condições inflamatórias.

As células dendríticas também possuem importante papel na regulação, diferenciação e produção de citocinas por estarem envolvidas na ativação de linfócitos (STOITZNER; PFALLER et al., 2002). Durante o processo de reparo cutâneo, os linfócitos não apenas possuem função efetora, mas também são capazes de produzir fatores de crescimento e citocinas que modulam a resposta imune local (PETERSON et al., 1987; EFRON et al., 1990; HUBNER et al., 1996; WERNER; GROSE, 2003). Ainda, na fase de remodelação tecidual, essas células constituem o subconjunto mais frequente de leucócitos nas feridas de pele humana (ENGELHARDT et al., 1998) e segundo a literatura, os receptores PPARs estão presentes em linfócitos, principalmente o receptor PPAR α (JONES; DING et al., 2002). Em nosso estudo, os animais tratados com o agonista de PPAR α apresentaram menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nas feridas após tratamento, indicando possível envolvimento de PPAR α no acúmulo destas células durante o processo de reparo tecidual cutâneo. De forma interessante, independentemente do tratamento, ambos os grupos apresentaram diminuição significativa da frequência de linfócitos T CD8⁺ nas feridas em relação à pele íntegra; contudo, quando comparamos entre os grupos, esta diminuição foi ainda maior nos

animais tratados com GEM. Dessa forma, esses dados confirmam que a ativação de PPAR α pode alterar o acúmulo de células inflamatórias na pele lesada, contribuindo assim para a modulação da resposta imune/inflamação.

As células T $\gamma\delta$ da pele, também conhecidas como células T dendríticas epidérmicas (DETC), são linfócitos $\gamma\delta$ intraepiteliais (IEL), que reconhecem e expressam antígenos após algum dano tecidual (JAMESON et al., 2005). Recentes estudos experimentais com camundongos têm demonstrado que estas células podem ter papel fundamental no processo de cicatrização de feridas cutâneas (JAMESON; CAUVI et al., 2005; SCHWACHA, 2009), uma vez que os camundongos deficientes desta população celular apresentam distúrbios no reparo cicatricial, como o fechamento tardio das feridas (JAMESON et al., 2002). No presente estudo, a ativação tópica de PPAR α levou a uma menor frequência dessas células nas feridas e nos linfonodos dos animais tratados com Gemfibrozil, embora esta população estivesse aumentada após a lesão em relação à pele íntegra. Estes resultados confirmaram a hipótese de que as células CD3⁺T $\gamma\delta$ ⁺ estão envolvidas no processo de cicatrização cutânea em modelo experimental. Segundo a literatura, células CD3⁺T $\gamma\delta$ ⁺ também são produtoras de importantes citocinas inflamatórias como IL-2 e IFN- γ (BOISMENU et al., 1996); além disso, secretam fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento de queratinócitos e o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) (JAMESON; HAVRAN, 2007). Logo, células T $\gamma\delta$ da pele podem exercer relevante papel evitando o desenvolvimento de doenças malignas e fazendo proteção contra patógenos (GIRARDI et al., 2001; SUMARIA et al., 2011). Levando em consideração todas estas características e de acordo com os resultados encontrados, consideramos que a presença, mas em menor quantidade, destas células nas feridas e nos linfonodos após a ativação do receptor PPAR α , contribuiu para o controle da inflamação durante o processo de cicatrização. Possivelmente, isto tenha ocorrido pela diminuição de citocinas inflamatórias como a IL-12 e outras.

Células T reguladoras, identificadas como CD4⁺CD25⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3, possuem conhecido papel na imunorregulação de processos inflamatórios pela supressão da ativação de células T (SAKAGUCHI, 2004; KIM; RASMUSSEN; RUDENSKY, 2007). Alterações nas funções destas células podem

levar ao aparecimento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas da pele (SAKAGUCHI, 2004). Por isso, consideramos importante avaliar a frequência destas células nos linfonodos drenantes e verificar a relação destas com o tratamento com agonista de PPAR α . Após ativação local de PPAR α , não encontramos diferença significativa na frequência total de linfócitos CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻. Da mesma forma, não houve diferença na expressão do marcador CTLA-4 nas células CD4⁺CD25⁺. Contudo, na população de células CD4⁺CD25⁻ a expressão estava significativamente reduzida em ambos os grupos na fase inicial pós-lesão, indicando ausência de contração da resposta imune inflamatória neste momento pós-cirúrgico. De fato, CTLA-4 é um receptor presente na membrana de células T e possui importante papel nas células efetoras durante a contração de uma resposta imune (LU; SCHNEIDER; RUDD, 2012). Ainda, este receptor é frequentemente encontrado em células T reguladoras e é essencial para que estas células desempenhem sua função de inibir a resposta imune efetora (BRUNET et al., 1987; LU; SCHNEIDER et al., 2012).

