

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular UFMG

Puebla Cassini Vieira

Avaliação dos mecanismos associados ao efeito terapêutico de dieta rica em fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos – papel do receptor GPR43 e da interleucina (IL)-18

Belo Horizonte

2018

Puebla Cassini Vieira

Avaliação dos mecanismos associados ao efeito terapêutico de dieta rica em fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos – papel do receptor GPR43 e da interleucina (IL)-18

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos

Belo Horizonte

2018

“Sempre permaneça aventureiro. Por nenhum momento se esqueça de que a vida pertence aos que investigam. Ela não pertence ao estático, ela pertence ao que flui. Nunca se torne um reservatório, sempre permaneça um rio.”

Osho

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou meus estudos, sempre com muito amor e paciência;

À professora e amiga Lucíola da Silva Barcelos, que confiou em mim este projeto e tantos outros executados dentro do doutorado, pelas conversas, discussões acadêmicas, sempre me ajudando a conduzir os estudos da melhor maneira possível, entendendo minha imaturidade, ansiedade, angustias profissionais, sempre me ofertando novas tarefas para que em cada uma delas eu pudesse adquirir as habilidades profissionais e pessoais necessárias para meu desenvolvimento acadêmico. Obrigado por me ajudar neste processo de transformação, nunca esquecerei de você, você sempre será minha “orientadora”;

À Prof. Dra. Sílvia Passos pelas conversas acadêmicas, apoio e incentivo;

À todos os amigos do LanCet, dos laboratórios de Angiogênese e Apoptose, aos professores, alunos e técnicos dos Departamentos de Morfologia, Fisiologia e Farmacologia, Bioquímica e Imunologia e Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;

Ao CNPQ, CAPES e FAPEMIG por fomentar direto ou indiretamente a realização deste projeto.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado os efeitos da suplementação dietética com fibra solúveis na cicatrização de feridas cutâneas, bem como a contribuição do receptor 43 acoplado à proteína G (GPR43), também conhecido como receptor 2 de ácidos graxos livres (FFAR2), e da interleucina 18 (IL-18). Camundongos C57BL/6 selvagens (WT – *Wild-Type*) ou camundongos com deleção gênica para o receptor GPR43 (*Gpr43*^{-/-}) ou para a citocina IL-18 (*IL18*^{-/-}) foram alimentados com dieta AIN-93 modificada contendo baixo (LF – *Low Fiber*) ou alto teor de fibras solúveis (HF – *High Fiber*) e submetidos à remoção de fragmentos cutâneos de 5-mm de diâmetro na região tóraco-dorsal para a criação de lesões excisionais na pele. Observou-se que os camundongos do grupo WT-HF apresentaram acelerado fechamento das feridas, acompanhado de redução no infiltrado de neutrófilos e aumento de macrófagos e dos níveis de TNF, IL-1 β , IL-18, IL-4 e IL-10, aumento da angiogênese e redução do conteúdo de colágeno e da área da cicatriz nas feridas, quando comparados aos camundongos do grupo WT-LF. Resultados similares foram observados quando avaliamos os efeitos do acetato, o ácido graxo de cadeia curta ligante de GPR43 produzido em maior quantidade pela metabolização de fibras pela microbiota intestinal. Para tal, foi utilizado o modelo de tecido de granulação induzido experimentalmente pela implantação subcutânea de uma matriz de esponja de poliéster-poliuretano de 8-mm de diâmetro na região cervico-dorsal. O tratamento oral, mas não o tratamento local, com acetato, estimulou a angiogênese, reduziu o infiltrado de neutrófilos e aumentou o de macrófagos, bem como reduziu a produção de colágeno. Interessantemente, os efeitos da dieta rica em fibras solúveis foram abolidos tanto em camundongos *Gpr43*^{-/-}, quanto em camundongos *IL18*^{-/-}. A fim de melhor entender o papel de IL-18 na cicatrização de feridas, camundongos WT e *IL18*^{-/-}, alimentados com dieta padrão, foram submetidos aos dois modelos experimentais acima citados. Observou-se que os camundongos *IL18*^{-/-} apresentaram atraso no fechamento das feridas cutâneas, bem como redução em todos os componentes do tecido de granulação, tais como infiltrado de neutrófilos e macrófagos, número de vasos sanguíneos e conteúdo colágeno, em ambos os modelos, sem, no entanto, alterar a área da cicatriz nas feridas cutâneas, quando comparados aos camundongos WT. Finalmente, a fim de investigar qual a principal fonte de IL-18 envolvida nos efeitos da dieta rica em fibras solúveis sobre a cicatrização de lesões cutâneas, foram criados animais quiméricos, nos quais a medula óssea foi transplantada de camundongos WT para camundongos WT-HF, WT-LF e *IL18*^{-/-}-HF ou de camundongos *IL18*^{-/-} para WT-HF. Todos os animais receptores foram previamente submetidos à depleção total da medula óssea com radiação de 8 Gy. Observou-se atraso no fechamento das feridas cutâneas em camundongos WT-HF portadores de células hematopoiéticas *IL18*^{-/-}, quando comparados aos camundongos WT-HF portadores de células hematopoiéticas WT. Em conjunto, os dados sugerem que a suplementação dietética com um alto teor de fibras solúveis acelera o fechamento de feridas cutâneas, de modo dependente do receptor GPR43 e da produção de IL-18 por células derivadas da medula óssea. Este trabalho não só contribui para o conhecimento do impacto da microbiota, dos ácidos graxos de cadeia curta e da IL-18 na cicatrização de feridas cutâneas, mas também apresenta uma alternativa inovadora, segura e econômica no tratamento das feridas cutâneas através da suplementação dietética com fibras solúveis.

Palavras-chave: Feridas cutâneas, microbiota, GPR43, dieta rica em fibra solúvel e IL-18.

ABSTRACT

In this work, we evaluated the effects of dietary supplementation with soluble fiber on the healing of cutaneous wounds, as well as the contribution of the G protein-coupled receptor (GPR43), also known as free fatty acid receptor 2 (FFAR2), and of the interleukin 18 (IL-18) for these effects. Wild-type C57BL/6 or gene knockout mice for GPR43 (*Gpr43^{-/-}*) or IL-18 (*IL18^{-/-}*) were fed with modified AIN-93 diet containing low (LF-Low Fiber) or high soluble fiber (HF) contents and submitted to the removal of 5-mm diameter cutaneous fragments from the thoraco-dorsal region for the creation of excisional lesions in the skin. The WT-HF group showed accelerated wound closure, reduction in neutrophil content and increased macrophages, and levels of TNF, IL-1 β , IL-18, IL-4 and IL-10, increased angiogenesis, and reduced collagen content and scar area in wounds when compared to the WT-LF group. Similar results were observed when we evaluated the effects of acetate, a GPR43 short chain fatty acid ligand that is produced in greater amounts by the metabolization of fibers by the intestinal microbiota. To that, we used the experimental model of granulation tissue formation induced by the subcutaneous implantation of a 8-mm diameter polyester-polyurethane sponge matrix in the dorsal region. Oral, but not intra-implant treatment, with acetate, stimulated angiogenesis, reduced neutrophil infiltration and increased macrophage as well as reduced collagen production. Interestingly, the effects of the high soluble fibers diet were abolished in both *Gpr43^{-/-}* and in *IL18^{-/-}* mice. In order to better understand the role of IL-18 in wound healing, WT and *IL18^{-/-}* mice, fed with standard diet, were submitted to the two abovementioned experimental models. *IL18^{-/-}* mice presented delayed closure of cutaneous wounds, as well as reduction in all granulation tissue components, such as neutrophil and macrophages infiltration, number of blood vessels and collagen content, in both models, without, however, altering the scar area in the cutaneous wounds when compared to the WT mice. Finally, in order to investigate the main source of IL-18 involved in the effects of the high soluble fiber diet on the healing of cutaneous lesions, chimeric animals were created after bone marrow transplantation from WT mice to 8-Gy-irradiated WT-HF, WT-LF and *IL18^{-/-}*-HF mice or from *IL18^{-/-}* mice to irradiated WT-HF. Delayed skin wound closure was observed in WT-HF mice bearing *IL18^{-/-}* hematopoietic cells when compared to WT-HF mice harboring WT hematopoietic cells. Taken together, our data suggest that dietary supplementation with a high content of soluble fiber accelerates skin wound closure in both GPR43-dependent manner and bone-marrow-derived IL-18-dependent manner. This work not only contributes to the knowledge of the impact of microbiota, short chain fatty acids and IL-18 on the healing of cutaneous wounds, but also presents an innovative, safe and economical alternative for the treatment of cutaneous wounds through dietary supplementation with soluble fibers.

Key words: Skin wounds, microbiota, GPR43, high soluble fiber diet and IL-18.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tecido tegumentar.....	15
Figura 2. Múltiplos fatores podem influenciar a composição da microbiota cutânea.....	17
Figura 3. Etapas da cicatrização de feridas.....	24
Figura 4. Via de transdução de sinal IL-18.....	26
Figura 5. Ativação da via inflamasoma durante a cicatrização de feridas ou fibrose.....	27
Figura 6. Dieta rica em fibra, SCFAs e alguns mecanismos associados a manutenção da homeostase intestinal.....	31
Figura 7. Modelo de feridas excisionais.....	35
Figura 8. Desenho experimental 1.....	39
Figura 9. Desenho experimental 2.....	40
Figura 10. Desenho experimental 3.....	41
Figura 11. Desenho experimental 4.....	42
Figure 12. Desenho experimental 5.....	43
Figura 13. Desenho experimental 6.....	44
Figura 14. Esquema demonstrativo das principais estruturas analisadas por morfometria digital.....	50
Figura 15. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o fechamento de feridas cutâneas (goma guar).....	52
Figura 16. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o fechamento de feridas cutâneas (pectina).....	53
Figura 17. Efeitos da dieta rica em fibras sobre a infiltração leucocitária na ferida (goma guar).....	55

Figura 18. Efeitos da dieta rica em fibras (pectina) sobre o infiltrado de leucócitos.....	56
Figura 19. Efeitos da dieta rica em fibras sobre a concentração de citocinas e quimiocinas em feridas cutâneas.....	57
Figura 20. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o tecido de granulação e a neovascularização em feridas cutâneas.....	59
Figura 21. Efeitos da dieta rica em fibra na deposição de colágeno e área cicatricial.....	61
Figura 22. Efeitos da dieta com rica em fibra (pectina) na deposição de colágeno e na área cicatricial.....	62
Figura 23. Efeitos do acetato administrado localmente intra-implante.....	64
Figura 24. Efeitos do acetato administrado por via oral.....	66
Figura 25. Avaliação do fechamento das feridas cutâneas em camundongos IL18 ^{-/-}	67
Figura 26. Avaliação da infiltração leucocitária na ferida cutânea e no tecido fibrovascular em camundongos IL18 ^{-/-}	69
Figura 27. Avaliação da concentração de citocinas nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular em camundongos IL18 ^{-/-}	70
Figura 28. Avaliação do tecido de granulação na ferida cutânea e no tecido fibrovascular de camundongos IL18 ^{-/-}	72
Figura 29. Avaliação da angiogênese em feridas cutâneas e no tecido fibrovascular de camundongos com deficiência de IL18 ^{-/-}	74
Figura 30. Avaliação da deposição de colágeno em feridas de camundongos IL18 ^{-/-}	76

Figura 31. Efeitos da dieta rica em fibra sobre o fechamento da ferida de camundongos WT e IL18 ^{-/-}	77
Figura 32. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o infiltrado de leucócitos nas feridas de camundongos WT e IL18 ^{-/-}	78
Figura 33. Efeitos da dieta rica em fibra sobre componentes do tecido de granulação nas feridas de camundongos WT e IL18 ^{-/-}	80
Figura 34. Efeitos da dieta rica em fibra sobre o fechamento da ferida em quimeras de medula óssea entre camundongos WT e IL18 ^{-/-}	82

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição das dietas com alto (HF) e baixo teor em fibras (LF).....	35
Tabela 2. Grupos experimentais desenho experimental 1.....	38
Tabela 3. Grupos experimentais do desenho experimental 2.....	39
Tabela 4. Grupos experimentais do desenho experimental 3.....	38
Tabela 5. Grupos experimentais do desenho experimental 4.....	41
Tabela 6. Grupos experimentais desenho experimental 5.....	42
Tabela 7. Grupos experimentais desenho experimental 6.....	43
Tabela 8. Análise qualitativa de infiltração leucocitária na ferida.....	55
Tabela 9. Resumo dos resultados do objetivo I.....	83
Tabela 10. Resumo dos principais resultados do tratamento com acetato intra-implante.....	83
Tabela 11. Resumo dos principais resultados do tratamento oral com acetato.....	83
Tabela 12. Resumo dos principais resultados do objetivo II.....	84
Tabela 13. Resumo dos principais resultados do objetivo III.....	84
Tabela 14. Resumo dos principais resultados do objetivo III (Avaliação dos efeitos da dieta rica em fibra em camundongos IL18 ^{-/-}	85
Tabela 15. Resumo dos principais resultados do objetivo III (Avaliação dos efeitos da dieta rica em quimera de camundongos WT e IL18 ^{-/-}).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CXCL1/KC** Quimiocina motivo C-X-C ligante 1/ Quimiocina derivada de queratinócitos
- CXCL2/MIP-2** Quimiocina motivo C-X-C ligante 2/ Proteína inflamatória derivada de macrófagos
- CCL2/MCP-1** Quimiocina motivo C-C ligante 2/ Proteína quimiotática de macrófagos
- DAMPs** Padrões moleculares associados a dano
- DC** Célula dendrítica
- ELISA** *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- E.P.M** Erro padrão da média
- FGF** Fator de crescimento de fibroblastos
- FIZZ1** Proteína encontrada na zona inflamatória
- H&E** Hematoxilina-Eosina
- ICAM-1** Molécula de adesão intercelular
- IFN- γ** Interferon gama
- IL-1 β** Interleucina 1 beta
- IL-2** Interleucina 2
- IL-4** Interleucina 4
- IL-10** Interleucina 10
- IL-12** Interleucina 12
- IL-18** Interleucina 18
- IL-23** Interleucina 23
- IL-24** Interleucina 24
- IL-34** Interleucina 34
- INOS** Óxido nítrico sintase induzida
- LPS** Lipopolissacarídeo
- M-CSF** Fator estimulador de colônias de macrófagos
- MPO** Mieloperoxidase
- NAG** N-acetil- β -D-glicosaminidase
- MAMPs** Padrões moleculares associados a patógenos
- PDGF** Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PRRs** Receptores de reconhecimento de padrões
- TGF- β** Fator de crescimento transformante beta

TLR Receptor do tipo Toll

TNF- Fator de necrose tumoral alfa

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

μL Microlitros

% Porcentagem

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Tecido tegumentar e microbiota da pele</i>	15
2.2 <i>Cicatrização de feridas cutâneas</i>	19
2.3 <i>Complexo inflamasoma, IL-18 e reparo tecidual</i>	24
2.4 <i>Microbiota intestinal e dieta rica em fibra</i>	26
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
5. RESULTADOS	51
5.1 <i>Resultados I</i>	51
5.2 <i>Resultados II</i>	66
5.3 <i>Resultados III</i>	80
5.4 <i>Resumo dos resultados</i>	85
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXO I	103
ANEXO II	104

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos adultos, a capacidade regenerativa da pele após uma lesão é limitada. Nestes organismos, o reparo cutâneo se dá por meio da cicatrização. Diferente da regeneração, na qual, após uma lesão, o tecido restaura sua arquitetura original, na cicatrização, o tecido afetado, diminui significativamente sua funcionalidade, uma vez que o tecido original é substituído por uma cicatriz fibrótica (WYNN e VANNELLA, 2016; ANDREWS *et al.*, 2016).

Embora a cicatrização seja um evento fisiológico, podem ocorrer falhas nos mecanismos que regulam cada fase do processo cicatricial, como ocorre nas desordens cicatriciais, como por exemplo, as feridas crônicas e isquêmicas, úlceras diabéticas, deiscências cirúrgicas e cicatrizes hipertróficas (FRYKBERG; BANKS, 2015).

As desordens cicatriciais são consideradas como um relevante problema de saúde pública, uma vez que aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo são acometidas por problemas de saúde relacionados a cicatrização, dos quais são responsáveis por cerca de 2-4% de todas as despesas de saúde no mundo (MEISSNER, 2014).

No Brasil, as feridas crônicas, por exemplo, estão associadas a um aumento nas taxas de internações e gastos hospitalares, afastamentos para o trabalho e mortes associada à septicemia (REIS *et al.*, 2013).

Atualmente, existem uma série de fatores, que dificultam o tratamento das feridas cutâneas, como por exemplo, a falta de conhecimento sobre os mecanismos biológicos básicos envolvidos na cicatrização (PATEL; MAHESHWARI; CHANDRA, 2016) e a falta de especificidade das terapias atuais (CULLUM *et al.*, 2016). Por isso, torna-se fundamental o estudo de novas estratégias terapêuticas na cicatrização.

Nos últimos anos, o sistema imune tem sido um importante alvo das investigações científicas na área de cicatrização de feridas. Isso porque a manipulação deste sistema poderia estimular a capacidade intrínseca de

cicatrização do indivíduo (GODWIN; PINTO; ROSENTHAL, 2016; WYNN; VANNELLA, 2016).

Nesta tese, apresentamos uma proposta de intervenção no processo de cicatrização de feridas através da manipulação da microbiota intestinal por meio da suplementação alimentar com uma dieta rica em fibras solúveis (MAIER *et al.*, 2013; SCALES; HUFFNAGLE, 2013b; WONG *et al.*, 2013; SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016).

A ideia deste projeto partiu de uma série de evidências científicas que demonstravam que a suplementação dietética com fibras solúveis era capaz de modular a resposta inflamatória sistêmica em diversas patologias como a obesidade, colite ulcerativa e doenças do sistema nervoso central (SIVAPRAKASAM; PRASAD; SINGH, 2016).

Assim, nesta tese, buscou-se resolver a seguinte **hipótese**: Visto que subprodutos produzidos a partir da fermentação de fibras dietéticas pela microbiota intestinal são capazes de modular sistemicamente a inflamação e, sendo a inflamação um evento determinante para o desfecho da cicatrização, uma alimentação rica em fibras solúveis poderia influenciar a cicatrização de feridas cutâneas.

É importante ressaltar, que durante a execução do projeto de pesquisa buscou-se avaliar não só papel da dieta rica em fibra na cicatrização, mas também entender o papel biológico da citocina IL-18, iNOS e IFN- γ , suas possíveis relações relação com efeitos da dieta rica em fibra. Os resultados envolvendo iNOS e IFN- γ na cicatrização de feridas estão apresentados na íntegra, os quais foram publicados nos periódicos *Mediators of Inflammation* no ano de 2015 e *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* no ano de 2018 (Anexo A).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido tegumentar e microbiota da pele

O tecido tegumentar ou pele é o maior órgão dos mamíferos, com aproximadamente 1,8 m² de superfície total, e é constituído por três camadas: (1) a epiderme, que é a camada mais superficial da pele, estando diretamente em contato com o meio externo, sendo formada principalmente por células denominadas de queratinócitos, os quais possuem uma alta atividade mitótica, podendo migrar por toda a superfície epitelial; (2) a derme, que contém inúmeras células residentes, especialmente macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, sendo estas últimas, responsáveis por produzirem proteínas da matriz extracelular (MEC), como, por exemplo, colágeno e elastina; e (3) a hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo, que encontra-se abaixo da derme, e é um tecido formado principalmente por células adiposas e vasos sanguíneos, atuando, principalmente, como uma camada protetora, isolante térmico e reservatório de energia (SANMIGUEL; GRICE, 2016) (Figura 1).

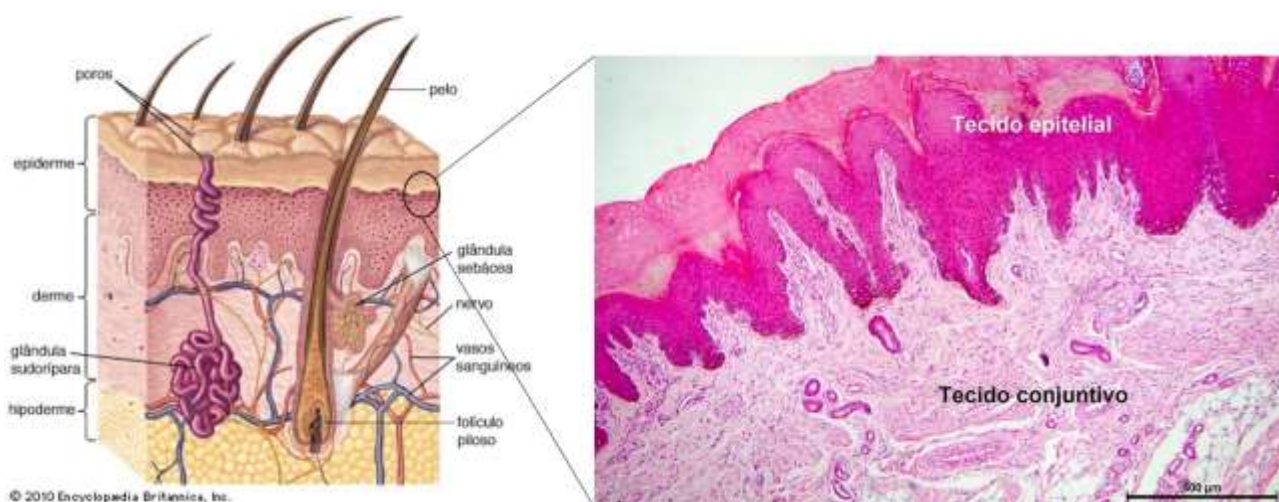


Figura 1. Tecido tegumentar. A pele pode ser dividida em três camadas, a epiderme, derme e hipoderme. Na imagem à direita, trata-se de um desenho esquemático da pele e suas camadas. Na esquerda, trata-se de uma fotomicrografia de corte histológico da pele humana, evidenciando o tecido epitelial e o tecido conjuntivo. Fonte: Google imagens, modificado pelo autor.