Outro importante marcador utilizado para a fenotipagem de células T reguladoras e, que está relacionado ao desenvolvimento e função destas, é o fator de transcrição Foxp3 (ZHANG; ZHAO, 2007; BOVENSCHEN et al., 2011). De forma intrigante, embora PPAR α seja reconhecido por inibir a inflamação, as células CD4⁺CD25⁺ dos animais tratados com Gemfibrozil mantiveram a expressão de Foxp3 nos linfonodos drenantes de forma similar aos camundongos naive. Ainda, a ativação do receptor PPAR α induziu diminuição de Foxp3 após a lesão e tratamento, na população de células CD4⁺CD25⁻. Entretanto, sabe-se que nem sempre a presença de células T reguladoras contribui para a resolução do processo inflamatório. Nesse sentido, já foi demonstrado aumento significativo de células T reguladoras nas lesões em pacientes com psoríase e isto poderia estar relacionado ao quadro de manutenção da inflamação nestes pacientes (SUGIYAMA et al., 2005; WANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010; BOVENSCHEN; VAN DE KERKHOFF et al., 2011). Por outro lado, a presença destas células em modelos de dermatite atópica contribui para a modulação da resposta inflamatória (OU et al., 2004; RING et al., 2006; FUJIMURA et al., 2008). Além disso, para compreender a função de células T reguladoras na pele em cicatrização seria necessário avaliar sua presença diretamente nas lesões, bem como testar sua capacidade de supressão após ativação do receptor PPAR α .

pelo agonista Gemfibrozil. É possível que, mesmo em menor frequência, estas células estejam com atividade aumentada e suprimindo a inflamação local após ativação tópica de PPAR α . Em um estudo recente, os autores demonstraram que a ausência de PPAR α contribui para o aumento significativo de inflamação na pele de camundongos após aplicação tópica de antígeno. Ainda, neste estudo os autores concluíram que o aumento da inflamação estava relacionada à diminuição de células reguladoras, bem como a diminuição significativa de IL-2 (DUBRAC et al., 2011). Desta forma, o delineamento do papel das células T reguladoras nos processos inflamatórios relacionados à pele ainda é controverso e necessita de estudos mais aprofundados.

Ao comparar as vias de administração, os camundongos que receberam veículo no local da lesão apresentaram fechamento mais rápido da ferida quando comparados aos animais que receberam o veículo sistemicamente. Isto provavelmente ocorreu porque o uso tópico do veículo contribuiu para a hidratação da ferida e como suporte mecânico para o novo tecido formado. Já é sabido que materiais à base de água e polímeros, como hidrogéis são utilizados frequentemente como tratamento adicional no reparo cutâneo, pois contribuem de forma significativa para o fechamento das lesões de difícil tratamento como úlceras em pacientes diabéticos (MENON; BOMMANNAN; ELIAS, 1994; DUMVILLE et al., 2011; DUMVILLE et al., 2012). Em contrapartida, quando comparamos o fechamento macroscópico da ferida após uso do fármaco, o tratamento tópico foi mais eficiente na ativação do receptor de PPAR α do que quando administrado sistemicamente. Estes resultados mostram que o tratamento tópico com o agonista do receptor PPAR α seria a melhor estratégia terapêutica para o tratamento de feridas cutâneas quando comparado ao seu uso oral. De fato, trabalhos recentes utilizando camundongos têm demonstrado relevante contribuição da ativação de PPARs, em especial o PPAR α na regulação de processos inflamatórios relacionados à pele como o que ocorre durante a dermatite atópica, pela modulação da resposta inflamatória (HATANO et al., 2010; CHIBA et al., 2012).

Finalmente, acreditamos que o Gemfibrozil (agonista de PPAR α), que até então só havia sido descrito no tratamento de dislipidemias e diabetes com administração sistêmica, se utilizado localmente na ferida incorporado a um gel hidrofílico, pode

constituir uma importante ferramenta no tratamento de pacientes portadores de lesões de diabetes, doenças autoimunes de pele, queimaduras, feridas cirúrgicas, úlceras de decúbito e/ou cicatrizes hipertróficas, com mínimos efeitos sistêmicos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A ativação local de PPAR α é mais efetiva para o fechamento de feridas cutâneas do que a ativação sistêmica deste receptor
- O modelo de indução de feridas cutâneas utilizado foi capaz de gerar alterações metabólicas, independentemente do tratamento com o agonista de PPAR α
- A ativação local de PPAR α diminui o infiltrado inflamatório tecidual de leucócitos interferindo assim na cicatrização de feridas cutâneas.
- O tratamento tópico com o agonista de PPAR α favorece a maturação do colágeno produzido durante o reparo cutâneo.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ADAMSON, R. Role of macrophages in normal wound healing: an overview. *J Wound Care*. v. 18, p. 349-51, 2009.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. *Clin Plast Surg*. v. 17, p. 433-42, 1990.

BARISH, G. D., NARKAR, V. A., EVANS, R. M. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. v. 116, p. 590-7, 2006.

BASSETT, E. G., BAKER, J. R., DE SOUZA, P. A light microscopical study of healing incised dermal wounds in rats, with special reference to eosinophil leucocytes and to the collagenous fibres of the periwound areas. *Br J Exp Pathol*. v. 58, p. 581-605, 1977.

BENSINGER, S. J., TONTONNOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. v. 454, p. 470-7, 2008.

BIEBER, T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. v. 22, p. 125-37, 2010.

BOISMENU, R., HOBBS, M. V., BOULLIER, S., HAVRAN, W. L. Molecular and cellular biology of dendritic epidermal T cells. *Semin Immunol*. v. 8, p. 323-31, 1996.

BOVENSCHEN, H. J., VAN DE KERKHOF, P. C., VAN ERP, P. E., WOESTENENK, R., JOOSTEN, I., KOENEN, H. J. Foxp3⁺ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol*. v. 131, p. 1853-60, 2011.

BRAISSANT, O., FOUFFELLE, F., SCOTTO, C., DAUCA, M., WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. v. 137, p. 354-66, 1996.

BRUNET, J. F., DENIZOT, F., LUCIANI, M. F., ROUX-DOSSETO, M., SUZAN, M., MATTEI, M. G., GOLSTEIN, P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*. v. 328, p. 267-70, 1987.

BURGESS, H. A., DAUGHERTY, L. E., THATCHER, T. H., LAKATOS, H. F., RAY, D. M., REDONNET, M., PHIPPS, R. P., SIME, P. J. PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 288, p. L1146-53, 2005.

CARDOSO, C. R., FAVORETO, S., JR., OLIVEIRA, L. L., VANCIM, J. O., BARBAN, G. B., FERRAZ, D. B., SILVA, J. S. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiology*. v. 216, p. 409-15, 2011.

CHEN, K., CHEN, J., LI, D., ZHANG, X., MEHTA, J. L. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone. *Hypertension*. v. 44, p. 655-61, 2004.

CHEN, W., FRANK, M. E., JIN, W., WAHL, S. M. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*. v. 14, p. 715-25, 2001.

CHEUNG, M. C., SPALDING, P. B., GUTIERREZ, J. C., BALKAN, W., NAMIAS, N., KONIARIS, L. G., ZIMMERS, T. A. Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *J Surg Res*. v. 153, p. 326-31, 2009.

CHEVREL, G., GARNERO, P., MIOSSEC, P. Addition of interleukin 1 (IL1) and IL17 soluble receptors to a tumour necrosis factor alpha soluble receptor more effectively reduces the production of IL6 and macrophage inhibitory protein-3alpha and increases that of collagen in an in vitro model of rheumatoid synovioocyte activation. *Ann Rheum Dis*. v. 61, p. 730-3, 2002.

CHIBA, T., TAKEUCHI, S., ESAKI, H., YAMAMURA, K., KURIHARA, Y., MOROI, Y., FURUE, M. Topical application of PPARalpha (but not beta/delta or gamma) suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Allergy*. v. 67, p. 936-42, 2012.

CHINETTI, G., GRIGLIO, S., ANTONUCCI, M., TORRA, I. P., DELERIVE, P., MAJD, Z., FRUCHART, J. C., CHAPMAN, J., NAJIB, J., STAELS, B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. v. 273, p. 25573-80, 1998.

CLARK, R. A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol*. v. 130, p. 362-70, 2010.

CLARK, R. B. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol*. v. 71, p. 388-400, 2002.

CLARK, R. B., BISHOP-BAILEY, D., ESTRADA-HERNANDEZ, T., HLA, T., PUDDINGTON, L., PADULA, S. J. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol*. v. 164, p. 1364-71, 2000.

CREE, M. G., WOLFE, R. R. Postburn trauma insulin resistance and fat metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 294, p. E1-9, 2008.

DASGUPTA, S., ROY, A., JANA, M., HARTLEY, D. M., PAHAN, K. Gemfibrozil ameliorates relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Mol Pharmacol*. v. 72, p. 934-46, 2007.

DE SALCEDO, I., GORRINGE, A. L., SILVA, J. L., SANTOS, J. A. Gemfibrozil in a group of diabetics. *Proc R Soc Med.* v. 69 Suppl 2, p. 64-70, 1976.

DELERIVE, P., DE BOSSCHER, K., BESNARD, S., VANDEN BERGHE, W., PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J., FRUCHART, J. C., TEDGUI, A., HAEGEMAN, G., STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* v. 274, p. 32048-54, 1999.

DELERIVE, P., FRUCHART, J. C., STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* v. 169, p. 453-9, 2001.

DELLAVALLE, R. P., NICHOLAS, M. K., SCHILLING, L. M. Melanoma chemoprevention: a role for statins or fibrates? *Am J Ther.* v. 10, p. 203-10, 2003.

DEMIDOVA-RICE, T. N., HAMBLIN, M. R., HERMAN, I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care.* v. 25, p. 349-70, 2012.

DESERVIER, B., WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* v. 20, p. 649-88, 1999.