A pele exerce inúmeras funções, dentre elas: (1) atuação como barreira protetora contra lesão, perdas de líquido, substâncias nocivas e infecção; (2)

regulação térmica através das glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos; (3) atua como órgão sensorial por meio de suas terminações sensitivas; e (4) participa do metabolismo de algumas vitaminas como a vitamina D (ROMANOVSKY, 2014)(TAKEO; LEE; ITO, 2015).

Além disso, a pele é colonizada por microrganismos residentes e transitórios(CHRISTENSEN; BRÜGGEMANN, 2014). Em humanos, por exemplo, as principais bactérias da pele são pertencentes à quatro filos principais: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Nestes filos, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus* são os gêneros bacterianos mais encontrados(SCHOMMER; GALLO, 2013).

Nos últimos anos, as investigações científicas tem demonstrando que a microbiota comensal¹ participa de uma série de funções como a proteção contra microrganismos patogênicos, absorção de nutrientes e homeostasia do sistema imunológico(RODRIGUES HOFFMANN, 2017).

Os microrganismos da pele não residem somente na superfície cutânea, mas também no interior de seus anexos, como folículos pilosos e glândulas sebáceas (COGEN; NIZET; GALLO, 2008). Essas comunidades microbianas formam diferentes nichos em cada região da pele, os quais são influenciados por diferenças de pH, temperatura, umidade, conteúdo lipídico e topografia (SANFORD; GALLO, 2013). Além disso, fatores metabólicos, dietéticos, nutricionais, nível de estresse e a presença ou não de co-morbididades, também influenciam a composição da microbiota cutânea (HOLMES *et al.*, 2015) (Figura 2).

¹ A microbiota comensal (também chamada de indígena, autóctone ou normal) consiste em um grupo de microrganismos como fungos, vírus e bactérias. Nos mamíferos, esses microrganismos estão presentes, principalmente, nas superfícies epiteliais de tecidos que estão em contato íntimo com o meio externo, como por exemplo, o epitélio do trato gastrointestinal, respiratório superior, urinário inferior e pele (BELKAID; HAND, 2014)

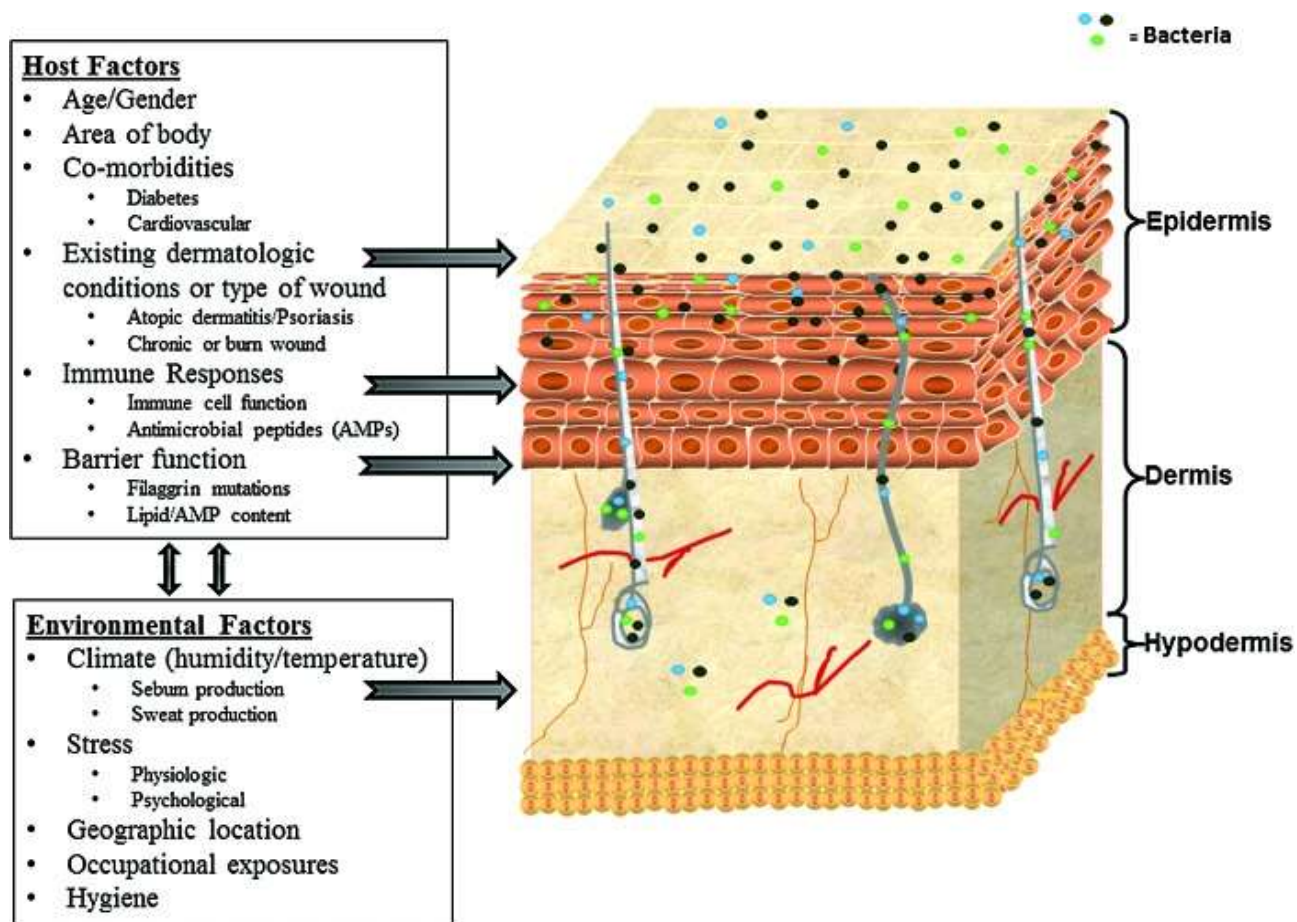


Figura 2. Múltiplos fatores podem influenciar a composição da microbiota cutânea. Fonte: Imagem original de HOLMES, C. J. *et al.* Dynamic Role of Host Stress Responses in Modulating the Cutaneous Microbiome: Implications for Wound Healing and Infection. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 1, p. 24–37, 2015

Os mecanismos envolvidos nas interações entre células da pele e os microrganismos da microbiota local são complexos. Um mecanismo conhecido é o reconhecimento de microrganismos pelas células da pele através de receptores denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como por exemplo, os receptores do tipo Toll (TLRs). Esses receptores, se ligam a padrões moleculares associados a patógenos (MAMPs), como lipopolisacarídeos e ácido lipoteicoico. Assim, a ativação de PRRs, em queratinócitos, por exemplo, resulta na secreção de uma série de mediadores químicos como os peptídeos antimicrobianos (AMPs), citocinas e quimiocinas, influenciando o comportamento de células da pele e do sistema imunológico (GRICE; SEGRE, 2011).

Ainda, metabólitos bacterianos produzidos pela microbiota local, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), parecem também influenciar o

comportamento das células da pele, estimulando não só a produção de mediadores solúveis, mas também a migração e proliferação de celular (SCALES; HUFFNAGLE, 2013a; MANGONI; MCDERMOTT; ZASLOFF, 2016).

Diante da gama de funções exercidas pela pele, bem como suas funções como barreira protetora, que o reparo deste órgão deve iniciar-se o mais breve possível, por meio da cicatrização, que será abordada no tópico a seguir (BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013).

2.2 Cicatrização de feridas cutâneas

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo fisiológico, dinâmico, que envolve interações complexas entre células, moléculas da MEC e mediadores solúveis. O principal objetivo da cicatrização cutânea é a restauração da função da pele como barreira protetora. A cicatrização pode ser classificada em quatro fases: hemostasia, inflamatória, proliferativa e de remodelamento (EMING *et al.*, 2014) (Figura 3).

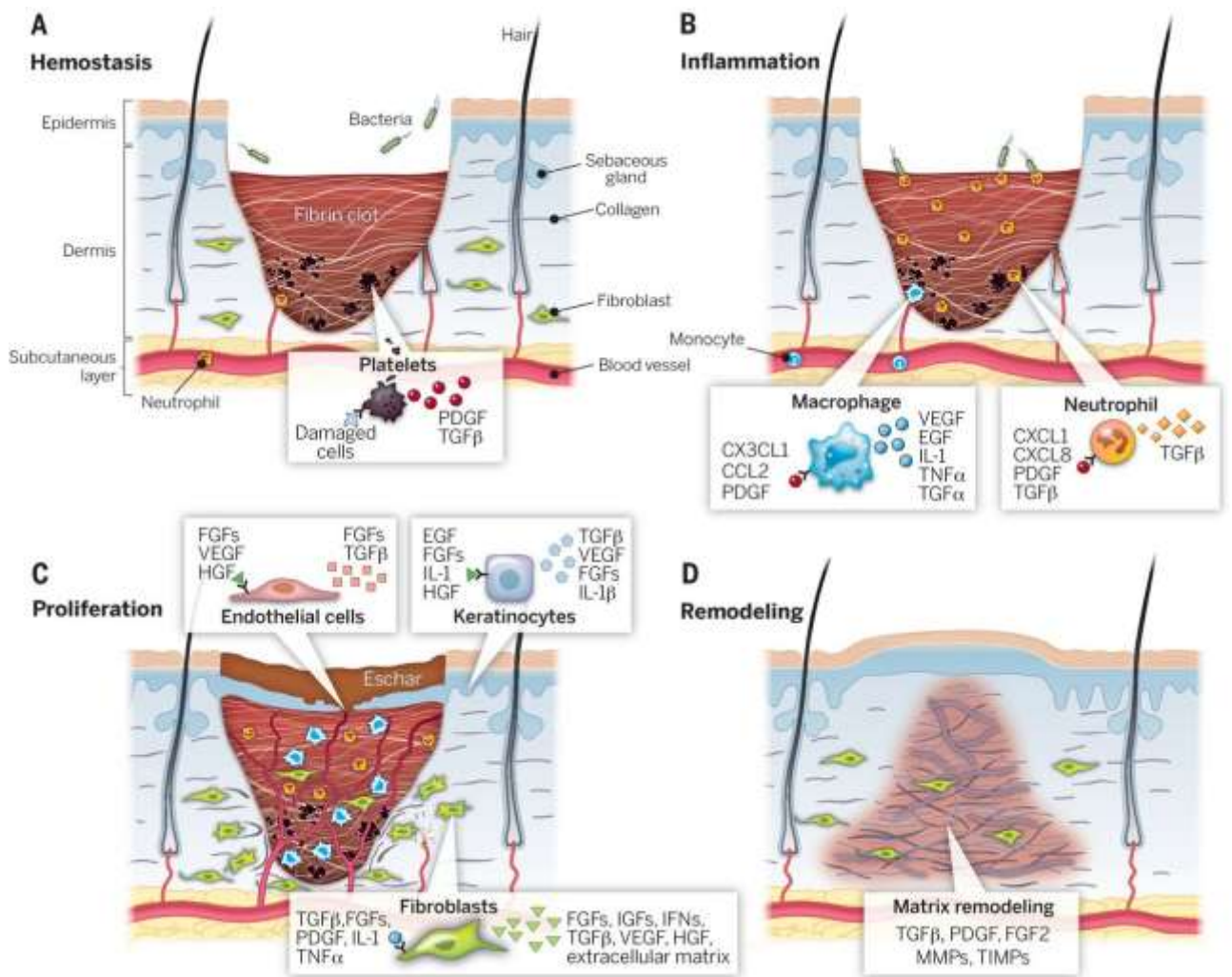


Figura 3. Etapas da cicatrização de feridas. A cicatrização de feridas pode ser classificada em quatro estágios: (A) hemostasia, (B) inflamação, (C) proliferação e (D) remodelação. Cada estágio é caracterizado por eventos moleculares e celulares, sendo coordenado por uma série de mediadores químicos que são liberados e reconhecidos pelas células no local da lesão. Fonte: Imagem original de Sun BK, Sibrashvili Z, Khavari PA. *Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds*. Science. 2014. p. 941–5.

A fase de hemostasia inicia-se imediatamente após a lesão, como consequência da interrupção da barreira epidérmica e ruptura de vasos sanguíneos no local da ferida. Em seguida, ocorre a ativação da cascata de coagulação sanguínea na área lesada, induzindo a formação de um coágulo formado por proteínas como vitronectina, trombospondina e fibrina, que dentre outras funções, minimiza a perda sanguínea a partir de vasos lesados na região; preenche os espaços intercelulares e fornece uma MEC provisória para adesão e migração celular (PARK; BARBUL, 2004; GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

Além disso, a degranulação plaquetária libera uma série de citocinas e quimiocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1 α (IL1- α) e quimiocina CXC ligante 1 (CXCL-1), que estimulam o recrutamento de leucócitos circulantes para o leito da ferida (REINKE; SORG, 2012).

As células residentes no tecido lesado, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos, reconhecem tanto padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), tais como o lipopolissacarídeo (LPS), quanto moléculas associadas a dano celular (DAMPs), como o ácido desoxirribonucleico (DNA) (PORTOU *et al.*, 2015). Em resposta, estas células secretam inúmeros mediadores vasoativos como a histamina, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e TNF, que promovem alterações na microvasculatura local, como vasodilatação, aumento da permeabilidade e a expressão de moléculas adesivas, como moléculas de adesão intercelular (ICAMs), integrinas e selectinas no endotélio, permitindo a interação de células circulantes com o endotélio e consequentemente a migração dessas células para a área o leito da ferida (EMING *et al.*, 2014; BODNAR, 2015).

Dentre esses leucócitos, os neutrófilos, que infiltram a ferida logo nas primeiras horas após a lesão, possuem um papel fundamental na fagocitose e eliminação de bactérias, através da secreção de substâncias, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e mieloperoxidase (MPO) (SU; RICHMOND, 2015). Além disso, os neutrófilos secretam proteases de matriz como as metaloproteínases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), que degradam o tecido necrótico no sítio da lesão, permitindo a formação do novo tecido (tecido de granulação). Entretanto, falhas nos mecanismos que regulam a ação de neutrófilos na ferida, pode resultar

em retardo na cicatrização de feridas, formação de cicatrizes ou feridas crônicas (ZHANG *et al.*, 2014).

Outro importante mediador liberado pelas células no local da lesão é a quimiocina CC ligante 2 (CCL-2), que estimula o recrutamento de monócitos circulantes para a região (SU; RICHMOND, 2015). No tecido, os monócitos se diferenciam em macrófagos, podendo assumir diferentes fenótipos em resposta aos sinais do microambiente da ferida (SINDRILARU; SCHARFFETTER-KOCHANEK, 2013).

O fim da fase inflamatória é marcado pela resolução da inflamação, um processo ativo, caracterizado pela remoção de neutrófilos apoptóticos e pela liberação de mediadores anti-inflamatórios ou pró-resolutivos, como a IL-10 e o TGF- β , que dentre outros efeitos, reduzem a migração e ativação de leucócitos na área lesada (WHITE; MANTOVANI, 2013). A resolução da inflamação é de fato um evento crítico para homeostase cutânea após uma lesão, uma vez que a inflamação persistente dificulta a formação do novo tecido (SATISH, 2015; SALAZAR; ENNIS; KOH, 2016).

Além da liberação de mediadores inflamatórios, essa fase também é marcada pela secreção de mediadores pró-angiogênicos e pró-fibrogênicos, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), VEGF e TGF- β (BRUNO *et al.*, 2014). Esses mediadores induzem a proliferação de células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos, além de estimularem a síntese de proteínas da MEC (GREAVES *et al.*, 2013).

Na fase proliferativa, ocorre o restabelecimento da superfície cutânea, a formação do tecido de granulação (novo tecido) e a restauração da rede vascular na área lesada (MORTON; PHILLIPS, 2012). A MEC provisória formada na fase de hemostasia é lentamente substituída por proteínas colagênicas, como o colágeno do tipo III ou colágeno imaturo (COELHO; MCCULLOCH, 2016).

Além disso, durante a fase proliferativa, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), que é um evento essencial no reparo cutâneo, pois é através da angiogênese que ocorre o fornecimento de nutrientes e oxigênio para a área lesada, uma falha neste processo, induz a necrose da área lesada, o que

frequentemente está associada a infecção e septicemia (KASTELLORIZIOS; PAPADIMITRAKOPOULOS; BURGESS, 2015).

Um importante mediador angiogênico liberado durante a fase proliferativa é o VEGF, que é secretado por diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (VAN GINDERACHTER, 2012). A neovascularização nas feridas se dá, principalmente, por meio do brotamento de células endoteliais a partir de uma rede vascular pré-existentes, bem como pode ser auxiliada pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011). Falhas nos mecanismos que regulam o processo angiogênico estão associados a cronificação do ferimento como ocorre em feridas diabéticas e isquêmicas (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000). Por outro lado, o crescimento excessivo ou persistente de novos vasos sanguíneos também está associado à cronificação da inflamação e desenvolvimento de fibrose tecidual (DIPIETRO, LUISA A., 2016).

No final da fase proliferativa, ocorre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Estas células encontram-se localizadas principalmente nas margens da ferida e são caracterizadas por conter grandes concentrações de actina α de músculo liso (α SMA) (WYNN e VANNELLA, 2016), isso permite que essas células realizem a contração da ferida que, em associação a migração e proliferação de queratinócitos, permite a aproximação das bordas epiteliais e, conseqüentemente, o fechamento da ferida (GREAVES *et al.*, 2013).

A fase de remodelamento é marcada pela transformação gradual do tecido de granulação em tecido cicatricial. Durante a formação do tecido cicatricial, ocorre a apoptose das células presentes no tecido de granulação, redução do número de vasos sanguíneos e um aumento significativo da deposição de colágeno, este tecido dará origem à cicatriz, um tecido fibrótico, acelular e avascular (MARTIN; NUNAN, 2015; COELHO; MCCULLOCH, 2016; DIPIETRO, L. A., 2016).

Outro evento importante na fase de remodelamento é a maturação do colágeno. Os fibroblastos e miofibroblastos secretam inicialmente colágeno do tipo III (imaturo), posteriormente, estas células secretam, um tipo de colágeno mais estável, o colágeno do tipo I ou colágeno maduro, que aumenta a resistência a tensão mecânica da MEC. O aumento da deposição de colágeno tipo I na ferida

marca a transição do tecido de granulação para uma cicatriz madura (MAQUART; MONBOISSE, 2014). Existem uma série de patologias associadas a falhas nos mecanismos que regulam a fibrogênese na ferida, podendo levar a deposição excessiva de colágeno e, conseqüentemente, à formação de cicatrizes hipertróficas (queloides) (MAQUART; MONBOISSE, 2014).

2.3 Complexo inflamasoma, IL-18 e reparo tecidual

Um importante papel do sistema imunológico é manter a homeostase tecidual em resposta a lesão ou a infecção. Para tanto, o sistema imune deve possuir a capacidade de detectar prontamente possíveis sinais de lesão ou de invasão de patógenos e iniciar o processo de reparo tecidual (LISTON; MASTERS, 2017). Além disso, durante a resposta, o sistema imune deve ser capaz de reconhecer e eliminar os agentes patogênicos, enquanto tolera os microrganismos da microbiota comensal (RATHINAM; CHAN, 2018).

Esse processo se dá, principalmente, pela ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - do inglês "Pattern Recognition Receptors") que são expressos por diferentes tipos celulares, sendo capazes de reconhecer padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) e padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). A ativação dos PRRs por MAMPs ou DAMPs desencadeia uma série de cascatas de sinalização intracelular que estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, interferon- γ , IL-1 β e IL-18. Em particular, a inflamação desencadeada por DAMPs, quando ocorre na ausência de patógenos, é denominada de inflamação estéril, característico de respostas de processos como trauma, feridas internas e isquemia (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; KOPITAR-JERALA, 2017).

Existem várias classes de PRRs e, dentre eles, os mais conhecidos são os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores pertencentes às famílias do tipo NOD (NLRs). Enquanto os TLRs são expressos na membrana celular, os NLRs são sensores citoplasmáticos que oligomerizam-se para formar complexos multiproteicos denominado inflamasoma (EVAVOLD; KAGAN, 2018). O complexo inflamasoma compreende complexos multiproteicos citosólicos que se agrupam em resposta à detecção de uma série de estímulos, sejam eles associados a infecção ou ao estresse, levando à ativação da resposta inflamatória, mediada, principalmente, pela ativação de caspase-1 e, conseqüentemente, à clivagem e secreção das formas ativas das citocinas da família IL-1, como IL-1 β e IL-18. Estas citocinas desempenham um papel central na resposta imunológica, uma vez que estas moléculas possuem uma diversidade de funções biológicas, bem como a capacidade de atuar sobre uma ampla gama de células-alvo (LEI-LESTON;

MURPHY; MALOY, 2017). Além de seu papel na ativação da resposta inflamatória em resposta ao reconhecimento de sinais endógenos e patógenos, estudos recentes sugerem que o inflamasoma também é um regulador crítico da microbiota comensal e está associado à fisiopatologia de uma série de doenças crônicas, como a gota, aterosclerose e síndrome metabólica (LAMKANFI; DIXIT, 2014).

Recentemente, também tem se discutido a relevância da citocina IL-18 para a cicatrização de feridas. Sabe-se que esta citocina é altamente expressa em fases iniciais do processo cicatricial (KÄMPFER, 2000), na angiogênese (VOLIN; KOCH, 2011) e feridas diabéticas (SABUNCU *et al.*, 2014). Além disso, IL-18 parece estar envolvida na regulação da deposição de colágeno, apresentando efeitos pró-fibroticos em modelos experimentais como o de lesão pulmonar aguda e de fibrose coronariana (GASSE *et al.*, 2007; XING; TAN, 2008). Por outro lado, dados na literatura apontam que a inibição da via Caspase-1, uma via importante para a produção de IL-18, parece possuir um caráter anti-fibrótico em modelo experimental de infecção pulmonar pelo vírus Influenza (THOMAS *et al.*, 2009). Porém, o papel de IL-18 na cicatrização de feridas permanece desconhecido.