DEVALARAJA, R. M., NANNEY, L. B., DU, J., QIAN, Q., YU, Y., DEVALARAJA, M. N., RICHMOND, A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* v. 115, p. 234-44, 2000.

DEVCHAND, P. R., KELLER, H., PETERS, J. M., VAZQUEZ, M., GONZALEZ, F. J., WAHLI, W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* v. 384, p. 39-43, 1996.

DI MEGLIO, P., PERERA, G. K., NESTLE, F. O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity.* v. 35, p. 857-69, 2011.

DICKERSON, R. N., GERVASIO, J. M., RILEY, M. L., MURRELL, J. E., HICKERSON, W. L., KUDSK, K. A., BROWN, R. O. Accuracy of predictive methods to estimate resting energy expenditure of thermally-injured patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* v. 26, p. 17-29, 2002.

DREYER, C., KREY, G., KELLER, H., GIVEL, F., HELFTENBEIN, G., WAHLI, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* v. 68, p. 879-87, 1992.

DUBRAC, S., ELENTER, A., SCHOONJANS, K., AUWERX, J., SCHMUTH, M. Lack of IL-2 in PPAR-alpha-deficient mice triggers allergic contact dermatitis by affecting regulatory T cells. *Eur J Immunol.* v. 41, p. 1980-91, 2011.

DUMVILLE, J. C., O'MEARA, S., DESHPANDE, S., SPEAK, K. Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* v., p. CD009101, 2011.

DUMVILLE, J. C., SOARES, M. O., O'MEARA, S., CULLUM, N. Systematic review and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. *Diabetologia.* v. 55, p. 1902-10, 2012.

EFRON, J. E., FRANKEL, H. L., LAZAROU, S. A., WASSERKRUG, H. L., BARBUL, A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res.* v. 48, p. 460-3, 1990.

ENGELHARDT, E., TOKSOY, A., GOEBELER, M., DEBUS, S., BROCKER, E. B., GILLITZER, R. Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* v. 153, p. 1849-60, 1998.

FAVEEUW, C., FOUGERAY, S., ANGELI, V., FONTAINE, J., CHINETTI, G., GOSSET, P., DELERIVE, P., MALISZEWSKI, C., CAPRON, M., STAELS, B., MOSER, M., TROTTEIN, F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett.* v. 486, p. 261-6, 2000.

FENDERSON, R. W., DEUTSCH, S., MENACHEMI, E., CHIN, B., SAMUEL, P. Effect of gemfibrozil on serum lipids in man. *Angiology.* v. 33, p. 581-93, 1982.

FOLCO, G., MURPHY, R. C. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev.* v. 58, p. 375-88, 2006.

FORMAN, B. M., CHEN, J., EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 94, p. 4312-7, 1997.

FUJIMURA, T., OKUYAMA, R., ITO, Y., AIBA, S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* v. 158, p. 1256-63, 2008.

GERVOIS, P., CHOPIN-DELANNOY, S., FADEL, A., DUBOIS, G., KOSYKH, V., FRUCHART, J. C., NAJIB, J., LAUDET, V., STAELS, B. Fibrates increase human REV-ERB α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol.* v. 13, p. 400-9, 1999.

GILLITZER, R., GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* v. 69, p. 513-21, 2001.

GILPIN, D. A. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns.* v. 22, p. 607-11, 1996.

GIRARDI, M., OPPENHEIM, D. E., STEELE, C. R., LEWIS, J. M., GLUSAC, E., FILLER, R., HOBBY, P., SUTTON, B., TIGELAAR, R. E., HAYDAY, A. C. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. v. 294, p. 605-9, 2001.

GOCKE, A. R., HUSSAIN, R. Z., YANG, Y., PENG, H., WEINER, J., BEN, L. H., DREW, P. D., STUVE, O., LOVETT-RACKE, A. E., RACKE, M. K. Transcriptional modulation of the immune response by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in autoimmune disease. *J Immunol*. v. 182, p. 4479-87, 2009.

GOSSET, P., CHARBONNIER, A. S., DELERIVE, P., FONTAINE, J., STAELS, B., PESTEL, J., TONNEL, A. B., TROTTEIN, F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. v. 31, p. 2857-65, 2001.

GOTTSCHLICH, M. M., ALEXANDER, J. W. Fat kinetics and recommended dietary intake in burns. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. v. 11, p. 80-5, 1987.

GREEN, J. A., STOCKTON, R. A., JOHNSON, C., JACOBSON, B. S. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase regulate wound closure in NIH/3T3 fibroblast monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*. v. 287, p. C373-83, 2004.

HARRIS, S. G., PHIPPS, R. P. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol*. v. 31, p. 1098-105, 2001.

HART, D. W., WOLF, S. E., MLCAR, R., CHINKES, D. L., RAMZY, P. I., OBENG, M. K., FERRANDO, A. A., WOLFE, R. R., HERNDON, D. N. Persistence of muscle catabolism after severe burn. *Surgery*. v. 128, p. 312-9, 2000.

HATANO, Y., MAN, M. Q., UCHIDA, Y., CRUMRINE, D., MAURO, T. M., FEINGOLD, K. R., ELIAS, P. M., HOLLERAN, W. M. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allergy Clin Immunol*. v. 125, p. 160-9 e1-5, 2010.

HEATH, W. R., CARBONE, F. R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*. v. 10, p. 1237-44, 2009.

HEINRICH, S. A., MESSINGHAM, K. A., GREGORY, M. S., COLANTONI, A., FERREIRA, A. M., DIPIETRO, L. A., KOVACS, E. J. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 levels following thermal injury precede monocyte recruitment to the wound site and are controlled, in part, by tumor necrosis factor-alpha. *Wound Repair Regen*. v. 11, p. 110-9, 2003.

HODGES, R. M. Gemfibrozil--a new lipid lowering agent. *Proc R Soc Med*. v. 69 Suppl 2, p. 1-2, 1976.

HOGAN, S. P., ROSENBERG, H. F., MOQBEL, R., PHIPPS, S., FOSTER, P. S., LACY, P., KAY, A. B., ROTHENBERG, M. E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. v. 38, p. 709-50, 2008.

HUBNER, G., BRAUCHLE, M., SMOLA, H., MADLENER, M., FASSLER, R., WERNER, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*. v. 8, p. 548-56, 1996.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. v. 110, p. 673-87, 2002.

ISHIDA, Y., KONDO, T., TAKAYASU, T., IWAKURA, Y., MUKAIDA, N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol*. v. 172, p. 1848-55, 2004.

ISSELMANN, I., GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. v. 347, p. 645-50, 1990.

JAMESON, J., HAVRAN, W. L. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev*. v. 215, p. 114-22, 2007.

JAMESON, J., UGARTE, K., CHEN, N., YACHI, P., FUCHS, E., BOISMENU, R., HAVRAN, W. L. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science*. v. 296, p. 747-9, 2002.

JAMESON, J. M., CAUVI, G., SHARP, L. L., WITHERDEN, D. A., HAVRAN, W. L. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med*. v. 201, p. 1269-79, 2005.

JESCHKE, M. G., MLCAK, R. P., FINNERTY, C. C., NORBURY, W. B., GAUGLITZ, G. G., KULP, G. A., HERNDON, D. N. Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Crit Care*. v. 11, p. R90, 2007.

JONES, D. C., DING, X., DAYNES, R. A. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem*. v. 277, p. 6838-45, 2002.

KAESLER, S., BUGNON, P., GAO, J. L., MURPHY, P. M., GOPPELT, A., WERNER, S. The chemokine receptor CCR1 is strongly up-regulated after skin injury but dispensable for wound healing. *Wound Repair Regen*. v. 12, p. 193-204, 2004.

KAESLER, S., REGENBOGEN, J., DURKA, S., GOPPELT, A., WERNER, S. The healing skin wound: a novel site of action of the chemokine C10. *Cytokine*. v. 17, p. 157-63, 2002.

KENDALL, A. C., NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res.* v. 52, p. 141-64, 2013.

KERSTEN, S., DESVERGNE, B., WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* v. 405, p. 421-4, 2000.

KERSTEN, S., MANDARD, S., ESCHER, P., GONZALEZ, F. J., TAFURI, S., DESVERGNE, B., WAHLI, W. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB J.* v. 15, p. 1971-8, 2001.

KESANIEMI, Y. A., GRUNDY, S. M. Influence of gemfibrozil and clofibrate on metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in man. *JAMA.* v. 251, p. 2241-6, 1984.

KIM, J. M., RASMUSSEN, J. P., RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* v. 8, p. 191-7, 2007.

KIRSNER, R. S., EAGLSTEIN, W. H. The wound healing process. *Dermatol Clin.* v. 11, p. 629-40, 1993.

KLIEWER, S. A., FORMAN, B. M., BLUMBERG, B., ONG, E. S., BORGMEYER, U., MANGELSDORF, D. J., UMESONO, K., EVANS, R. M. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 91, p. 7355-9, 1994.

KLIEWER, S. A., LENHARD, J. M., WILLSON, T. M., PATEL, I., MORRIS, D. C., LEHMANN, J. M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* v. 83, p. 813-9, 1995.

KOLLS, J. K., LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* v. 21, p. 467-76, 2004.

KOMUVES, L. G., HANLEY, K., LEFEBVRE, A. M., MAN, M. Q., NG, D. C., BIKLE, D. D., WILLIAMS, M. L., ELIAS, P. M., AUWERX, J., FEINGOLD, K. R. Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo. *J Invest Dermatol.* v. 115, p. 353-60, 2000.

KOWAL-VERN, A., WALENGA, J. M., HOPPENSTEADT, D., SHARP-PUCCI, M., GAMELLI, R. L. Interleukin-2 and interleukin-6 in relation to burn wound size in the acute phase of thermal injury. *J Am Coll Surg.* v. 178, p. 357-62, 1994.