A IL-18, em especial, descoberta há apenas 20 anos, foi inicialmente conhecida como fator indutor de interferon (IFN)- γ devido à sua capacidade de induzir linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) a liberar IFN- γ . Essa citocina é expressa por diferentes tipos celulares, tais como macrófagos, células dendríticas (DCs), células epiteliais e queratinócitos (SANDERS; MISHRA, 2016) e utiliza a via de sinalização do NF- κ B para a indução de mediadores inflamatórios, como moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas (KAPLANSKI, 2018) (Figura 4).

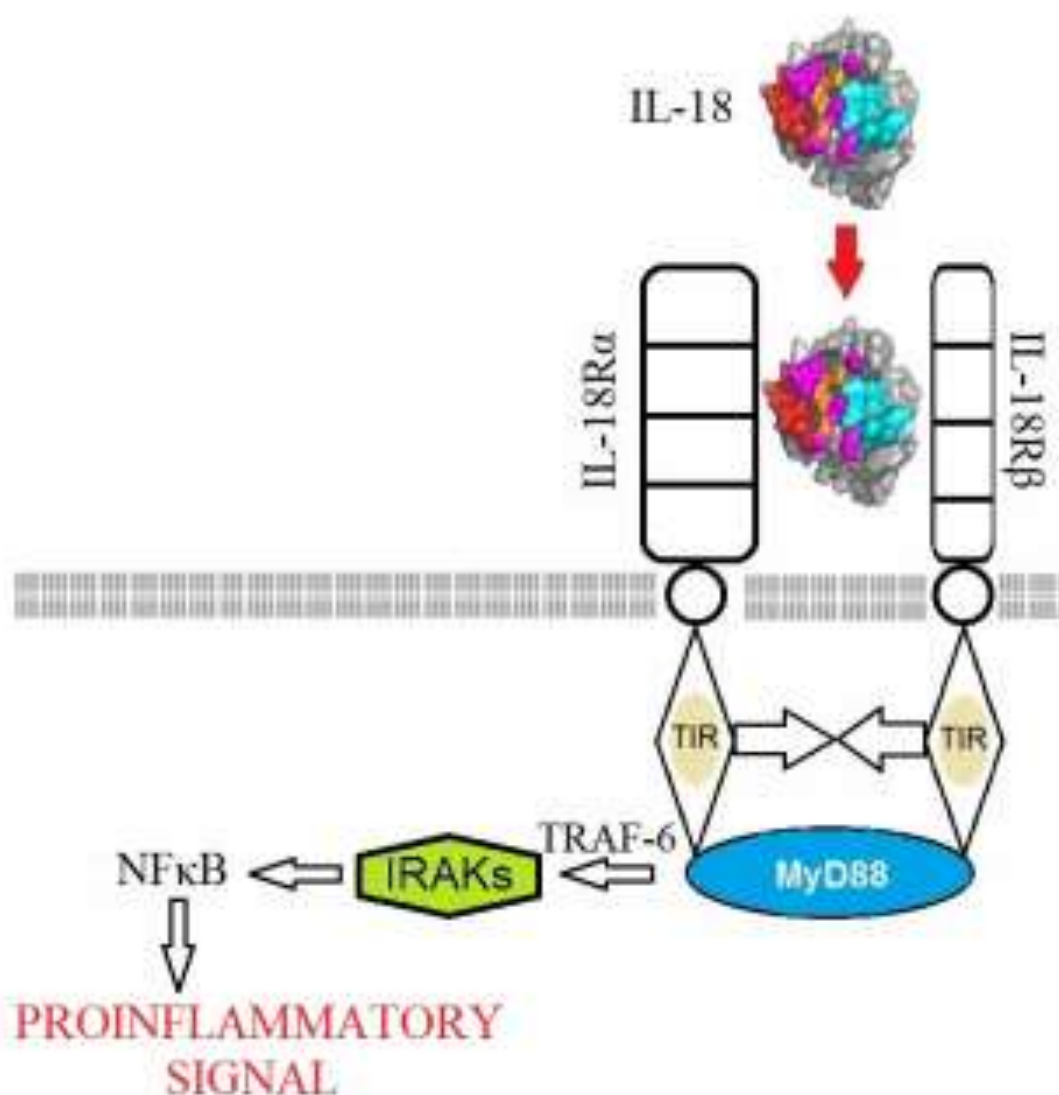


Figura 4. Via de transdução de sinal IL-18. Fonte: Wawrocki S, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. Acta Biochimica Polonica. 2016. p. 59–63.

Poucos estudos investigaram o papel da IL-18 na cicatrização ou fibrose. Entretanto, sabe-se que o mRNA de IL-18 é expresso constitutivamente em baixos níveis endógenos na pele normal equanto, após a lesão, há um aumento significativo na expressão mRNA. A concentração da proteína IL-18 na pele é transitória, com um pico de concentração entre os dias 5-7 após a lesão, que retorna aos níveis normais com a completa re-epitelização, que ocorre em torno do 13º dia após a lesão (ARTLETT, 2013). Na cicatrização de feridas, a IL-18 induz a produção de TGFβ1 e pode induzir a secreção de IFN-γ pelas células inflamatórias. A adição de IL-18 em fibroblastos *in vitro* aumentou a expressão de proteínas de colágeno

tipo I e tipo III. Além disso, IL-18 aumenta a proliferação de fibroblastos, bem como induz a expressão de proteínas matricelulares como a osteopontina, que está associada à fibrose (ARTLETT, 2013) (Figura 5).

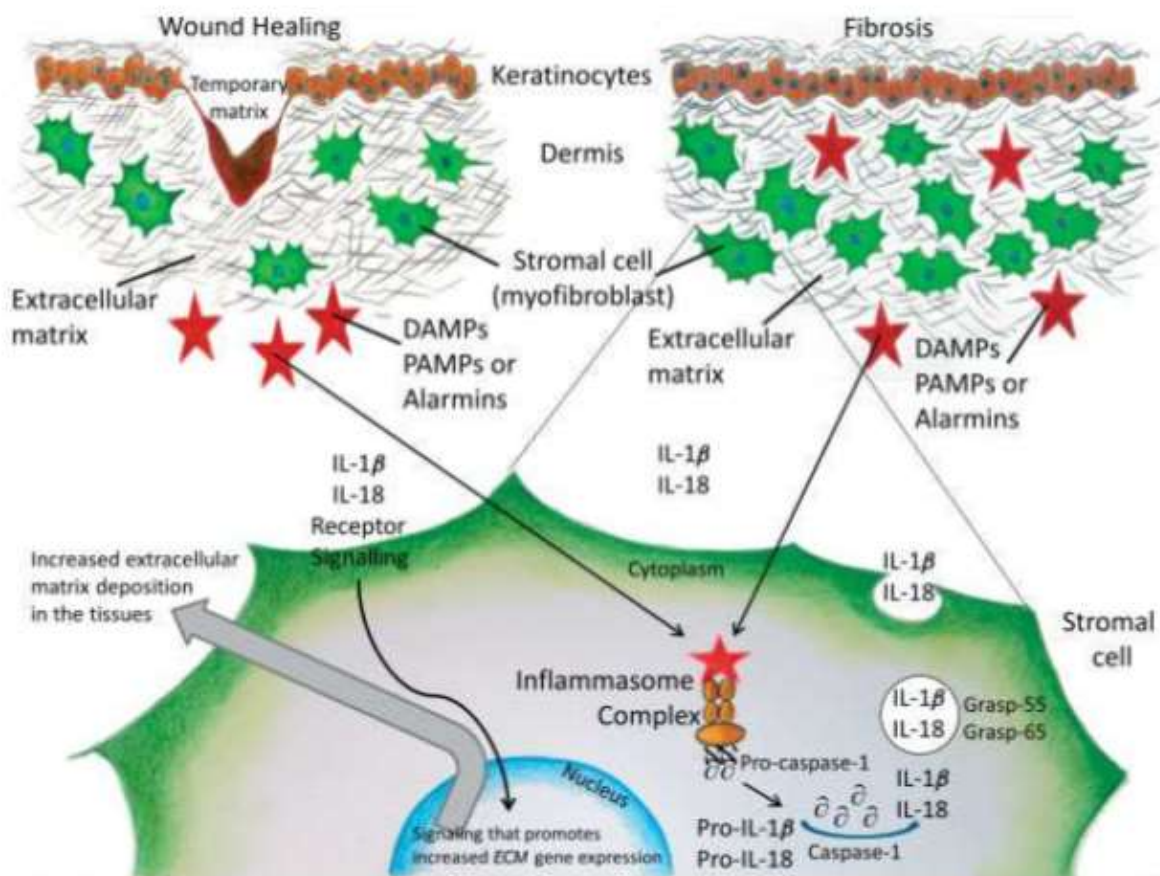


Figure 5. Ativação da via inflamasoma durante a cicatrização de feridas ou fibrose. O complexo inflamasoma se torna ativado durante a cicatrização ou fibrose da ferida, após reconhecimento de DAMPs ou MAMPs, induzindo a conversão nas formas ativas de IL-1 β e IL-18. A sinalização autócrina por IL-1 β e IL-18 estimulará a expressão de genes relacionados a moléculas da matriz extracelular, resultando, principalmente, na deposição de colágenos nos tecidos. Fonte: Artlett CM. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. J Pathol [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 Jan [cited 2016 Sep 2];229(2):157–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4116>

Assim, o estímulo ativador do complexo inflamasoma, MAMPs ou DAMPs, bem como as moléculas envolvidas no processo, são determinantes para o desfecho da resposta inflamatória, seja para a resolução e cicatrização da lesão, ou para a exacerbação do estímulo inflamatório e cronificação do processo, resultando em feridas crônicas e fibrose tecidual. Interessantemente, em um artigo de revisão,

ARTLETT (2013) especula que o fenômeno da resolução da lesão, em parte, parece estar relacionado com a ausência de sinal de iniciação (seja MAMPs ou DAMPs), enquanto que, nas doenças crônicas e na fibrose tecidual, os MAMPs ou DAMPs não eliminados levariam à ativação contínua do inflamasoma e processamento de IL-1 e IL-18.

2.4 Microbiota intestinal e dieta rica em fibra

Estudos tem demonstrado que a microbiota intestinal participa de uma série de funções no organismo do hospedeiro, como a proteção contra microrganismos patogênicos (BÄR *et al.*, 2015), homeostasia do sistema imune (BELKAID; HAND, 2014), metabolismo lipídico (MISHRA; DUBEY; GHOSH, 2016), respostas comportamentais (BIENENSTOCK *et al.*, 2015), reparo tecidual (CANESSO *et al.*, 2014), absorção de nutrientes, produção de vitaminas e metabolismo de compostos não-digestíveis (MARCHESI *et al.*, 2016).

Essas funções estão intimamente associadas à composição da microbiota intestinal que, em indivíduos saudáveis, é predominantemente constituída por bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Entretanto, a composição da microbiota, pode ser alterada por uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro, tais como doenças, estresse, envelhecimento, uso de fármacos, sistema imunológico e hábitos alimentares (MARCHESI *et al.*, 2016).

Existem cada vez mais evidências demonstrando que um desequilíbrio da comunidade microbiana intestinal, condição denominada disbiose, está associada a uma série de patologias extra-intestinais, como obesidade (GÉRARD, 2016), hipertensão (JOSE; RAJ, 2015), diabetes (HU; WONG; WEN, 2015), doenças cardiovasculares (KOUTSOS; TUOHY; LOVEGROVE, 2015) e fibrose tecidual (SCALES e HUFFNAGLE, 2013).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que animais *germ-free*² submetidos ao modelo experimental de ferida cutânea excisional, apresentaram acelerado fechamento das feridas, aumento da angiogênese, diminuição da resposta inflamatória e menor área cicatricial, quando comparados a animais convencionais, sugerindo um importante papel da microbiota na regulação dos processos associadas ao processo reparo tecidual (CANESSO *et al.*, 2014). Além disso, estudos experimentais tem demonstrando que a microbiota intestinal parece regular a inflamação sistêmica, o que também poderia afetar a cicatrização de feridas em locais fora do trato gastrointestinal (SCALES; HUFFNAGLE, 2013).

² São animais isentos de microbiota comensal. Tais animais são criados dentro de isoladores livres de germes, a fim de controlar a sua exposição a agentes virais, bactérias ou parasitários (GROVER; KASHYAP, 2014).

Dentre estes fatores capazes de alterar a composição da microbiota intestinal e influenciar a saúde do hospedeiro, a dieta é um fator crítico, promovendo repercussões diretas na saúde do hospedeiro (FLINT, 2012). Atualmente, as alterações no eixo dieta-microbiota têm sido bastante estudadas para entender a associação entre o aumento da incidência/prevalência de alergias e doenças inflamatórias crônicas ao estilo de vida ocidental (*Western lifestyle*) (KEENAN *et al.*, 2015). Uma dieta rica em fibra estimula uma maior diversidade de microrganismos benéficos no intestino, como as bactérias dos gêneros *Prevotella* e *Bacteroides*. Por outro lado, uma dieta ocidentalizada (rica em gordura e açúcar e pobres em fibras) estimula o predomínio de algumas bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria*, além de diminuir bactérias do filo *Firmicutes*, importantes para a fermentação de fibras no intestino (SIMPSON; CAMPBELL, 2015).

A fibra dietética, ou também denominadas fibra alimentar, pode ser definida como uma substância de origem vegetal, resistente à digestão e à absorção no intestino delgado. Essas substâncias são metabolizadas através da fermentação parcial ou completa no intestino grosso pela microbiota local (SARMENTO; BERNAUD; RODRIGUES, 2013; BULTMAN, 2016). Além disso, são consideradas como prébióticos, pois funcionam como substratos alimentares, promovendo a seleção e proliferação de bactérias benéficas da microbiota intestinal (CONLON; BIRD, 2014).

Existem inúmeras evidências demonstrando que os efeitos benéficos das fibras no organismo do hospedeiro são produzidos, em parte, pela liberação de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) produzidos durante a fermentação de fibras no lúmen intestinal. Os principais SCFAs produzidos durante a fermentação de fibras são: acetato, propionato e butirato. Os SCFAs são utilizados pelos enterócitos do cólon como fonte energética e auxiliam na manutenção da integridade do epitélio intestinal (HASEGAWA; INOHARA, 2014).

Além disso, os SCFAs podem exercer efeitos sistêmicos como, por exemplo, a influenciar na migração celular, aumento do fluxo de cálcio intracelular e a inibição de vias de sinalização celular (MASLOWSKI *et al.*, 2009; TAN, J. *et al.*, 2014). As evidências científicas atuais apontam que uma diminuição da produção de SCFAs

pode estar associada à patogênese das alergias, cânceres, doenças auto-imunes, metabólicas e neurológicas (MASLOWSKI *et al.*, 2009).

Estudos experimentais têm demonstrado que a administração de SCFAs é capaz de produzir efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos em modelos experimentais de artrite e doença inflamatória intestinal (MACIA *et al.*, 2015b; VIEIRA *et al.*, 2015).

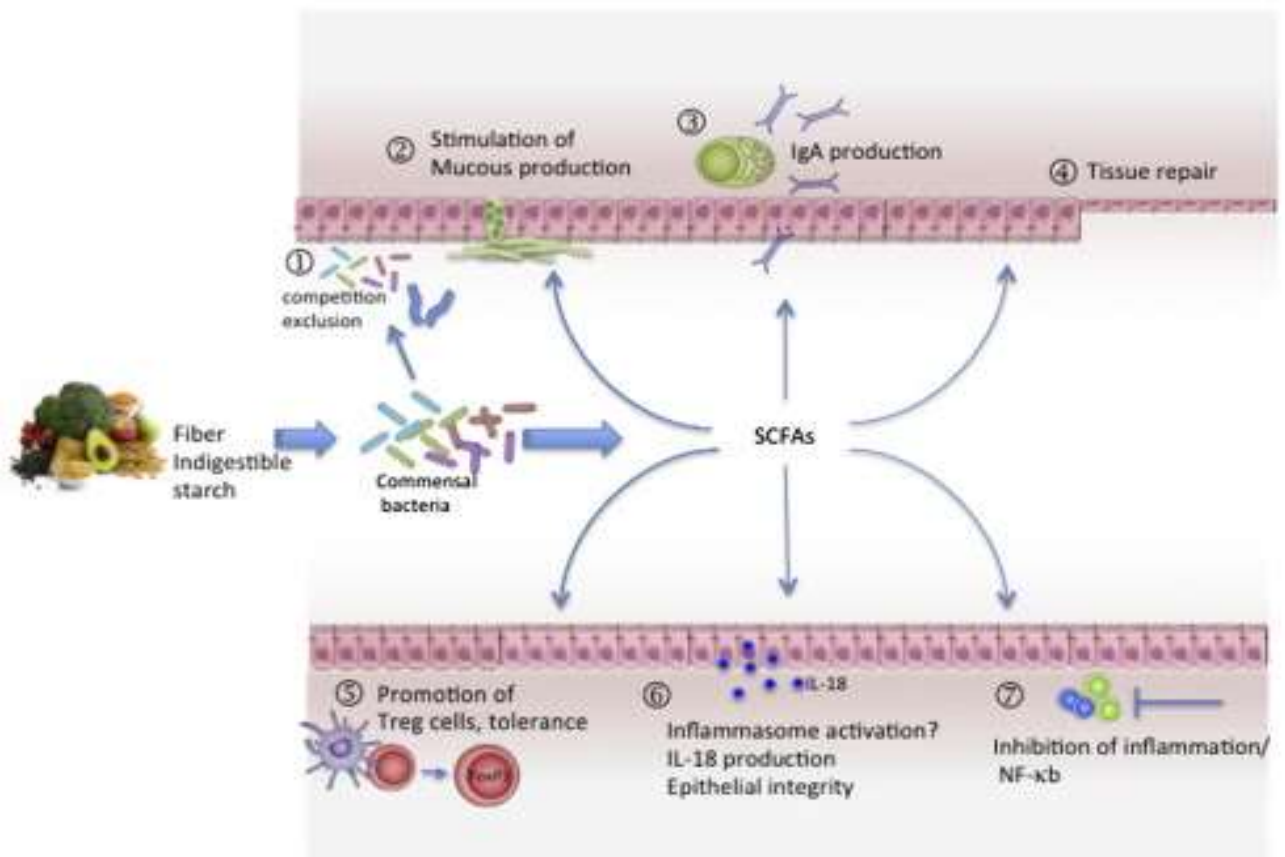


Figura 6. Dieta rica em fibra, SCFAs e alguns mecanismos associados a manutenção da homeostase intestinal. As principais ações dos SCFAs são: (1) "exclusão competitiva", pelo qual uma dieta rica em fibras estimula positivamente bactérias comensais e limita o crescimento de bactérias patogênicas no epitélio intestinal; (2) aumento da produção do muco por células epiteliais intestinais; (3) secreção de IgA por células B; (4) reparação de tecidos e cicatrização de feridas; (5) promoção e desenvolvimento de células Treg no intestino (6) manutenção da integridade epitelial; e (7) efeitos anti-inflamatórios, particularmente inibição de NF-κB. Fonte: Imagem original de THORBURN, A. N.; MACIA, L.; MACKAY, C. R. Diet, Metabolites, and "Western-Lifestyle" Inflammatory Diseases. *Immunity*, 2014.

Dentre os diversos efeitos dos SCFAs nos sistemas orgânicos, os mais estudados são seus efeitos na resposta inflamatória. Na literatura, há uma série de trabalhos que demonstram que os efeitos dos SCFAs podem ser atribuídos, em parte, a sua capacidade de se ligar a receptores como o Receptor 43 acoplado à proteína G (GPR43), que são expressos em uma gama de diferentes tipos celulares como células epiteliais e células inflamatórias (THORBURN; MACIA; MACKAY, 2014; VIEIRA, ANGELICA T. *et al.*, 2015).

MASLOWSKI *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento com acetato, por exemplo, reduz a resposta inflamatória em modelos experimentais de colite, asma e artrite e que esse efeito é dependente da ativação do receptor GPR43 em leucócitos inflamatórios, sugerindo, portanto, que a produção de acetato e, possivelmente, de outros SCFAs no colón, e sua distribuição para os tecidos periféricos é um importante modulador da resposta inflamatória. MACIA *et al.* (2015) demonstraram que a dieta rica em fibras solúveis altera a ecologia microbiana do intestino para produzir um microbioma altamente eficiente na ativação da via inflamasoma epitelial e na estimulação da produção de IL-18. Assim, a fibra dietética, a microbiota intestinal e as vias de sinalização associadas a ativação do receptor GPR43 se combinam para promover o reparo e homeostase intestinal.

É possível especular, portanto, que as intervenções baseadas na suplementação da dieta com fibras solúveis, poderiam ser uma alternativa promissora para a modulação de processos de reparo de feridas, em especial, em feridas cutâneas, uma vez que a inflamação tem um papel importante na regulação do processo. Entretanto, até o momento não há estudos que relacionem os efeitos de uma dieta rica em fibras com a cicatrização e/ou reparo tecidual.

Diante do exposto, levantou-se os seguintes apontamentos, que nos levaram as construções da hipótese deste estudo:

- a) Visto que a microbiota possui um importante papel na regulação da homeostase de diferentes órgãos, incluindo a pele;
- b) Que produtos derivados da fermentação de fibras pela microbiota intestinal, como por exemplo os SCFAs, possuem um importante papel na regulação de respostas inflamatórias sistêmicas através da ativação de

receptores GPR43 presentes em diferentes tipos celulares como, por exemplo, células epiteliais, endoteliais e leucócitos, células estas envolvidas na resposta cicatricial;

- c) Que a inflamação é um importante componente da resposta cicatricial e que a citocina pró-inflamatória IL-18 está envolvida no reparo intestinal induzido pela dieta rica em fibra, bem como na regulação da microbiota e na resposta tecidual à lesão;
- d) E, finalmente, que a microbiota comensal parece interferir na cicatrização de feridas cutâneas, é concebível que dentre as funções fisiológicas da microbiota intestinal possa estar incluída a modulação da resposta cicatricial cutânea por moléculas produzidas por essa microbiota durante a fermentação de fibras dietárias solúveis e liberadas sistemicamente na circulação sanguínea.