LAUDET, V., HANNI, C., COLL, J., CATZEFLIS, F., STEHELIN, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* v. 11, p. 1003-13, 1992.

LEHMANN, J. M., LENHARD, J. M., OLIVER, B. B., RINGOLD, G. M., KLIEWER, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* v. 272, p. 3406-10, 1997.

LEISS, O., VON BERGMANN, K., GNASSO, A., AUGUSTIN, J. Effect of gemfibrozil on biliary lipid metabolism in normolipemic subjects. *Metabolism*. v. 34, p. 74-82, 1985.

LI, J., CHEN, J., KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. v. 25, p. 9-18, 2007.

LONDAHL, M., KATZMAN, P., NILSSON, A., HAMMARLUND, C. Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. v. 33, p. 998-1003, 2010.

LOVETT-RACKE, A. E., HUSSAIN, R. Z., NORTHROP, S., CHOY, J., ROCCHINI, A., MATTHES, L., CHAVIS, J. A., DIAB, A., DREW, P. D., RACKE, M. K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. *J Immunol*. v. 172, p. 5790-8, 2004.

LU, Y., SCHNEIDER, H., RUDD, C. E. Murine regulatory T cells differ from conventional T cells in resisting the CTLA-4 reversal of TCR stop-signal. *Blood*. v. 120, p. 4560-70, 2012.

MAHDAVIAN DELAVARY, B., VAN DER VEER, W. M., VAN EGMOND, M., NIESSEN, F. B., BEELEN, R. H. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. v. 216, p. 753-62, 2011.

MARKIEWSKI, M. M., LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol*. v. 171, p. 715-27, 2007.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. v. 276, p. 75-81, 1997.

MARX, N., KEHRLE, B., KOHLHAMMER, K., GRUB, M., KOENIG, W., HOMBACH, V., LIBBY, P., PLUTZKY, J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res*. v. 90, p. 703-10, 2002.

MARX, N., MACKMAN, N., SCHONBECK, U., YILMAZ, N., HOMBACH, V., LIBBY, P., PLUTZKY, J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation*. v. 103, p. 213-9, 2001.

MASCARO, C., ACOSTA, E., ORTIZ, J. A., RODRIGUEZ, J. C., MARRERO, P. F., HEGARDT, F. G., HARO, D. Characterization of a response element for peroxisomal proliferator activated receptor (PPRE) in human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *Adv Exp Med Biol*. v. 466, p. 79-85, 1999.

MCLAFFERTY, E., HENDRY, C., ALISTAIR, F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs Stand*. v. 27, p. 35-42, 2012.

MENDONCA MACHADO, N., GRAGNANI, A., MASAKO FERREIRA, L. Burns, metabolism and nutritional requirements. *Nutr Hosp*. v. 26, p. 692-700, 2011.

MENON, G. K., BOMMANNAN, D. B., ELIAS, P. M. High-frequency sonophoresis: permeation pathways and structural basis for enhanced permeability. *Skin Pharmacol.* v. 7, p. 130-9, 1994.

MICHALIK, L., DESVERGNE, B., TAN, N. S., BASU-MODAK, S., ESCHER, P., RIEUSSET, J., PETERS, J. M., KAYA, G., GONZALEZ, F. J., ZAKANY, J., METZGER, D., CHAMBON, P., DUBOULE, D., WAHLI, W. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol.* v. 154, p. 799-814, 2001.

MICHALIK, L., WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta.* v. 1771, p. 991-8, 2007.

MILLER-BLAIR, D., WHITE, R., GREENSPAN, A. Acute gout involving the acromioclavicular joint following treatment with gemfibrozil. *J Rheumatol.* v. 19, p. 166-8, 1992.

MIYATA, K. S., MCCAWE, S. E., MARCUS, S. L., RACHUBINSKI, R. A., CAPONE, J. P. The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene.* v. 148, p. 327-30, 1994.

MOORE, K. J., ROSEN, E. D., FITZGERALD, M. L., RANDOW, F., ANDERSSON, L. P., ALTSHULER, D., MILSTONE, D. S., MORTENSEN, R. M., SPIEGELMAN, B. M., FREEMAN, M. W. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* v. 7, p. 41-7, 2001.

MORI, R., KONDO, T., OHSHIMA, T., ISHIDA, Y., MUKAIDA, N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* v. 16, p. 963-74, 2002.

NAGY, L., SZANTO, A., SZATMARI, I., SZELES, L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol Rev.* v. 92, p. 739-89, 2012.

NARALA, V. R., ADAPALA, R. K., SURESH, M. V., BROCK, T. G., PETERS-GOLDEN, M., REDDY, R. C. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem.* v. 285, p. 22067-74, 2010.

NASH, D. T. Hyperlipoproteinemia, atherosclerosis and gemfibrozil. *Angiology.* v. 33, p. 594-602, 1982.

NEVE, B. P., CORSEAU, D., CHINETTI, G., ZAWADZKI, C., FRUCHART, J. C., DURIEZ, P., STAELS, B., JUDE, B. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation.* v. 103, p. 207-12, 2001.

OU, L. S., GOLEVA, E., HALL, C., LEUNG, D. Y. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol.* v. 113, p. 756-63, 2004.

PARK, S. G., SHIN, H., SHIN, Y. K., LEE, Y., CHOI, E. C., PARK, B. J., KIM, S. The novel cytokine p43 stimulates dermal fibroblast proliferation and wound repair. *Am J Pathol.* v. 166, p. 387-98, 2005.

PATERNITI, I., IMPELLIZZERI, D., CRUPI, R., MORABITO, R., CAMPOLO, M., ESPOSITO, E., CUZZOCREA, S. Molecular evidence for the involvement of PPAR-delta and PPAR-gamma in anti-inflammatory and neuroprotective activities of palmitoylethanolamide after spinal cord trauma. *J Neuroinflammation.* v. 10, p. 20, 2013.

PAWAR, A., JUMP, D. B. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem.* v. 278, p. 35931-9, 2003.

PEARLSTEIN, E. Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. *Nature.* v. 262, p. 497-500, 1976.

PETERSON, J. M., BARBUL, A., BRESLIN, R. J., WASSERKRUG, H. L., EFRON, G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery.* v. 102, p. 300-5, 1987.

PIETRZAK, A., MICHALAK-STOMA, A., CHODOROWSKA, G., SZEPIETOWSKI, J. C. Lipid disturbances in psoriasis: an update. *Mediators Inflamm.* v. 2010, p., 2010.

PROKSCH, E., BRANDNER, J. M., JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* v. 17, p. 1063-72, 2008.

RIGAMONTI, E., CHINETTI-GBAGUIDI, G., STAELS, B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 28, p. 1050-9, 2008.

RING, S., SCHAFFER, S. C., MAHNKE, K., LEHR, H. A., ENK, A. H. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* v. 36, p. 2981-92, 2006.

ROBINSON, A., GRIMSHAW, G. M. Measurement of the focal spot size of diagnostic x-ray tubes--a comparison of pinhole and resolution methods. *Br J Radiol.* v. 48, p. 572-80, 1975.

ROCKEY, D. C. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. *Clin Liver Dis.* v. 12, p. 939-62, xi, 2008.

RODERO, M. P., KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol.* v. 3, p. 643-53, 2010.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* v. 22, p. 531-62, 2004.

SANTORO, M. M., GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* v. 304, p. 274-86, 2005.

SATISH, L., YAGER, D., WELLS, A. Glu-Leu-Arg-negative CXC chemokine interferon gamma inducible protein-9 as a mediator of epidermal-dermal communication during wound repair. *J Invest Dermatol.* v. 120, p. 1110-7, 2003.

SCHINDHELM, R. K., DIAMANT, M., DEKKER, J. M., TUSHUIZEN, M. E., TEERLINK, T., HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev.* v. 22, p. 437-43, 2006.

SCHWACHA, M. G. Gammadelta T-cells: potential regulators of the post-burn inflammatory response. *Burns.* v. 35, p. 318-26, 2009.

SENIOR, J. R. Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther.* v. 92, p. 332-9, 2012.

SHIBATA, T., KONDO, M., OSAWA, T., SHIBATA, N., KOBAYASHI, M., UCHIDA, K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* v. 277, p. 10459-66, 2002.

SIMPSON, D. M., ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest.* v. 51, p. 2009-23, 1972.

SMOLA, H., STARK, H. J., THIEKOTTER, G., MIRANCEA, N., KRIEG, T., FUSENIG, N. E. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.* v. 239, p. 399-410, 1998.

STAELS, B., KOENIG, W., HABIB, A., MERVAL, R., LEBRET, M., TORRA, I. P., DELERIVE, P., FADEL, A., CHINETTI, G., FRUCHART, J. C., NAJIB, J., MACLOUF, J., TEDGUI, A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* v. 393, p. 790-3, 1998.

STEINMAN, R. M., NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 99, p. 351-8, 2002.

STOITZNER, P., PFALLER, K., STOSSEL, H., ROMANI, N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol.* v. 118, p. 117-25, 2002.

STURM, A., DIGNASS, A. U. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* v. 14, p. 348-53, 2008.

SUGIYAMA, H., GYULAI, R., TOICHI, E., GARACZI, E., SHIMADA, S., STEVENS, S. R., MCCORMICK, T. S., COOPER, K. D. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* v. 174, p. 164-73, 2005.

SUGIYAMA, H., NONAKA, T., KISHIMOTO, T., KOMORIYA, K., TSUJI, K., NAKAHATA, T. Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in human cultured mast cells: a possible role of these receptors in negative regulation of mast cell activation. *Eur J Immunol.* v. 30, p. 3363-70, 2000.