A nossa hipótese é, portanto, que os SCFAs produzidos pela microbiota intestinal a partir da fermentação de fibras solúveis atuem via GPR43 e IL-18 modulando o processo cicatricial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da suplementação alimentar com uma dieta enriquecida com fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos, bem como avaliar possíveis mecanismos envolvidos neste processo.

3.2 – Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos da dieta enriquecida com fibras solúveis na cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos selvagem (C57BL/6) e camundongos com deleção gênica para o receptor 43 acoplado a proteína G (GPR43^{-/-});

- II. Avaliar o papel da citocina IL-18 na cicatrização de feridas cutâneas excisionais e na formação do tecido de granulação induzido pela implantação de matriz sintética em camundongos selvagem (C57BL/6) e com deleção gênica para a citocina IL-18 (IL18^{-/-});

- III. Avaliar o papel da citocina IL-18 na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos C57BL/6 e camundongos IL18^{-/-} suplementados com dieta enriquecida com fibras solúveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Dieta

As dietas foram preparadas a partir dos padrões mínimos estabelecidos para os estudos nutricionais com animais de laboratório (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e conforme composição descrita por VIEIRA *et al.* (2017). A dieta rica em goma-guar utilizada no estudo foi pré-fabrica pela empresa Specialty Feeds, Glenn Forest[®], Austrália. Diferente da dieta rica em pectina, que foi preparada no próprio laboratório, a partir de ingredientes comprados na empresa Rhoster[®]. Os componentes das dietas estão relacionados na Tabela 1. A consistência e aparência das dietas é similar a dieta padrão comercializada para camundongos.

Tabela 1. Composição das dietas com alto teor em fibras (HF) (10% de pectina e goma de guar, a partir da modificação da dieta AIN93M) e dieta com baixo teor em fibras (LF).

Ingredientes	Dieta rica em fibra à base de goma guar (kg)	Dieta rica em fibra à base de pectina (Kg)	Dieta com baixo teor de fibras (LF)
BHT	0.008 g	0.008 g	0.008 g
Bitartarato de colina	2.5 g	2.5 g	2.5 g
Cistina (metionina)	1.8 g	1.8 g	1.8 g
AIN93 Vitaminas	10.0 g	10.0 g	10.0 g
AIN93 Minerais essenciais	35.0 g	35.0 g	35.0 g
Celulose	50.0 g	50.0 g	50.0 g
Óleo de soja	40.0 g	40.0 g	40.0 g
Sacarose	100.0 g	100.0 g	100.0 g
Maltodextrina	55.0 g	55.0 g	155.0g
Caseína	140.0 g	140.0 g	140.0 g
Amido de milho	365.692 g	365.692 g	365.692 g
Fibra goma guar ou pectina	100.0 g	100.0 g	0.0g
H₂O	200 ml	200 ml	200ml

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos, C57BL/6 (wild-type), C57BL/6 com deleção gênica para o receptor GPR43 (GPR43^{-/-}) e C57BL/6 com deleção para a citocina IL-18 (IL18^{-/-}), machos, com aproximadamente 10 semanas de idade, pesando aproximadamente 25 gramas.

Os camundongos GPR43^{-/-} foram doados pelo Professor Dr. Charles Mackay (Monash University, Austrália) e cedidos pelo Professor Dr. Mauro Martins Teixeira, do Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia (UFMG). Os camundongos IL18^{-/-} foram cedidos pela Professora Dr^a Leda Quércia Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia (UFMG). Os animais WT foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biofísica e Fisiologia da UFMG. É importante destacar, que todos os animais derivados dos laboratórios citados acima seguem um rigoroso protocolo de vermifugação, antes da execução do procedimento cirúrgico, visando a reprodutibilidade dos experimentos.

Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas isoladas, sob condições controladas de temperatura (24^oC) e luminosidade controlada de 12 horas com acesso a alimentos e água *ad libitum*, seguindo todos os procedimentos padrões estabelecidos no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, aprovados pelos comitês de ética animal australiano (experimentos com goma guar) MARP/ 2012/050 e brasileiro (experimentos com pectina) CEUA/UFMG (Protocolo número 116/2014).

4.3 Modelo experimental de feridas cutâneas excisionais e mensuração da área da ferida

Conforme descrito por MOREIRA *et al.*(2015) quatro feridas cutâneas foram criadas através da excisão da pele na região dorsal dos camundongos utilizando um *punch* de biópsia circular de 5mm de diâmetro.

A mensuração da área das feridas foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital. Para o acompanhamento do fechamento da feridas, utilizou-se a seguinte formula para determinação da área: [(diâmetro maior/2)x(diâmetro

menor/2)xPi], onde Pi é aproximadamente 3,14. A fim de normatizar os dados, os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida, utilizando-se a seguinte formula: $[1-(\text{área da ferida})/(\text{área original da ferida})\times 100]$.



Figura 7. Modelo de feridas excisionais. Fonte: MOREIRA, C.; CASSINI-VIEIRA, P.; DA SILVA, M.; BARCELOS, L. da. Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. BIO-PROTOCOL, v. 5, n. 22, 2015. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e1661>>

4.4 Modelo de implante de esponja

Conforme descrito por ANDRADE e FERREIRA (2016), implantes de poliéter-poliuretano foram introduzidos no tecido subcutâneo para induzir a inflamação, angiogênese e fibrose. Antes da cirurgia para implantação, as esponjas de 8 mm de diâmetro e 5 de espessura mm foram mantidos em álcool 70% por 24 horas e fervidos em água destilada por 30 minutos.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com (cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg por via intraperitoneal) e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70%. Em seguida, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele do dorso, próximo da cauda do animal, e após delicada apartação do tecido subcutâneo, foi introduzido o disco de esponja na região cervical e a incisão dorsal foi suturada.

Após a cirurgia os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até completo restabelecimento de suas funções vitais, sendo mais tarde distribuídos em gaiolas individuais. Todos os procedimentos cirúrgicos, foi executado no Laboratório de Angiogênese e Células-Tronco.

4.5 Coleta dos tecidos para análise

A coleta de tecidos biológicos no modelo de feridas excisionais foi realizada conforme descrito por MOREIRA *et al.* (2015), os animais foram sacrificados com

uma overdose (cetamina 200 mg/kg e xilazina 20 mg/kg por via intraperitoneal) de anestésico, em seguida 4 amostras de pele do dorso dos camundongos (região da ferida) foram coletadas com auxílio de um *punch* cirúrgico de 8mm, nos 1º (1º dia após a cirurgia), 3º, 7º e 14º dias após o ferimento inicial. A coleta do fragmento cutâneo foi previamente padronizada para cada análise bioquímica ou histológica, proposta neste estudo, visando a reprodutibilidade dos experimentos. Imediatamente após a coleta as amostras biológicas utilizadas foram mergulhadas em nitrogênio líquido para congelamento imediato ou em formalina 10%, para as análises histológicas.

No modelo de implante de esponja, no 7º dia após implantação os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de anestésico (cetamina 200 mg/kg e xilazina 20 mg/kg por via intraperitoneal). Após a eutanásia, as esponjas foram coletadas através de incisão mediana na região dorsal, em seguida, dissecados, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

4.6 Grupos experimentais

4.6.1 Desenho experimental 1 – HF (goma guar/pectina) x LF (baixo teor de fibras)

Camundongos C57BL/6 (WT) ou GPR43^{-/-} receberam a dieta rica HF ou LF 14 dias antes da indução do ferimento, que foi mantida durante todo o período experimental. Diferentes grupos de animais foram sacrificados nos tempos 1, 3,7 e 14 dias após o ferimento inicial, sendo 8 animais por grupo, em cada tempo experimental estudado, utilizando um total de 128 animais.

Tabela 2 – Grupos experimentais desenho experimental 1

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
WT alimentado com dieta rica em fibra (goma guar)	C57BL/6	WT-HF	8
WT alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	WT-LF	8
GPR43 ^{-/-} alimentado com dieta com alto teor em fibra (goma guar)	C57BL/6	GPR43 ^{-/-} -HF	8
GPR43 ^{-/-} alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	GPR43 ^{-/-} -LF	8
WT alimentado com dieta rica em fibra (pectina)	C57BL/6	WT-HFP	8
WT alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	WT-LFP	8

GPR43 ^{-/-} alimentado com dieta com alto teor em fibra (pectina)	C57BL/6	GPR43 ^{-/-} -HFP	8
GPR43 ^{-/-} alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	GPR43 ^{-/-} -LFP	8

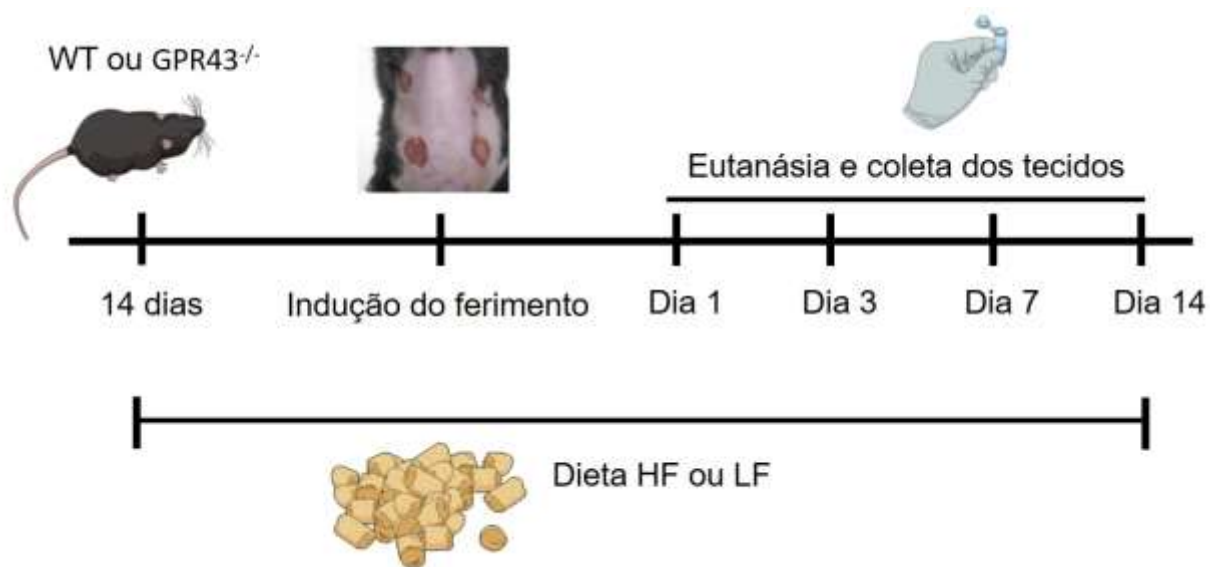


Figura 8. Desenho experimental 1. Fonte: Do autor.

4.6.2 Desenho experimental 2 – Camundongos WT e IL18^{-/-} submetidos a implantação de esponja e ferida excisional cutânea.

Camundongos WT ou IL18^{-/-} da linhagem C57BL/6 foram submetidos a implantação de esponjas no tecido subcutâneo ou a excisão de tecido cutâneo. As amostras teciduais foram coletadas no 1º, 3º, 7º e 14º dia após indução do ferimento ou as esponjas coletadas no 7º dia após implantação, sendo 8 animais por grupo, em cada tempo experimental estudado, utilizando um total de 160 animais.

Tabela 3 – Grupos experimentais do desenho experimental 2

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
WT submetido à ferida cutânea	C57BL/6	-	8
WT submetido à implantação de matriz sintética	C57BL/6	-	8
IL18 ^{-/-} submetido à ferida cutânea	C57BL/6	-	8
IL18 ^{-/-} submetido à implantação de matriz	C57BL/6	-	8

sintética			
-----------	--	--	--

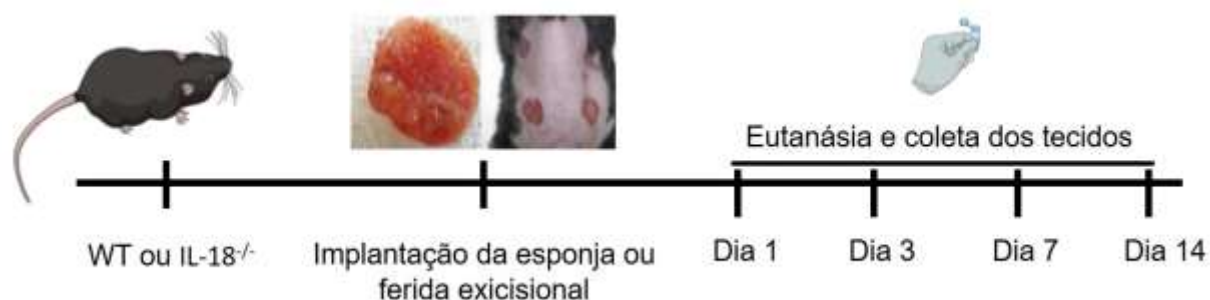


Figura 9. Desenho experimental 2.

4.6.3 Desenho experimental 3 – Tratamento com acetato intra-implante

Camundongos C57BL/6 foram submetidos a implantação de implantes de esponja no tecido subcutâneo e tratados com PBS ou acetato de sódio (Sigma Aldrich®) nas doses de 0,1µg, 1,0µg, 10µg e 100µg/mL em 100µL por gavagem. Essas doses foram baseadas a partir dos estudos de LIU *et al.*, 2016 e VIEIRA *et al.*, 2017. O tratamento iniciou imediatamente após a implantação da esponja até o 6º dia após implantação. No 7º dia os animais foram sacrificados e os implantes de esponja foram coletados.

Tabela 4 – Grupos experimentais do desenho experimental 3

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
C57BL/6 tratado intra-implante com PBS	C57BL/6	PBS	8
C57BL/6 tratado intra-implante com 0,1µg/mL	C57BL/6	0,1µg/mL	8
C57BL/6 tratado intra-implante com 1,0µg/mL	C57BL/6	1,0µg/mL	8
C57BL/6 tratado intra-implante com 10µg/mL	C57BL/6	10µg/mL	8
C57BL/6 tratado intra-implante com 100µg/mL	C57BL/6	100µg/mL	8

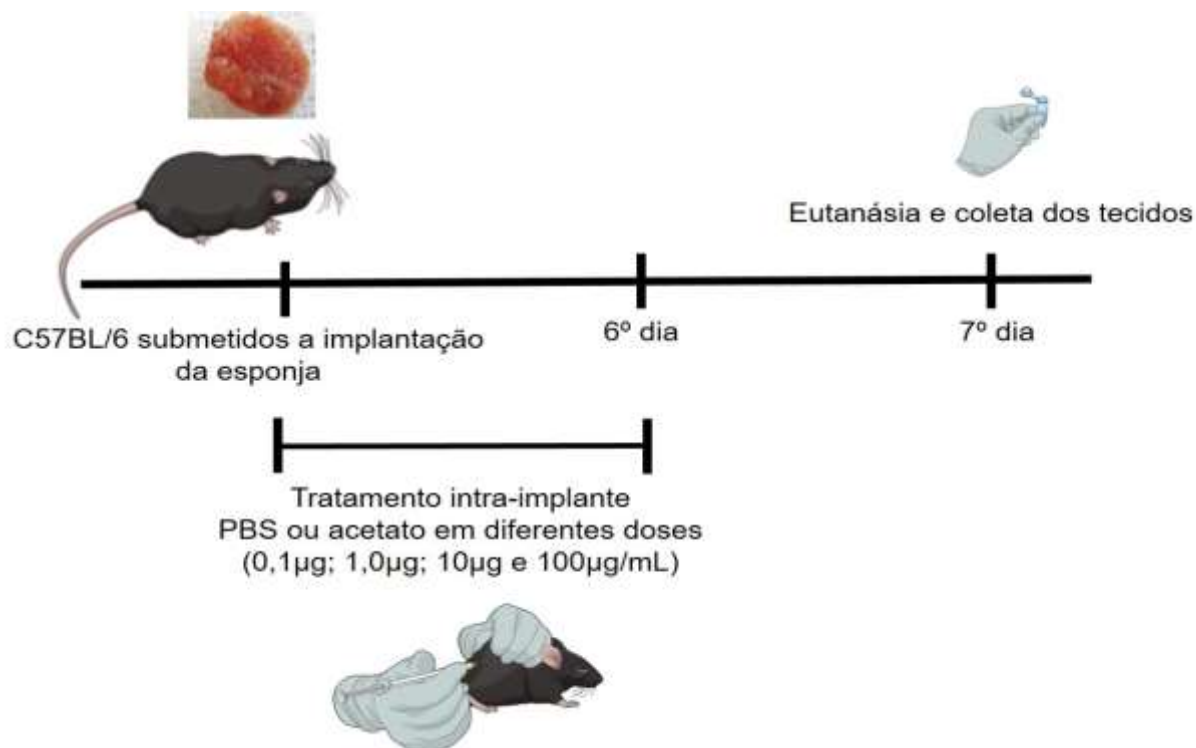


Figura 10. Desenho experimental 3.

4.6.4 Desenho experimental 4 – Tratamento com acetato por via oral

Conforme proposto por (VIEIRA *et al.*, 2017) camundongos C57BL/6 receberam por via oral através de gavagem, PBS ou acetato de sódio (Sigma Aldrich®) nas doses de 0,1µg, 1,0µg, 10µg e 100µg/mL, em 100µL por gavagem, que teve início 5 dias antes da implantação de esponjas até o 6º dia após implantação. Essas doses foram baseadas a partir dos estudos de LIU *et al.*, 2016 e VIEIRA *et al.*, 2017. No 7º dia os animais foram sacrificados e os implantes de esponja foram coletados.

Tabela 5 – Grupos experimentais do desenho experimental 4

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
C57BL/6 tratado oralmente com PBS	C57BL/6	PBS	8
C57BL/6 tratado oralmente com 0,1µg/mL	C57BL/6	0,1µg/mL	8
C57BL/6 tratado oralmente com 1,0µg/mL	C57BL/6	1,0µg/mL	8
C57BL/6 tratado oralmente com 10µg/mL	C57BL/6	10µg/mL	8
C57BL/6 tratado oralmente com 100µg/mL	C57BL/6	100µg/mL	8

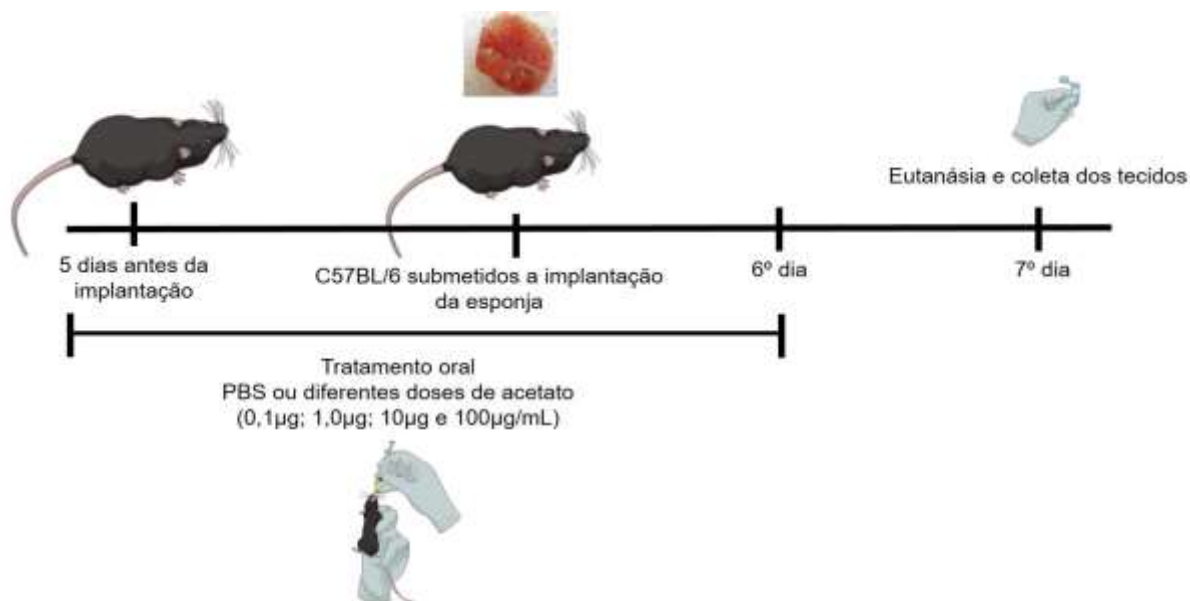


Figura 11. Desenho experimental 4.

4.6.4 Desenho experimental 5 – Camundongos $IL18^{-/-}$ tratados com dieta rica em fibra e submetidos ferida cutânea excisional.

Camundongos C57BL/6 (WT) ou $IL18^{-/-}$ receberam a dieta HF (à base de pectina) ou LF, a partir de 14 dias antes da indução do ferimento, que foi mantida durante todo o período experimental. Diferentes grupos de animais foram sacrificados nos tempos 1, 3, 7 e 14 dias após o ferimento inicial.

Tabela 6 – Grupos experimentais desenho experimental 5

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
WT alimentado com dieta rica em fibra (goma guar)	C57BL/6	WT-HF	8
WT alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	WT-LF	8
$IL18^{-/-}$ alimentado com dieta com alto teor em fibra (goma guar)	C57BL/6	$IL18^{-/-}$ -HF	8
$IL18^{-/-}$ alimentado com dieta com baixo teor em fibra	C57BL/6	$IL18^{-/-}$ -LF	8

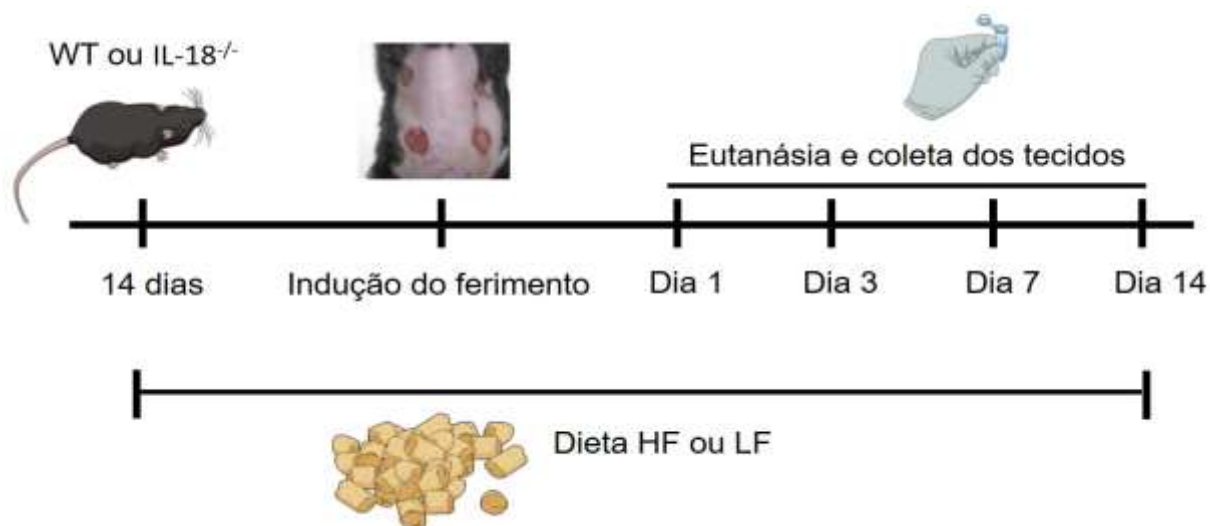


Figure 12. Desenho experimental 5.

4.6.5 Desenho experimental 6 – Quimera de camundongos WT e IL18^{-/-} tratados com dieta rica em fibra e submetidos ferida cutânea excisional.

Conforme descrito por Castor *et al.* (2012) e detalhado no item 4.14 adiante, foi realizado o transplante de medula óssea entre camundongos WT e IL18^{-/-}. Após um período de recuperação de 14 dias do tratamento com antibióticos, foi introduzida a dieta HF ou LF, que foi mantida até o final do experimento. A indução das feridas foi realizada 14 dias após a introdução das dietas e o acompanhamento da área da lesão realizado nos dias 3, 5, 7, 10 e 14. Os animais foram sacrificados no 14^o dia.

Tabela 7 – Grupos experimentais desenho experimental 6.

Grupo experimental	Linhagem	Abreviação	Quantidade de animais
Doador WT e receptor WT alimentado com dieta LF	C57BL/6	WT para WT LF	5
Doador WT e receptor WT alimentado com dieta HF	C57BL/6	WT para WT HF	5
Doador IL18 ^{-/-} e receptor WT alimentado com dieta HF	C57BL/6	IL18 ^{-/-} para WT HF	5
Doador WT e receptor IL18 ^{-/-} alimentado com dieta HF	C57BL/6	WT para IL18 ^{-/-}	5

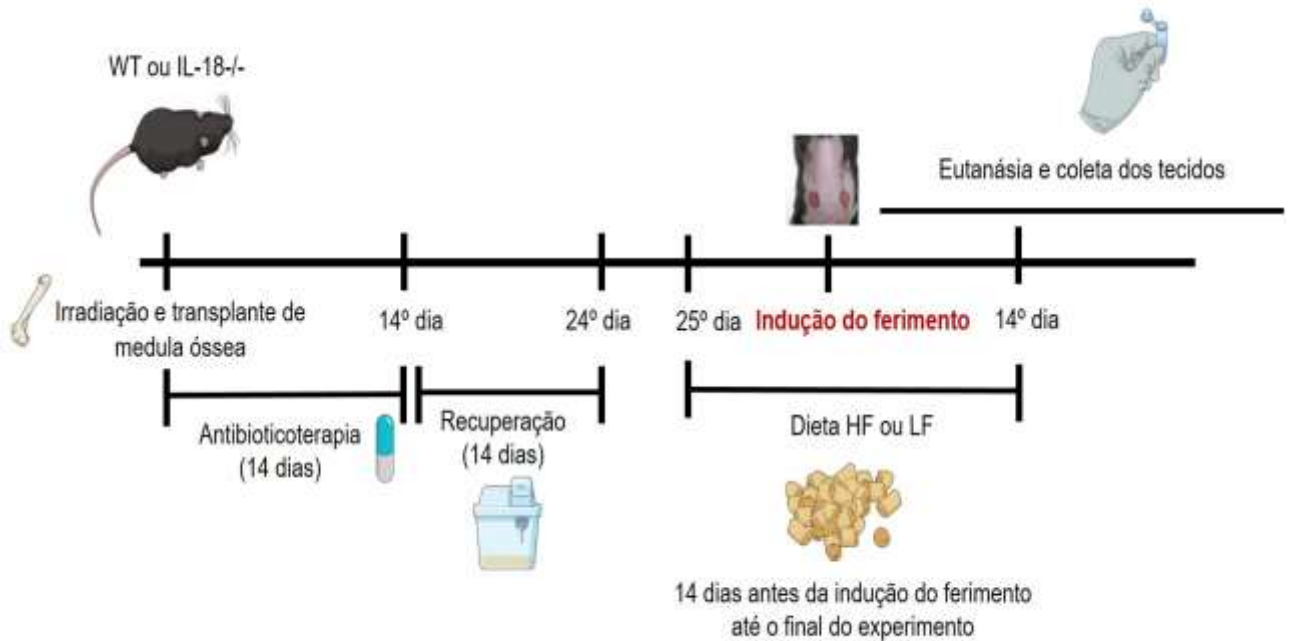


Figura 13. Desenho experimental 6.

4.7 Análise da produção de mediadores solúveis

Concentrações das quimiocinas: CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2 e CCL2/MCP-1 e citocinas: TNF, IL-10, IFN- γ , IL-4, IL-1 β e IL-18 foram mensuradas na ferida utilizando-se anticorpos adquiridos do fabricante R&D Systems (Minneapolis, USA) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para dosagem de citocinas, amostras de ferida foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato (PBS) (0,4 M NaCl e 10 mM de Na₂HPO₄) contendo inibidor de proteases (0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0,1 mM benzethoniumchloride, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fischer Scientific Pennsylvania, USA). As amostras foram mantidas a -20^o C para posterior realização do ensaio enzimático.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 384 poços. As placas foram sensibilizadas com 10 μ L/poço de solução dos respectivos anticorpos monoclonais anti-camundongo para quimiocinas/citocinas a serem analisadas e incubadas a 40C overnight. Após quatro lavagens (Bio-Tek Instruments, INC) com PBS-Tween 20 (0,05% - pH=7,4); adicionou-se às placas 30 μ L por poço de tampão

bloqueio (1% albumina bovina-BSA em PBS pH=7,4) e estas foram, então, incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora.

Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 10µL/poço dos padrões e das amostras diluídas (1:3) em BSA-PBS (0,1% - pH=7,4) e prossegue-se nova incubação a 40C overnight.

Após lavagem das placas, adicionou-se 10µL/poço de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas/quimiocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 15µL/poço de solução de estreptavidina (1µL de estreptavidina em 15mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 1 hora.

Após esse intervalo de tempo foi adicionado 15µL/poço o cromógeno OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) diluído em tampão citrato (pH=5,0) acrescido de H₂O₂ (30% v/v). As placas foram encubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse.

A reação foi interrompida com a adição de 15µL/poço de H₂SO₄ 1M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. Todos os passos de incubação (exceto overnight) foram feitos à temperatura ambiente.

4.8 Dosagem de hemoglobina nos implantes (avaliação indireta da neovascularização)

A dosagem do conteúdo de hemoglobina foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin. As amostras que apresentaram hemorragia ou infecção à análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada implante foi homogeneizado em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest) e as suspensões foram adicionados a microtubos (ependorff) de 2,0mL.

As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e os sobrenadantes filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços.

A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante remanescente foi armazenado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de citocinas. O precipitado foi pesado para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

4.9 Avaliação da atividade de MPO (neutrófilos)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nas feridas foi mensurada pelo ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos, conforme descrito previamente por CASSINI-VIEIRA *et al.* (2015).

As feridas e a pele do contorno foram removidas com o auxílio de um punch circular de 8mm, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocados a -20o C até o dia da homogeneização do tecido. Após o descongelamento do tecido, este foi pesado e homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl; 0,02 M Na₃PO₄; 0,015 M NaEDTA - pH 4,7) na proporção de 1 mL de tampão para cada 100 mg de tecido, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Após esse procedimento, o homogenato foi centrifugado a 10.000g/10 minutos a 4o C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% - 30s após). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão 2 (Na₃PO₄ 0,05 M; Hexadecyl trimethyl ammonium bromide – HTAB - Sigma 0,5% p/v - pH 5,4) na proporção de 1 mL para cada 100mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido.

Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g/15 minutos e foi recolhido o sobrenadante para a realização do ensaio. As amostras foram diluídas no tampão 2 na razão 1:6. A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando a reação entre tetramethylbenzidine diluído em dimetilsufóxido (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi parada com H₂SO₄ e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Statuslabsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa por OD.

4.10 Avaliação da atividade de NAG (macrófagos)

A quantificação do acúmulo de macrófagos nas feridas foi mensurada pelo ensaio de atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), presente nos macrófagos (CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2015). As feridas e a pele do contorno foram removidas com o auxílio de um punch circular de 8mm, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas a -20°C até o dia da homogeneização do tecido.

Após o descongelamento do tecido, este foi pesado e homogeneizado utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) com solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck) na proporção de 1,9 mL de solução para cada 100mg de tecido. Logo em seguida, a amostra foi centrifugada a 4°C 3.000g/10min. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio da NAG. A reação foi iniciada após a adição de 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -Dglicosaminidase (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH=4,5), concentração final de 2,24 mM, a 100 μ L da amostra (sobrenadante recolhido após centrifugação do tecido) diluída em tampão citrato/fosfato (1:10). A reação se processou a 37°C/10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 μ L de tampão glicina 0,2 M (pH=10,6) e quantificada em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa por OD.

4.11 Avaliação da deposição de colágeno

A deposição de colágeno foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total foi quantificada colorimetricamente baseada na reação do Picrosirius Red. Conforme descrita previamente por (CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2014).

Sucintamente, as amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100) depois da homogeneização, os debris foram removidos pela centrifugação. Foram adicionados 50 μ L do reagente picrosirius red em 50 μ L da amostra.

Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrosirius red foi separado por centrifugação a 10,000 durante 15 minutos,

em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1ml de reagente alcalino (NaOH 0,5 M).

A absorvância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação com uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados foram expressos em µg de colágeno por mg de implante.

4.12 Transplante de medula óssea

O transplante de medula óssea foi realizado conforme descrito anteriormente por CASTOR *et al.* (2012). Resumidamente, as células da medula óssea foram obtidas a partir da medula tibial e femoral de camundongos WT e IL18^{-/-} com PBS.

Aproximadamente um total de 1x10⁷ células de camundongos doadores WT ou IL18^{-/-} foram transplantadas através de infusão de veia ocular em camundongos WT ou IL18^{-/-} receptores, os quais tiveram seus corpos irradiados previamente com uma radiação de 8 Gy (fonte 60Co) em duas doses a intervalos de 2 h para minimizar a toxicidade gastrointestinal antes do transplante.

Após o transplante os camundongos receptores receberam antibiótico em suspensão oral de ciprofloxacina (70 mg / L) na sua água potável a partir de 1º dia até 14º dia após o transplante.

4.13 Análises histológicas

Na ocasião do sacrifício, as feridas foram clivadas ao meio em duas metades. Tanto as feridas cutâneas, quanto os implantes foram fixados em solução tamponada de formol a 10% em PBS por 48 horas.

Posteriormente, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina, em processador de tecidos automático (Lupetec® PT09 TS). Após estes procedimentos, os blocos foram cortados a 5µm e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) ou Picrosirius Red.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Olympus BX43) e as imagens coletadas usando uma câmera digital acoplada ao microscópio (Olympus Q-color 5®).

Conforme descrito anteriormente por LE *et al.* (2012), as análises morfométricas em cortes histológicos da ferida cutânea foram realizadas em fotomicrografias, utilizando o software de imagens ImageProPlus 7.0 Software®. Foi realizada a morfometria da língua epitelial, tecido de granulação e área cicatricial. A extensão da língua epitelial (distância do novo epitélio que se estende da margem da ferida, que é definida pela presença anexos cutâneos) avaliada em cortes histológicos de 3 dias, tecido de granulação (caracterizado como o novo tecido formado, rico em vasos sanguíneos e fibroblastos e células inflamatórias) avaliado em cortes histológicos de 7 dias, área cicatricial (área compreendida entre as bordas da ferida, caracterizado por ausência de células, vasos sanguíneos e anexos cutâneos), avaliado em cortes histológicos de 14 dias.

Conforme descrito anteriormente por GUPTA; KUMAR (2015), o escore qualitativo de células polimorfonucleares e mononucleares, foram avaliados em cortes histológicos de feridas cutâneas de 1 e 3 dias, corados com H&E. As pontuações foram dadas da seguinte forma: "+" = infiltração baixa, "++" = infiltração moderada e "+++" = infiltração alta.

A contagem dos vasos sanguíneos foi realizada tanto em cortes histológicos das feridas cutâneas, quanto nos implantes de esponja de 7 dias. Considerou-se como um vaso contável aquele definido como uma estrutura com um lúmen contendo ou não glóbulos vermelhos(CANESSO, MARIA C. C. *et al.*, 2014).

A análise de colágeno foi realizada tanto em cortes histológicos das feridas cutâneas, quanto nos implantes de esponja de 14 dias e 7 dias, respectivamente, e analisados utilizando um filtro de luz polarizada (Olympus). Todas as análises histomorfométricas foram realizadas de forma cega e por dois pesquisadores independentes.

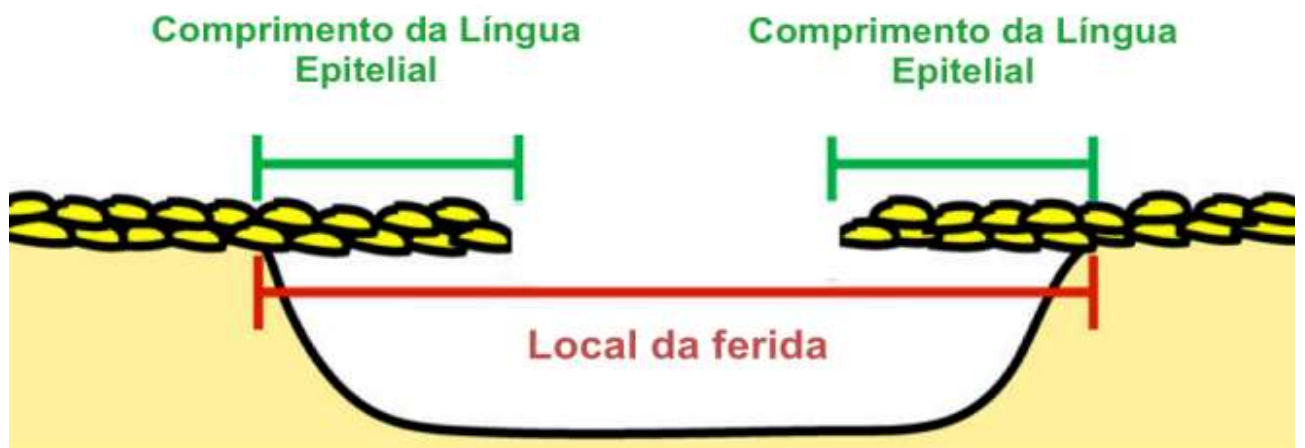


Figura 14. Esquema demonstrativo das principais estruturas analisadas por morfometria digital. Fonte: Imagem modificada de MORI, R.; SHAW, T. J.; MARTIN, P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 1, p. 43–51, 2008.

4.14 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5.3. Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student, dados não pareados, quando os dados consistiam de apenas dois grupos. Quando foram comparados três ou mais grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA indicou significância, os dados foram analisados utilizando o pós-teste de Newman Keuls para comparação entre os grupos.

Two-way ANOVA foi utilizado para análises dos gráficos de linha para verificar interações entre as variáveis independentes tempo e grupos, sendo utilizado o pós-teste de Bonferroni. Apenas os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados I

5.1.1 *Dieta rica em fibras induz o fechamento das feridas cutâneas, efeito dependente da presença do receptor GPR43.*

Para investigar se o fechamento da ferida cutânea era alterado em camundongos alimentados com uma dieta rica em fibra e se esses efeitos eram dependentes do receptor Gpr-43, camundongos WT e Gpr43^{-/-} foram alimentados com uma dieta rica em fibra (HF) ou com baixo teor em fibras solúveis (LF) e avaliou-se o fechamento da ferida através da mensuração da área da ferida no 3^o, 7^o e 14^o dia após a lesão inicial e através da análise morfométrica da língua epitelial em cortes histológicos corados com H&E no 3^o dia após a lesão inicial.

As feridas dos animais do grupo WT-HF, apresentaram um aumento na taxa de fechamento da ferida no 3^o ($p < 0,05$) e 7^o ($p < 0,001$) dia, quando comparado as feridas dos animais do grupo WT-LF ou Gpr43^{-/-}-HF (figura 15 a e b).

A análise morfométrica da língua epitelial revelou uma língua epitelial maior em feridas do grupo WT-HF quando comparadas com as feridas de animais do grupo WT-LF e Gpr43^{-/-}-HF ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, figura 15 c e d).

Resultados semelhante também foram observados em animais alimentados com uma dieta suplementada com a fibra pectina, na qual os animais do grupo WT-HFP apresentaram um aumento na taxa de fechamento das feridas, quando comparadas as feridas de animais do grupo WT-LFP e Gpr43^{-/-}-HFP (figura 16).

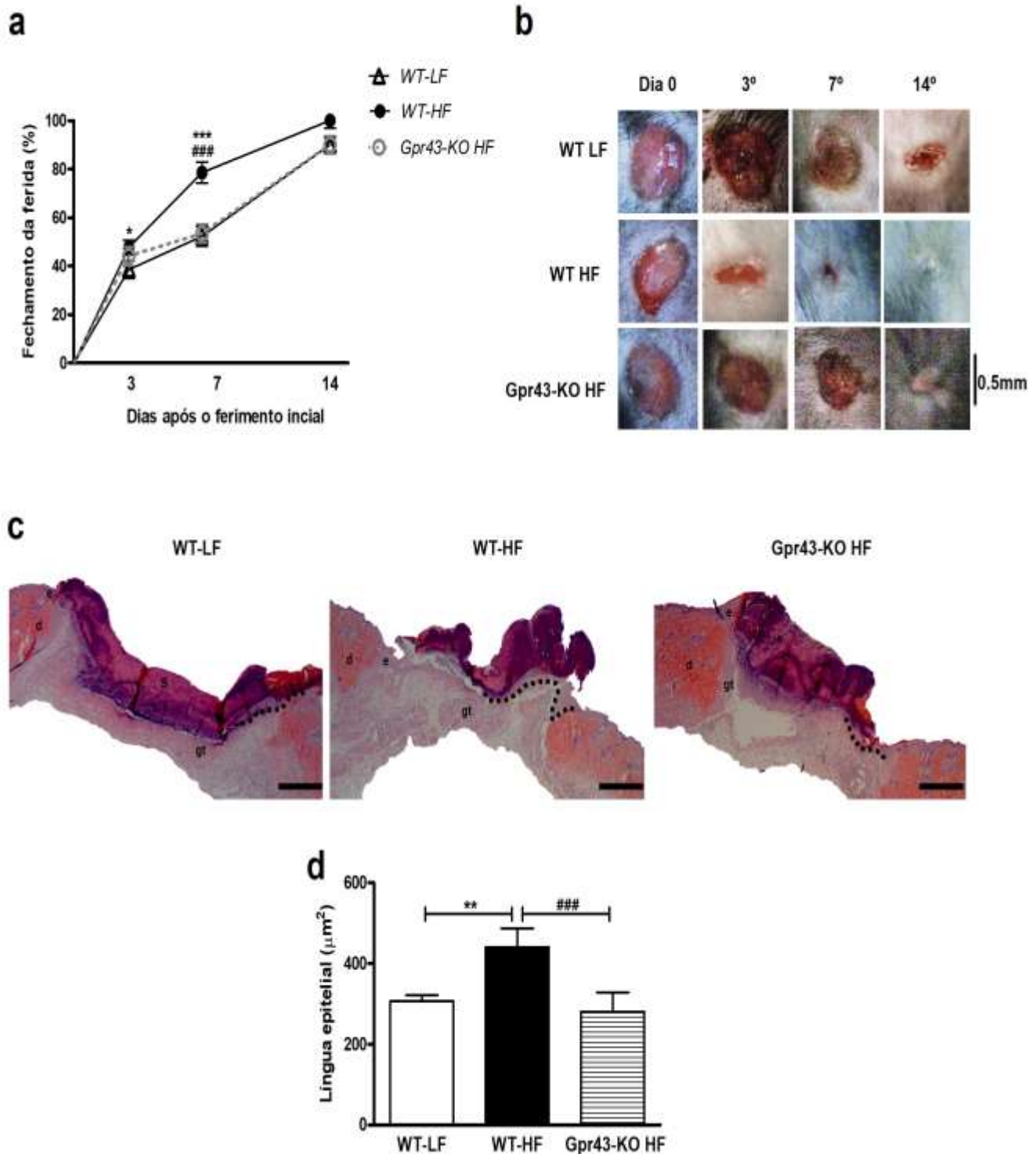


Figura 15. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o fechamento de feridas cutâneas (goma guar). (a) Cinética de fechamento das feridas cutâneas no 3º, 7º e 14º dia após a confecção do ferimento inicial. (B) Fotografias representativas das feridas. (C) Fotomicrografias de cortes histológicos da ferida corados com H&E no 3º dia após a confecção inicial do ferimento, nesta imagem, a linha pontilhada destaca a língua epitelial. (d) Avaliação do comprimento da língua epitelial. As letras nas fotomicrografias representam: d, derme; gt, tecido de granulação; s, crosta. Ampliação original de 200 x; barra de escala: 100µm. Os dados representam a média ± E.P.M, n = 8 animais por grupo (Two-way ANOVA e ANOVA).

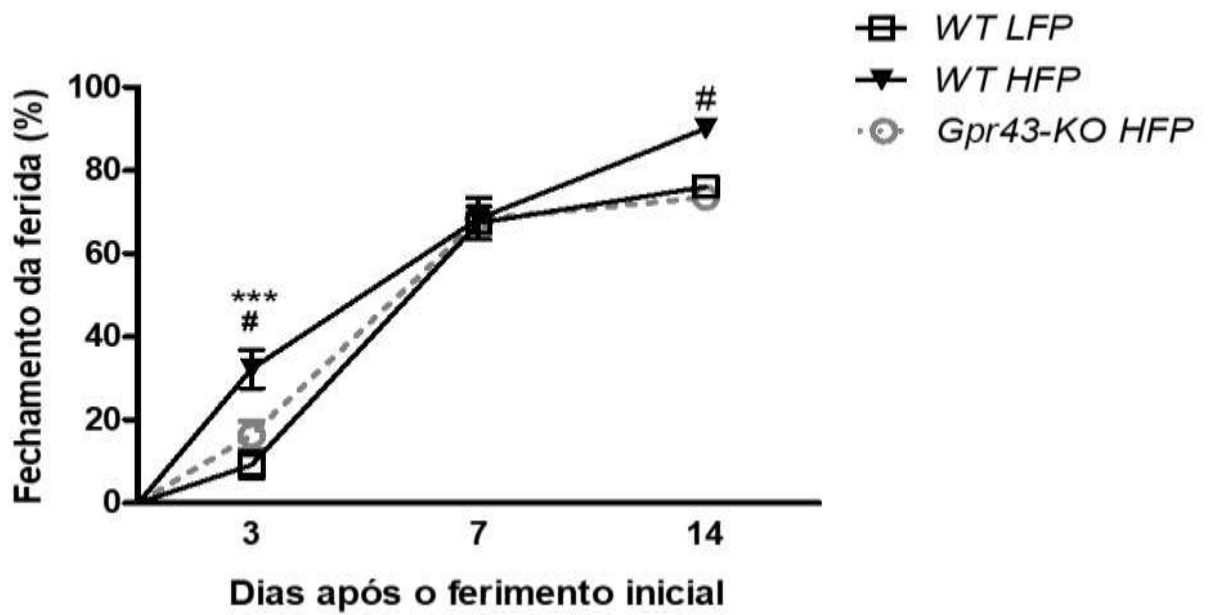


Figura 16. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o fechamento de feridas cutâneas (pectina). (A) Cinética de fechamento das feridas cutâneas no 3^o, 7^o e 14^o dia após a confecção inicial da ferida. Os dados representam a média \pm E.P.M, n = 8 animais por grupo (Two-way ANOVA e ANOVA).

5.1.2 Dieta rica em fibras altera a resposta inflamatória na ferida, efeito dependente do receptor GPR43.

Avaliou-se o conteúdo inflamatório da ferida através dos seguintes parâmetros: análise qualitativa de cortes histológicos corados com H&E no 3º e 7º dia após o ferimento inicial, análise indireta do conteúdo de neutrófilos e macrófagos nas feridas, através dos ensaios enzimáticos de MPO e NAG, respectivamente e através da mensuração da concentração na ferida das citocinas de TNF, IL-4, CXCL-1, CXCL2, CCL-2, IL10, IL-1 β e IL-18.

Na avaliação qualitativa de cortes histológicos das feridas do 3º dia, observou-se que os animais do grupo WT-HF apresentaram um infiltrado polimorfonuclear discreto, quando comparado às feridas de animais dos grupos WT-LF ou Gpr43^{-/-}-HF. Por outro lado, observou-se um infiltrado de células mononucleares moderado tanto em cortes histológicos das feridas no 3º dia, quanto do 7º dia em animais do grupo WT-HF (tabela 8 e figura 17a).

Resultados semelhantes foram observados em feridas de animais alimentados com uma dieta rica em fibra do tipo pectina, observou-se uma redução da atividade enzimática de MPO no 3º dia ($p < 0,01$) e um aumento da atividade de NAG ($p < 0,001$), quando comparado às feridas de animais dos grupos WT-LFP ou Gpr43^{-/-}-HFP (Tabela 8, figura 18a e b).

A concentração das citocinas TNF, IL-4, CXCL-1, IL-10, IL-1 β e IL-18 nas feridas do grupo WT-HF apresentaram-se aumentadas, quando comparadas as feridas do grupo WT-LF ou Gpr43^{-/-}-HF (figura 19, a, b, d, f, g, h). No entanto, a concentração das citocinas CXCL-2 e CCL-2 apresentaram-se reduzidas nas feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparado às feridas dos animais do grupo WT-LF ou Gpr43^{-/-}-HF (figura 19 c e e).

Tabela 8 – Análise qualitativa do infiltrado leucocitário na ferida

Grupo	Celularidade	Mononuclear	Polimorfonuclear
WT-LF 3d	+++	+	+++
WT-HF 3d	+	++	+
Gpr43-KO HF 3d	+++	+	+++
WT-LF 7d	++	+	+
WT-HF 7d	++	++	+
Gpr43-KO HF 7d	++	++	+

Legenda: + discreta, ++ moderado, +++ intensa

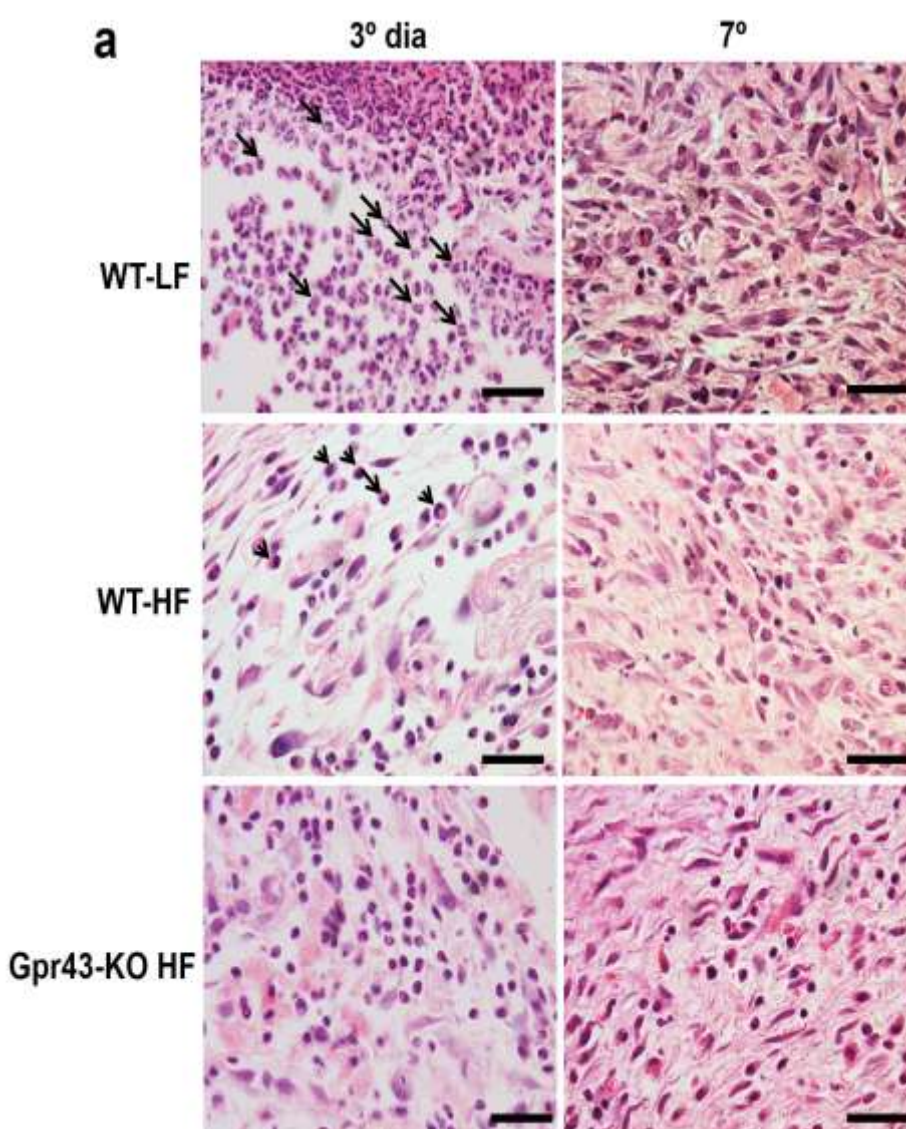


Figura 17. Efeitos da dieta rica em fibras sobre a infiltração leucocitária na ferida (goma guar). Avaliação qualitativa da infiltração leucocitária em cortes histológicos de feridas coradas com H&E no 3º e 7º após o ferimento inicial (Tabela 8). (A) Fotomicrografias representativas da infiltração leucocitária na ferida. As setas pretas nas fotomicrografias indicam a presença de células polimorfonucleares e as cabeças de setas indicam células mononucleares. Ampliação original de 1000 x. Bar 50µm.

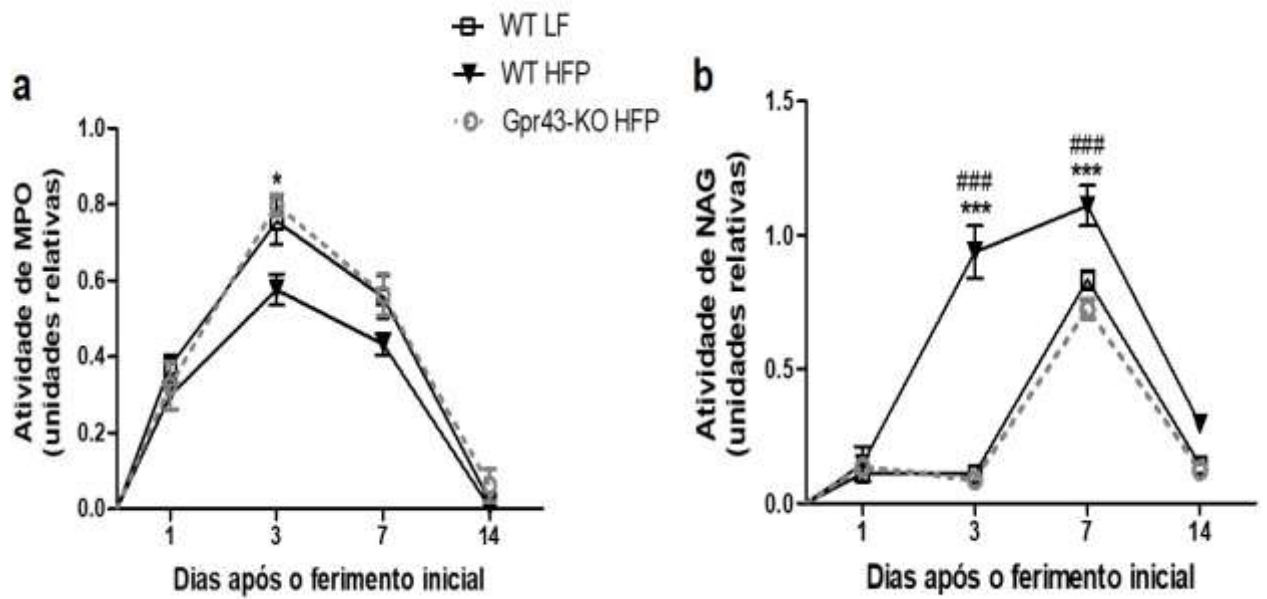


Figura 18. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o infiltrado de leucócitos (pectina). (a) Acúmulo de neutrófilos e (b) Acúmulo de macrófagos nas feridas, avaliados por meio do ensaio enzimático de MPO e NAG, respectivamente. Os dados representam a média \pm E.P.M., $n=8$ para cada ponto da cinética e grupo experimental. #* $p < 0,05$; ***### $p < 0,001$ versus WT-HF (2-way ANOVA).

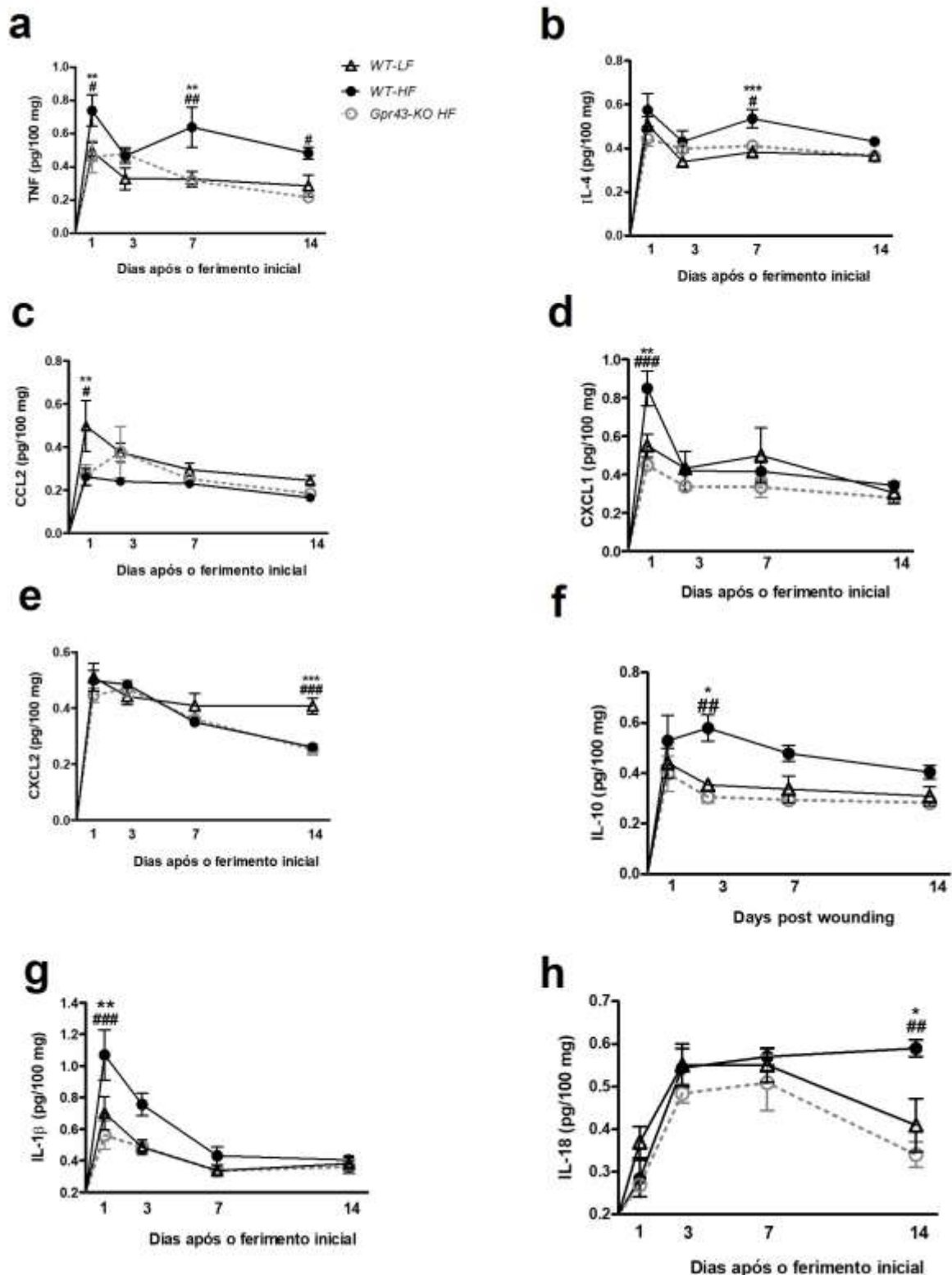


Figura 19. Efeitos da dieta rica em fibras sobre a concentração de citocinas e quimiocinas em feridas cutâneas (goma guar). (A) TNF, (B) IL-4, (C) CCL-2, (D) CXCL-1, (E) CXCL-2, (F) IL-10, (G) IL-1 β , (H) IL-18. Os níveis de citocinas foram avaliados através do ensaio “ELISA *sandwich*”. Os dados representam a média \pm E.P.M., n=8 animais para cada grupo e ponto da cinética. # * p <0,05; ** ## p <0,01; *** ### p <0,001 *versus* WT-HF (2-way ANOVA).

5.1.3 Dieta rica em fibras estimula a neovascularização da ferida, efeito dependente do receptor GPR43.

O tecido de granulação é rico em células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos. A formação deste tecido é essencial para o fechamento da ferida. Para verificar se a dieta rica em fibra é capaz de alterar a formação do tecido de granulação, mensurou-se a área do tecido de granulação através de análise morfométrica e a neovascularização por meio da contagem de vasos sanguíneos, ambas as avaliações realizadas em cortes histológicos de feridas coradas com H&E no 7º dia após o ferimento inicial.

Observou-se uma redução da área de tecido de granulação em feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparada as feridas dos animais do grupo WT-LF ($p < 0,001$) e Gpr43 KO-HF ($p < 0,01$, figura 20a e c).

Por outro lado, observou-se um aumento significativo do número de vasos sanguíneos nas feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparado às feridas de animais dos grupos WT-LF ($p < 0,01$) e Gpr43 KO-HF ($p < 0,01$) (figura 20b e d). Efeitos semelhantes foram observados em animais alimentados com a dieta à base de pectina.

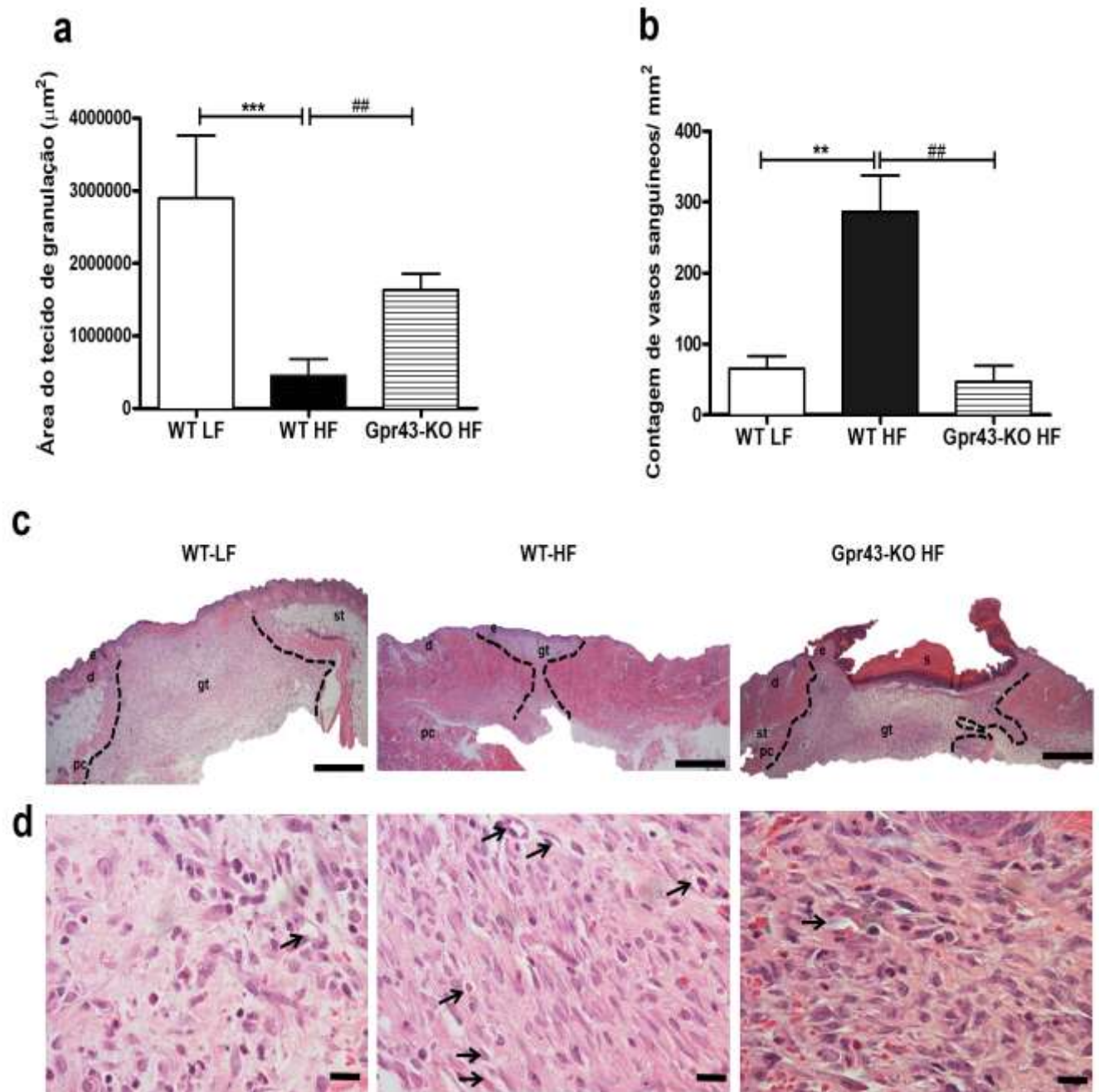


Figura 20. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o tecido de granulação e a neovascularização em feridas cutâneas (goma-guar). (A) Área do tecido de granulação. (B) Número de vasos sanguíneos. C-D Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados com H&E de feridas no 7º dia após a confecção do ferimento inicial. As letras pequenas nas fotomicrografias representam: d, derme; f, gt, tecido de granulação; s, crosta e as setas pretas evidenciam os vasos sanguíneos. Os dados representam a média ± E.P.M., n=8 animais para cada grupo e ponto da cinética. ** ## p <0,01; *** ### p <0,001 versus WT-HF (ANOVA). Bar 50µm.

5.1.4 Dieta rica em fibra atenua a deposição de colágeno e a formação de cicatriz, efeito dependente do receptor GPR43.

O desfecho do reparo tecidual no adulto é a cicatriz, a qual é caracterizada, principalmente, por aumento da deposição de colágeno, especialmente, de colágeno do tipo I (maduro) na região da lesão. Além disso, o tamanho da cicatriz por vezes é correlacionado com a qualidade do fechamento da ferida (quanto maior a cicatriz, menor a qualidade do fechamento). Para avaliar se a dieta rica em fibra é capaz de alterar o tamanho da cicatriz, avaliou-se a área do tecido cicatricial por meio de análise morfométrica em cortes histológicos de tecidos corados com H&E. Além disso, também foi avaliada a deposição total e diferencial de colágeno por meio de quantificação automatizada utilizando o software de imagens ImageProPlus® em cortes histológicos corados com Picrosirius-Red, avaliados sob um filtro de luz polarizada. Ambas as avaliações, foram realizadas em cortes histológicos da pele no 14º dia após a confecção do ferimento inicial.

A área cicatricial apresentou-se reduzida em feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparado às feridas de animais dos grupos WT-LF ou Gpr43 KO-HF.

A deposição total de colágeno nas feridas apresentou-se reduzida em feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparado às feridas de animais dos grupos WT-LF ou Gpr43 KO-HF.

Na análise do colágeno diferencial, observou-se que as feridas de animais do grupo WT-HF apresentaram uma redução na deposição de colágeno tipo I (feixes de fibras apresentados na cor laranja-vermelho), quando comparado as feridas de animais dos grupos WT-LF e Gpr43 KO-HF (figura 21 10b). Por outro lado, as fibras de colágeno do tipo III (feixes de fibras apresentados na cor verdes) apresentam-se aumentadas em feridas de animais do grupo WT-HF, quando comparado as feridas do grupo WT-LF e Gpr43 KO-HF (figura 21e). Resultados semelhantes foram observados usando uma dieta baseada na fibra pectina (Figura 22).

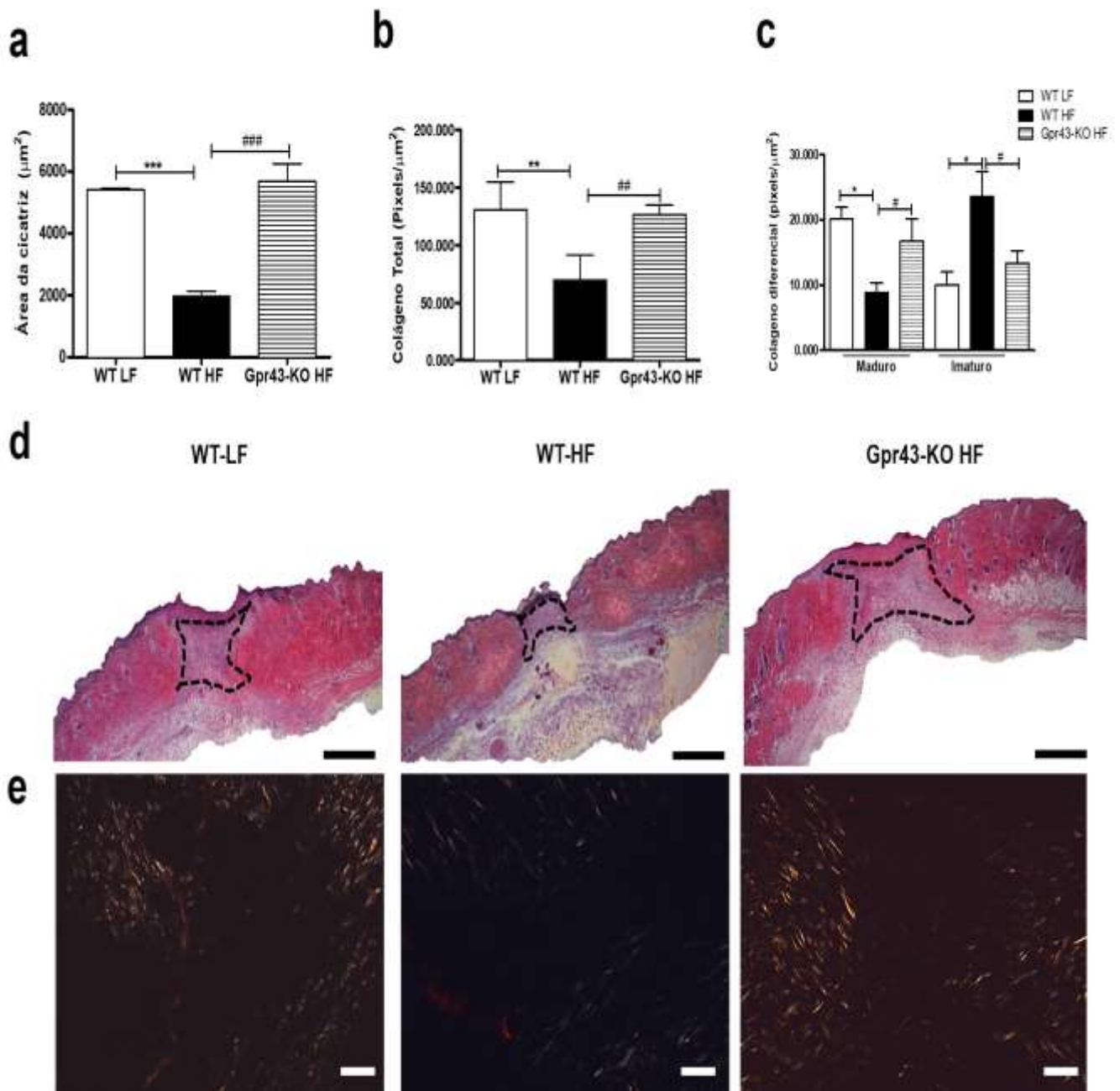


Figura 21. Efeitos da dieta rica em fibra na deposição de colágeno e área cicatricial (goma guar). (A) Análise morfométrica da área do tecido cicatricial. (B) colágeno total por seções coradas de Picrosirius Red. (C) Análise diferencial de colágeno. (D) Fotomicrografias representativas coradas em H&E no 14^o dia após o ferimento, na área pontilhada está evidenciando o tecido cicatricial. (E) Fotomicrografias representativas do tecido cicatricial corado com Picrosirius Red e observados sob luz polarizada. Os dados morfométricos foram obtidos por análise duplo-cego usando o software ImageProPlus 7.0. Os dados representam a média ± E.P.M n = 8 animais para cada ponto de tempo e grupo. ** ## p <0,01; *** ### p <0,001 versus WT-HF (ANOVA). Bar 50µm.

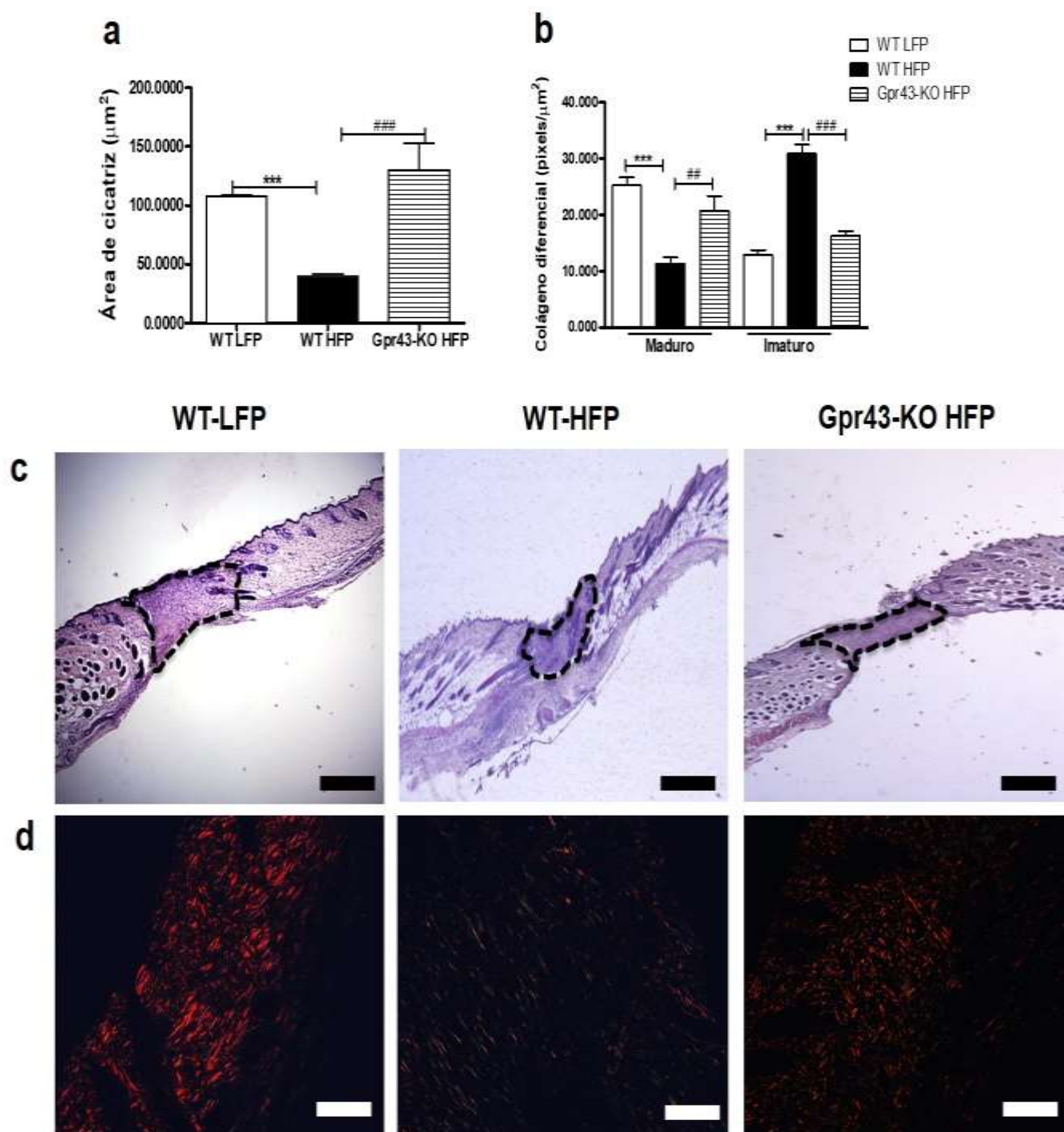


Figura 22: Efeitos da dieta com rica em fibra na deposição de colágeno e na área cicatricial (pectina). (A) Área cicatricial em cortes histológicos de tecido no 14º dia após o ferimento inicial. (B) Análise diferencial de colágeno. (C) Fotomicrografias representativas de cortes corados com H&E. (D) Fotomicrografias representativas de cortes corados com Picrosirius Red, na avaliação dos cortes foram examinados colágeno tipo I e colágeno tipo III. Os dados morfométricos foram obtidos por análise duplo-cego usando o software ImageProPlus 7.0. Os dados representam a média ± E.P.M.; n = 8 para cada grupo. * # p <0,05; ** ## p <0,01; *** ### p <0,001 (ANOVA) versus WT-HFP.

5.1.5 Tratamento local com acetato não é capaz de modular os componentes do tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja

Parte dos efeitos da dieta rica em fibras solúveis se deve à fermentação das fibras no intestino e, conseqüentemente, à produção de SCFAs pela microbiota intestinal. O acetato é o mais abundante desses SCFAs induzidos pela fermentação de fibras. Para verificar se a administração de acetato local poderia afetar a formação do tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja, os animais receberam PBS ou diferentes doses de acetato (0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL; 10 µg/mL e 100 µg/mL) intra-implante e avaliou-se a neovascularização através do conteúdo de hemoglobina nos implantes, o acúmulo de neutrófilos e macrófagos, através da atividade de MPO e NAG, respectivamente e o conteúdo de colágeno através da dosagem de colágeno solúvel. Como pode ser observado na figura 23 a-d, o tratamento local com acetato não foi capaz de induzir nenhuma alteração nos parâmetros avaliados.

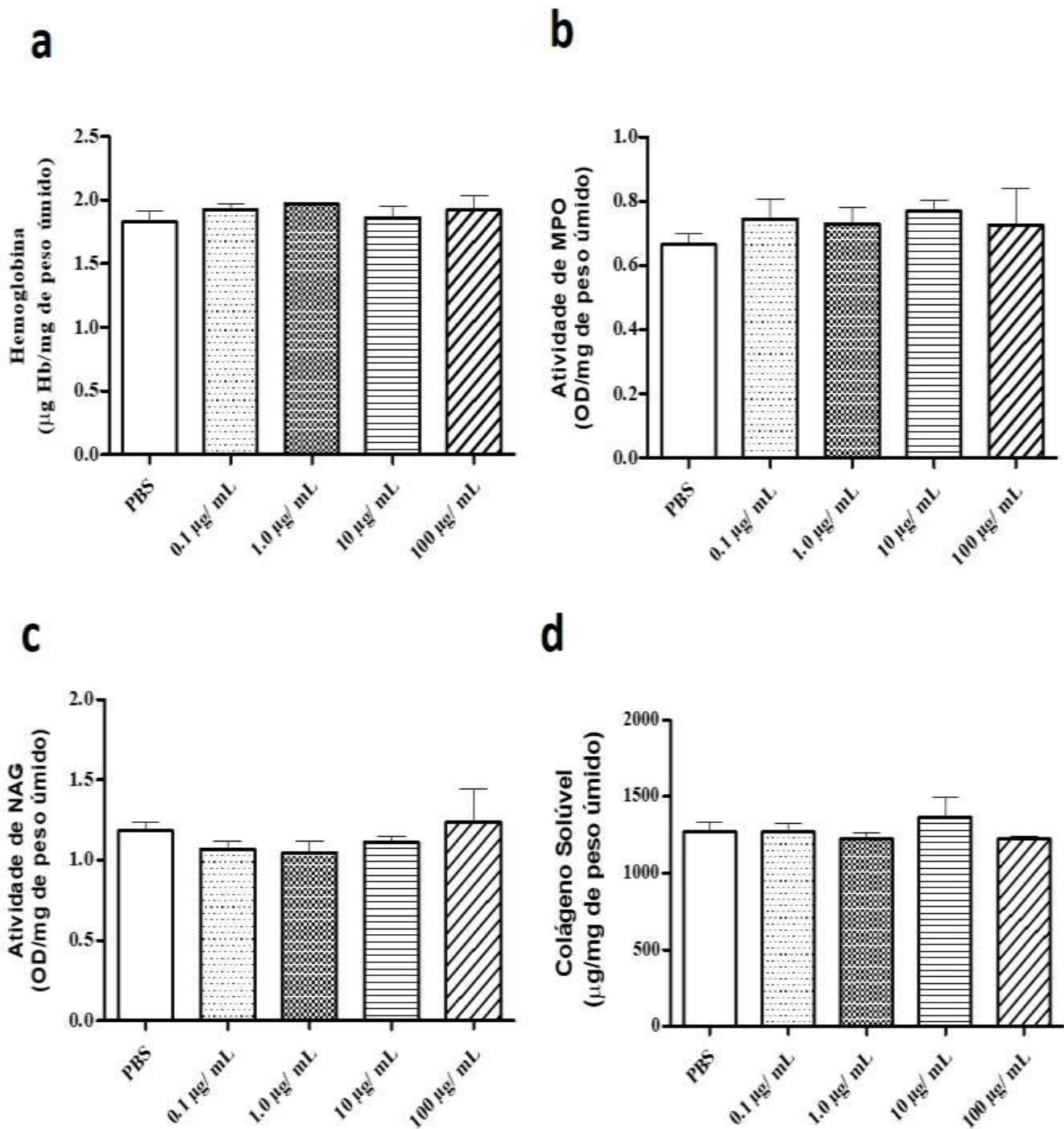


Figura 23: Efeitos do acetato administrado localmente intrainplante. (A) Hemoglobina. (B) Atividade de MPO (C) Atividade de NAG. Os dados representam a média \pm E.P.M; n=8 para cada grupo experimental (ANOVA).

5.1.6 Tratamento oral com acetato alterou os componentes do tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja

Diferente do tratamento local, o tratamento oral com acetato foi capaz de modular inúmeros componentes do tecido fibrovascular. Como pode ser observado na figura 13a, os implantes de animais tratados com acetato por via oral nas doses de 1.0µg e 10µg apresentaram um aumento do conteúdo intra-implante de hemoglobina (1.0µg, $p<0,001$ e 10µg, $p<0,05$), quando comparados à implantes de animais tratados com PBS.

Os implantes de animais tratados com a dose de 1.0µg apresentaram uma redução no acúmulo de neutrófilos ($p<0,01$, figura 24b), um aumento no acúmulo de macrófagos ($p<0,05$, figura 24c) e uma redução na concentração de colágeno solúvel ($p<0.001$, figura 24d), quando comparado à implantes de animais tratados com PBS.

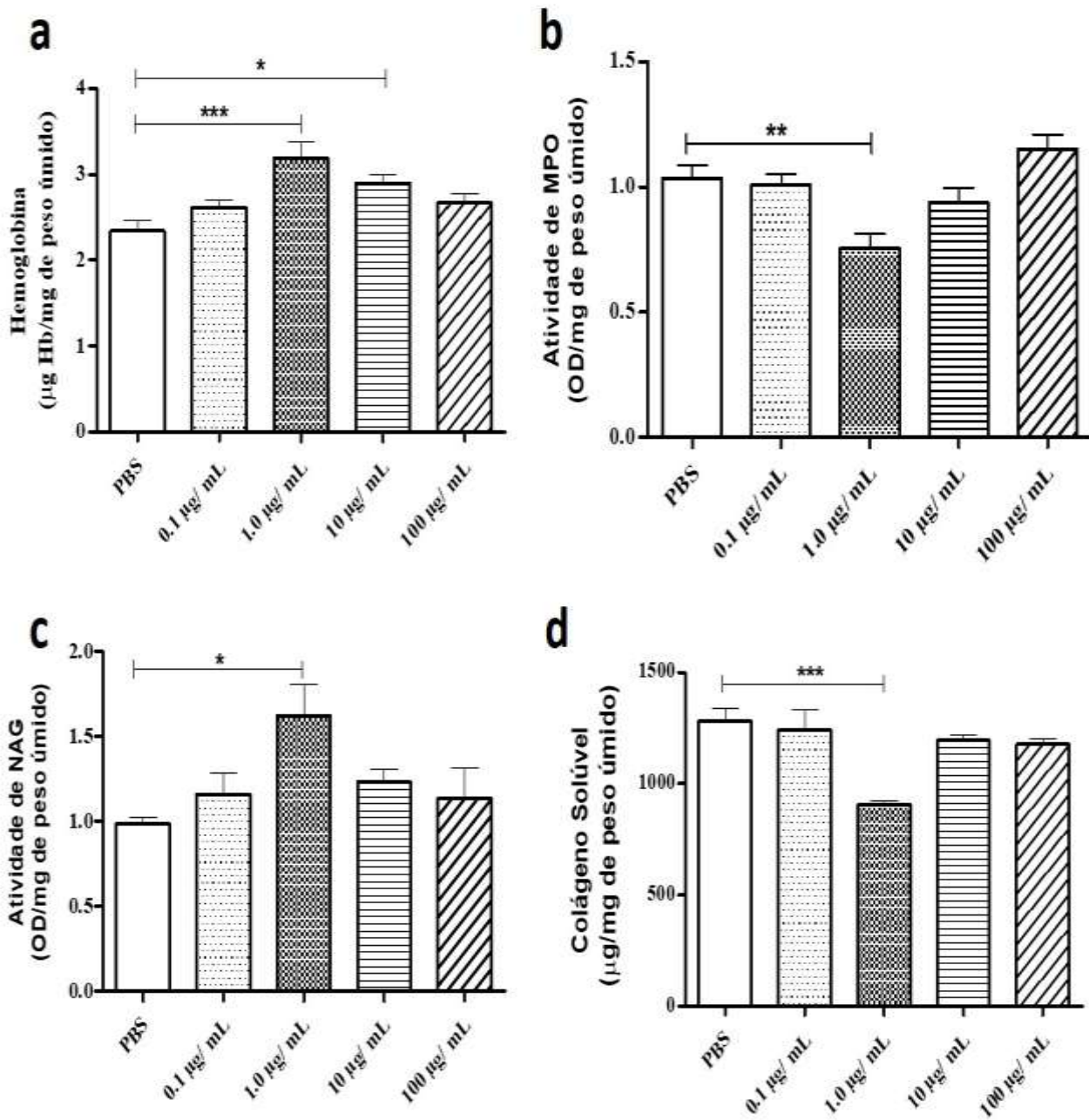


Figura 24: Efeitos do acetato administrado por via oral. (A) Hemoglobina. (B) Atividade de MPO (C) Atividade de NAG. (D) Colágeno solúvel. Os dados representam a média \pm E.P.M; n=8 para cada grupo experimental (ANOVA).

5.2. Resultados II

5.2.1 Deficiência da citocina IL-18 atrasa o fechamento de feridas cutâneas.

Visto que camundongos alimentados com dieta rica em fibras solúveis, apresentaram aumento sustentado da citocina IL-18 e que o papel de IL-18 no processo cicatricial é desconhecido, buscou-se entender o papel desta citocina na cicatrização de feridas cutâneas. Para tanto utilizou-se o modelo experimental de feridas excisionais e o modelo de implantes de esponja.

Observou-se um atraso no fechamento das feridas de animais IL-18^{-/-}, evidenciado principalmente, no 5º dia ($p < 0,05$) e 7º dia ($p < 0,001$) após a confecção do ferimento inicial, quando comparado às feridas de animais WT (Figura 25 a-b).

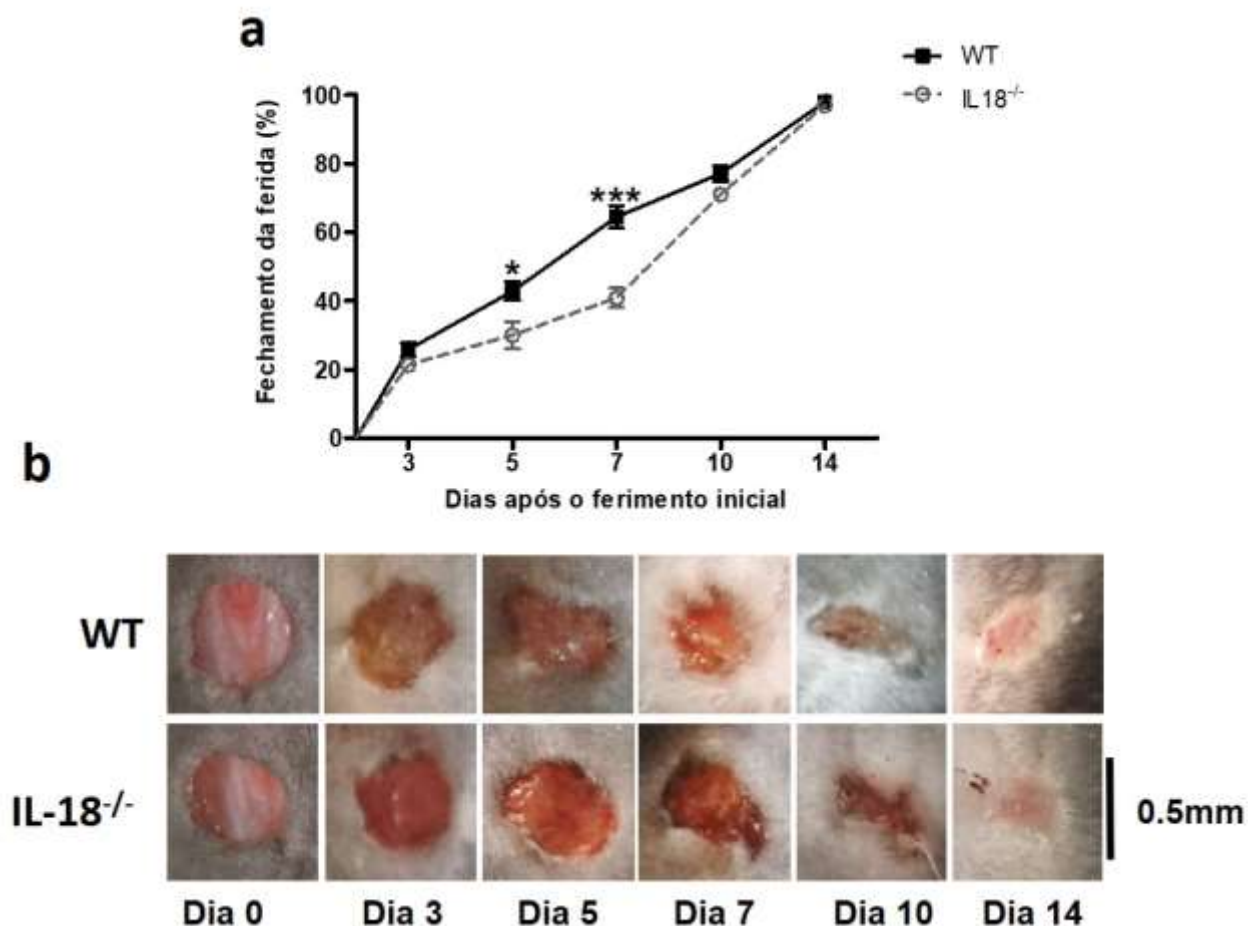


Figura 25. Avaliação do fechamento das feridas cutâneas em camundongos IL18^{-/-}. (A) Fechamento macroscópico da ferida (B) Imagens representativas de feridas de camundongos WT e IL18^{-/-}. Os dados representam a média \pm E.P.M, $n = 8$ animais para cada ponto cinética e grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA).

5.2.2 Deficiência de IL-18 reduz o acúmulo de leucócitos na ferida cutânea e no tecido fibrovascular.

Para verificar o impacto da ausência de produção de IL-18 sobre a resposta inflamatória, avaliou-se, através da mensuração das atividades de MPO e NAG, o acúmulo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, e mensurou-se os níveis da citocina pró-inflamatória TNF.

O acúmulo de neutrófilos na ferida de animais IL18^{-/-} apresentaram-se diminuídos no 1º (p <0,001) e no 3º (p <0,01) dia após a confecção do ferimento inicial, quando comparado às feridas de animais WT (figura 26a). Da mesma forma, o acúmulo de macrófagos mostrou-se diminuído nas feridas de animais IL18^{-/-} no 7º dia (p <0,001) após o ferimento inicial na pele, quando comparado à camundongos WT (figura 26b).

Similarmente, no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja, o acúmulo de neutrófilos revelou-se diminuído no 3º dia (p <0,001) em animais IL18^{-/-}, quando comparado à animais WT (figura 26d). Da mesma forma, o acúmulo de macrófagos mostrou-se diminuído nos dias 3 (p<0,001), 7 (p <0,01) e 14 (p<0,001) após implantação, quando comparado à implantes de animais WT (figura 26e).

Os níveis de TNF e VEGF apresentaram-se diminuídos na ferida cutânea no 1º e 3º dia após a lesão inicial (p<0,05 figura 27a) e no tecido fibrovascular de 7 dias em animais IL-18^{-/-} quando comparados à animais WT (p<0,01, figura 27a).

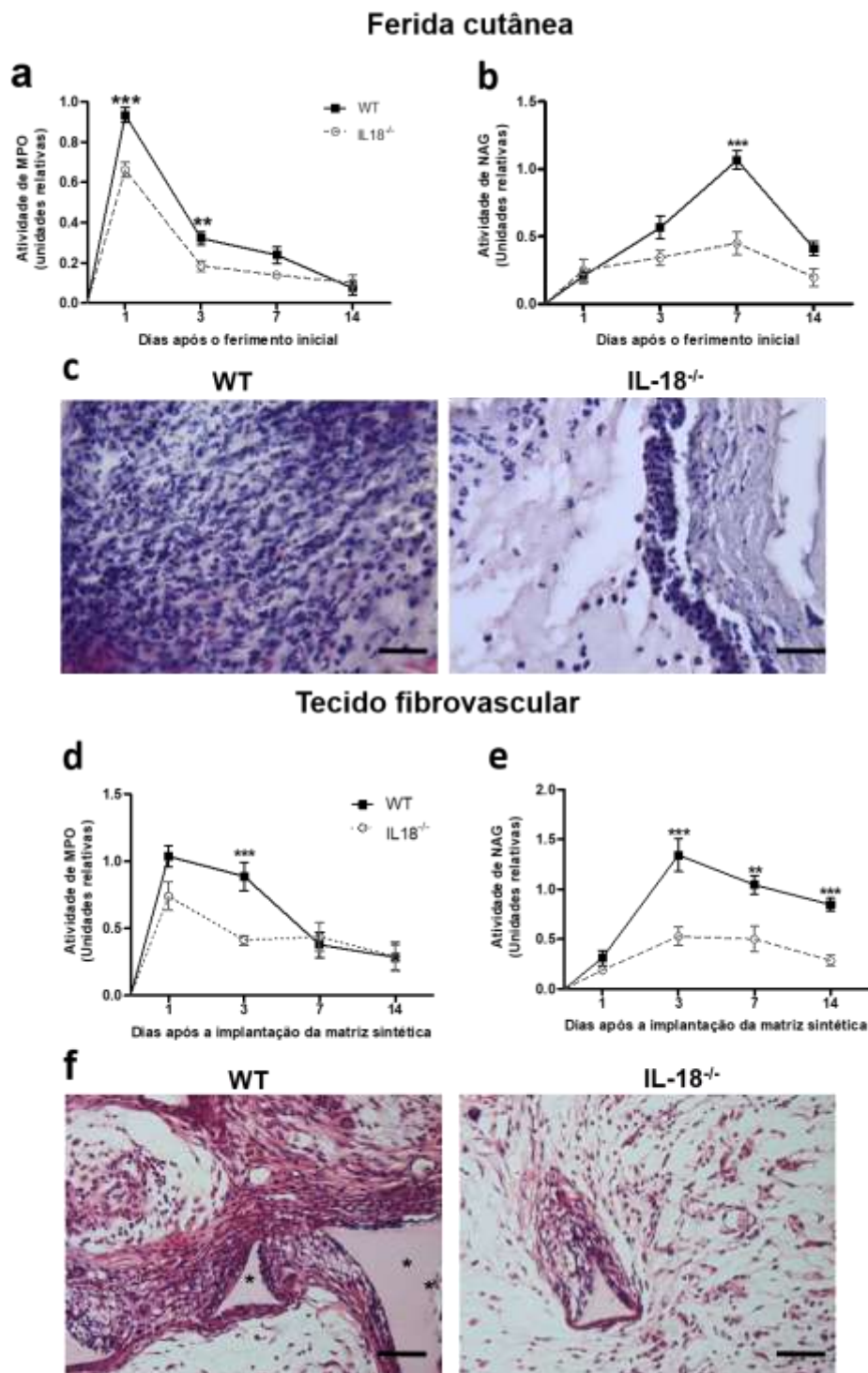
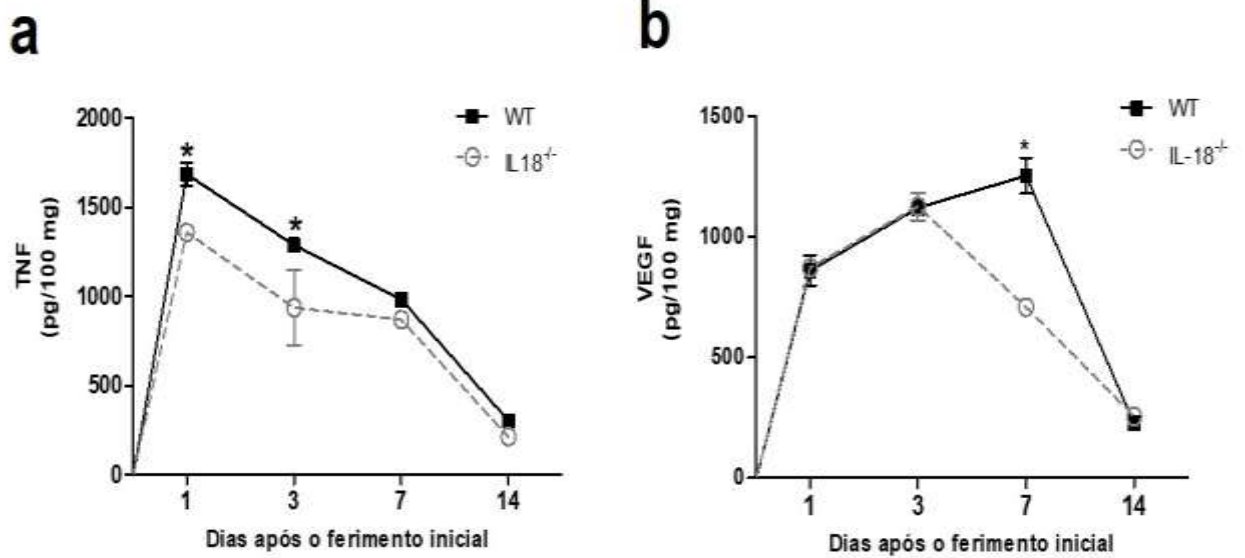


Figura 26. Avaliação do infiltrado leucocitário na ferida cutânea e no tecido fibrovascular em camundongos IL18^{-/-}. O acúmulo de neutrófilos e macrófagos nas feridas foram determinados pelas atividades de MPO e NAG, respectivamente, no dia 1^o, 3^o, 7^o e 14^o após lesão. (A) Atividade MPO na ferida cutânea. (B) Atividade NAG na ferida cutânea. (C) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da ferida cutânea no 7^o dia após a lesão inicial, corados com H&E. (D) Atividade MPO no tecido fibrovascular. (E) Atividade NAG no tecido fibrovascular. (F) Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido fibrovascular de 7 dias, corados com H&E. Os dados representam a média ± E.P.M. de grupos de 8 animais para cada grupo e ponto da cinética. **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA). Bar = 50 µm. Legenda: *, poros do implante subcutâneo, vistos como formas triangulares.

Ferida cutânea



Tecido fibrovascular

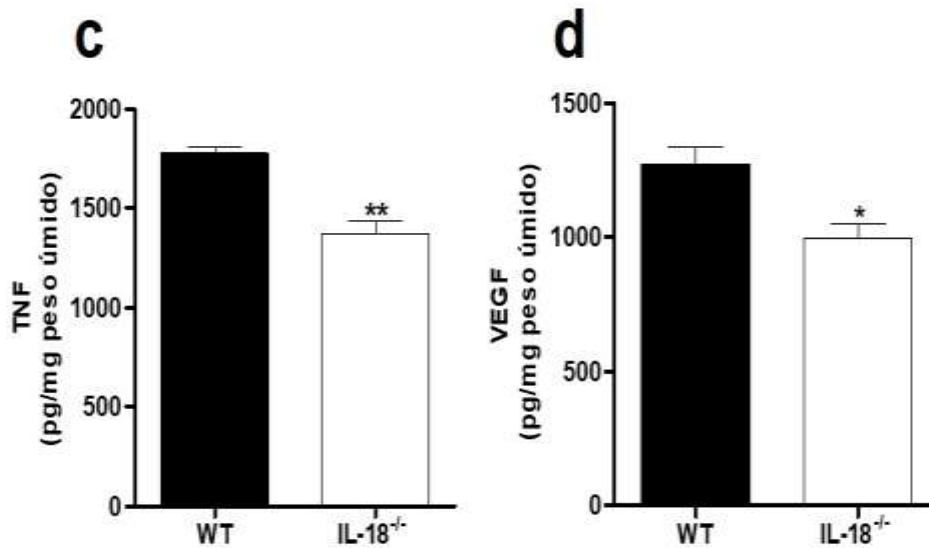


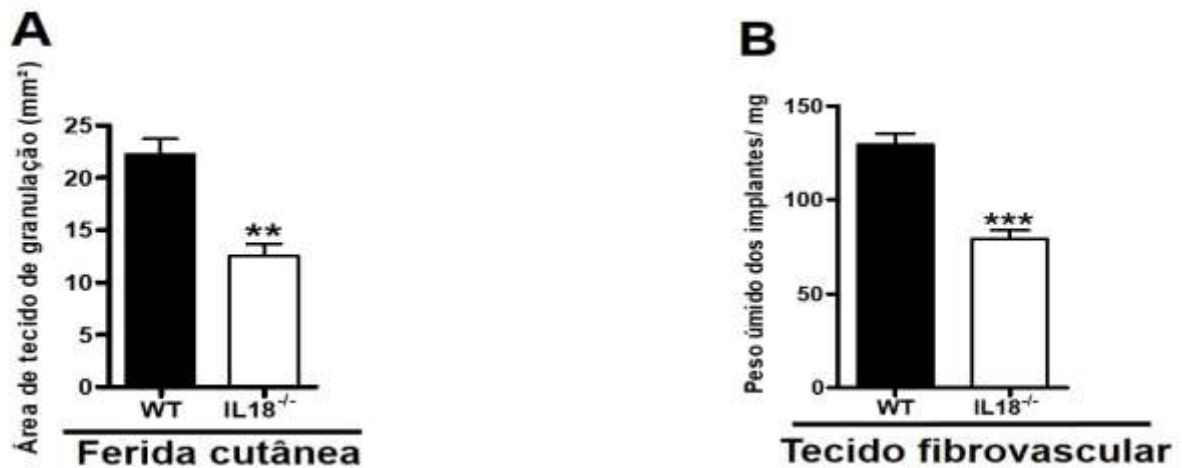
Figura 27. Avaliação da concentração de citocinas nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular em camundongos IL18^{-/-}. Os níveis de TNF e VEGF diminuíram em feridas de camundongos IL18^{-/-}. (A) TNF na ferida cutânea. (B) VEGF na ferida cutânea. (C) TNF no tecido fibrovascular. (D) VEGF na ferida cutânea. Os dados representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. *p < 0,05; **p < 0,01 (ANOVA e Two-way ANOVA).

5.2.3 Deficiência de IL18 reduz a formação do tecido de granulação nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular.

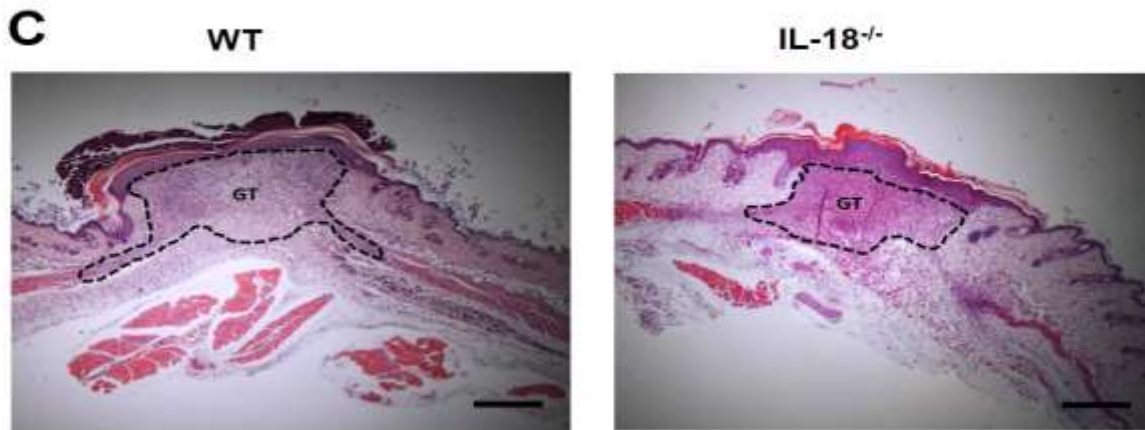
Para verificar se a ausência de IL18 afetaria a formação do tecido de granulação, avaliou-se a área do tecido de granulação nas feridas cutâneas por meio de análise morfométrica no 7º dia e o peso dos implantes de esponja (para avaliação indireta do tecido fibrovascular infiltrado) no 7º dia após a implantação.

Observou-se uma redução na área do tecido de granulação em cortes histológicos da ferida cutânea em animais IL18^{-/-}, quando comparado às feridas de animais WT (figura 28 a e c).

Da mesma forma, observou-se uma redução no peso dos implantes de animais IL18^{-/-}, quando comparado aos implantes de animais WT ($p < 0,001$, figura 28 b). Durante a inspeção macroscópica das esponjas de animais IL18^{-/-}, é possível notar essa diferença na quantidade de tecido fibrovascular infiltrado (figura 28d).



Ferida cutânea



Tecido fibrovascular

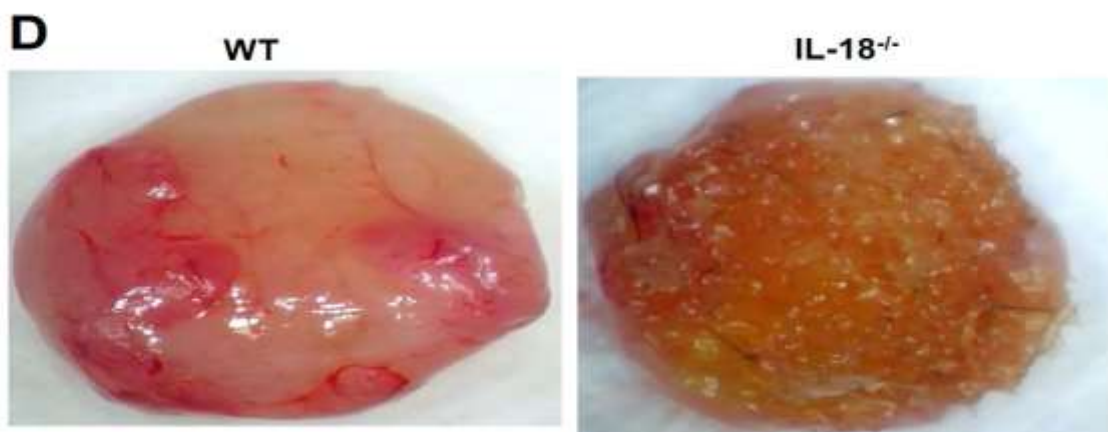


Figura 28. Avaliação do tecido de granulação na ferida cutânea e no tecido fibrovascular de camundongos IL18^{-/-}. (A) Área do tecido de granulação nas feridas cutâneas. (B) Peso dos implantes, que corresponde ao tecido fibrovascular infiltrado. (C) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da ferida cutânea coradas com H&E no dia 7^o após lesão. (D) Imagem representativa mostrando um implante subcutâneo de 7 dias após a implantação. Os dados representam a média ± E.P.M de 8 animais por grupo. *P<0,05; **P<0,01 (ANOVA). Bar = 50 µm. Legendas: gt = tecido de granulação.

5.2.4 Deficiência de IL-18 reduz a neovascularização em feridas cutâneas e no tecido fibrovascular.

Para verificar se a ausência de IL18 promoveria alterações na neovascularização, avaliou-se o número de vasos sanguíneos em cortes histológicos corados com H&E, os níveis de VEGF e o conteúdo de hemoglobina intra-implante. Observou-se uma redução do número de vasos sanguíneos nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular induzido pelo implante esponja, quando comparado aos tecidos de camundongos WT (figuras 29 a e b, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ e d e e, $p < 0,05$). Conforme pode ser observado na figura 18c, o conteúdo intra-implante de hemoglobina em camundongos IL18^{-/-}, também apresentou-se reduzido, quando comparado à implantes de camundongos WT. Corroborando com esses dados, a dosagem dos níveis de VEGF, apresentaram-se reduzidas, tanto na ferida cutânea, quanto no tecido fibrovascular induzido pela esponja em camundongos IL18^{-/-} (figura 27 b e d).