SUMARIA, N., ROEDIGER, B., NG, L. G., QIN, J., PINTO, R., CAVANAGH, L. L., SHKLOVSKAYA, E., FAZEKAS DE ST GROTH, B., TRICCAS, J. A., WENINGER, W. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells. *J Exp Med.* v. 208, p. 505-18, 2011.

SURAZYNSKI, A., JARZABEK, K., MILTYK, W., WOLCZYNSKI, S., PALKA, J. Estrogen-dependent regulation of PPAR-gamma signaling on collagen biosynthesis in adenocarcinoma endometrial cells. *Neoplasma.* v. 56, p. 448-54, 2009.

TODA, M., LEUNG, D. Y., MOLET, S., BOGUNIEWICZ, M., TAHA, R., CHRISTODOULOPOULOS, P., FUKUDA, T., ELIAS, J. A., HAMID, Q. A. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol.* v. 111, p. 875-81, 2003.

TUGWOOD, J. D., ISSEMAN, I., ANDERSON, R. G., BUNDELL, K. R., MCPHEAT, W. L., GREEN, S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* v. 11, p. 433-9, 1992.

VERRETH, W., DE KEYZER, D., PELAT, M., VERHAMME, P., GANAME, J., BIELICKI, J. K., MERTENS, A., QUARCK, R., BENHABILES, N., MARGUERIE, G., MACKNESS, B., MACKNESS, M., NINIO, E., HERREGODS, M. C., BALLIGAND, J. L., HOLVOET, P. Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation.* v. 110, p. 3259-69, 2004.

VIDAL-PUIG, A. J., CONSIDINE, R. V., JIMENEZ-LINAN, M., WERMAN, A., PORIES, W. J., CARO, J. F., FLIER, J. S. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest.* v. 99, p. 2416-22, 1997.

WAGNER, J. D., SHADOAN, M. K., ZHANG, L., WARD, G. M., ROYER, L. J., KAVANAGH, K., FRANCONI, O. L., AUERBACH, B. J., HARWOOD, H. J., JR. A selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, CP-900691, improves plasma lipids, lipoproteins, and glycemic control in diabetic monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 333, p. 844-53, 2010.

WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly.* v. 132, p. 83-91, 2002.

WANG, H., PETERS, T., SINDRILARU, A., KESS, D., ORESHKOVA, T., YU, X. Z., SEIER, A. M., SCHREIBER, H., WLASCHEK, M., BLAKYTN, R., ROHRBEIN, J., SCHULZ, G., WEISS, J. M., SCHARFFETTER-KOCHAN, K. TGF-beta-dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J Clin Invest.* v. 118, p. 2629-39, 2008.

WANG, J. F., OLSON, M. E., MA, L., BRIGSTOCK, D. R., HART, D. A. Connective tissue growth factor siRNA modulates mRNA levels for a subset of molecules in normal and TGF-beta 1-stimulated porcine skin fibroblasts. *Wound Repair Regen.* v. 12, p. 205-16, 2004.

WERNER, S., GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* v. 83, p. 835-70, 2003.

WERNER, S., KRIEG, T., SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* v. 127, p. 998-1008, 2007.

WOERLY, G., HONDA, K., LOYENS, M., PAPIN, J. P., AUWERX, J., STAELS, B., CAPRON, M., DOMBROWICZ, D. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med.* v. 198, p. 411-21, 2003.

WOLLENBERG, A., KRAFT, S., HANAU, D., BIEBER, T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol.* v. 106, p. 446-53, 1996.

WOLLENBERG, A., WAGNER, M., GUNTHER, S., TOWAROWSKI, A., TUMA, E., MODERER, M., ROTHENFUSSER, S., WETZEL, S., ENDRES, S., HARTMANN, G. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* v. 119, p. 1096-102, 2002.

YAGER, D. R., NWOMEH, B. C. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* v. 7, p. 433-41, 1999.

YANG, X. O., CHANG, S. H., PARK, H., NURIEVA, R., SHAH, B., ACERO, L., WANG, Y. H., SCHLUNS, K. S., BROADDUS, R. R., ZHU, Z., DONG, C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med.* v. 205, p. 1063-75, 2008.

ZABA, L. C., KRUEGER, J. G., LOWES, M. A. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* v. 129, p. 302-8, 2009.

ZHANG, L., YANG, X. Q., CHENG, J., HUI, R. S., GAO, T. W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. Clin Immunol. v. 135, p. 108-17, 2010.

ZHANG, L., ZHAO, Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. J Cell Physiol. v. 211, p. 590-7, 2007.

8. Anexos

8.1 Anexo1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.523.53.7), intitulado "Papel do Receptor PPAR α na Cicatrização de Feridas Cutâneas Induzidas Experimentalmente", de autoria de **Francielle Rodrigues Guimarães**, e de **Cristina Ribeiro de Barros Cardoso** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.523.53.7), entitled: "Papel do Receptor PPAR α na Cicatrização de Feridas Cutâneas Induzidas Experimentalmente", by **Francielle Rodrigues Guimarães** and **Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro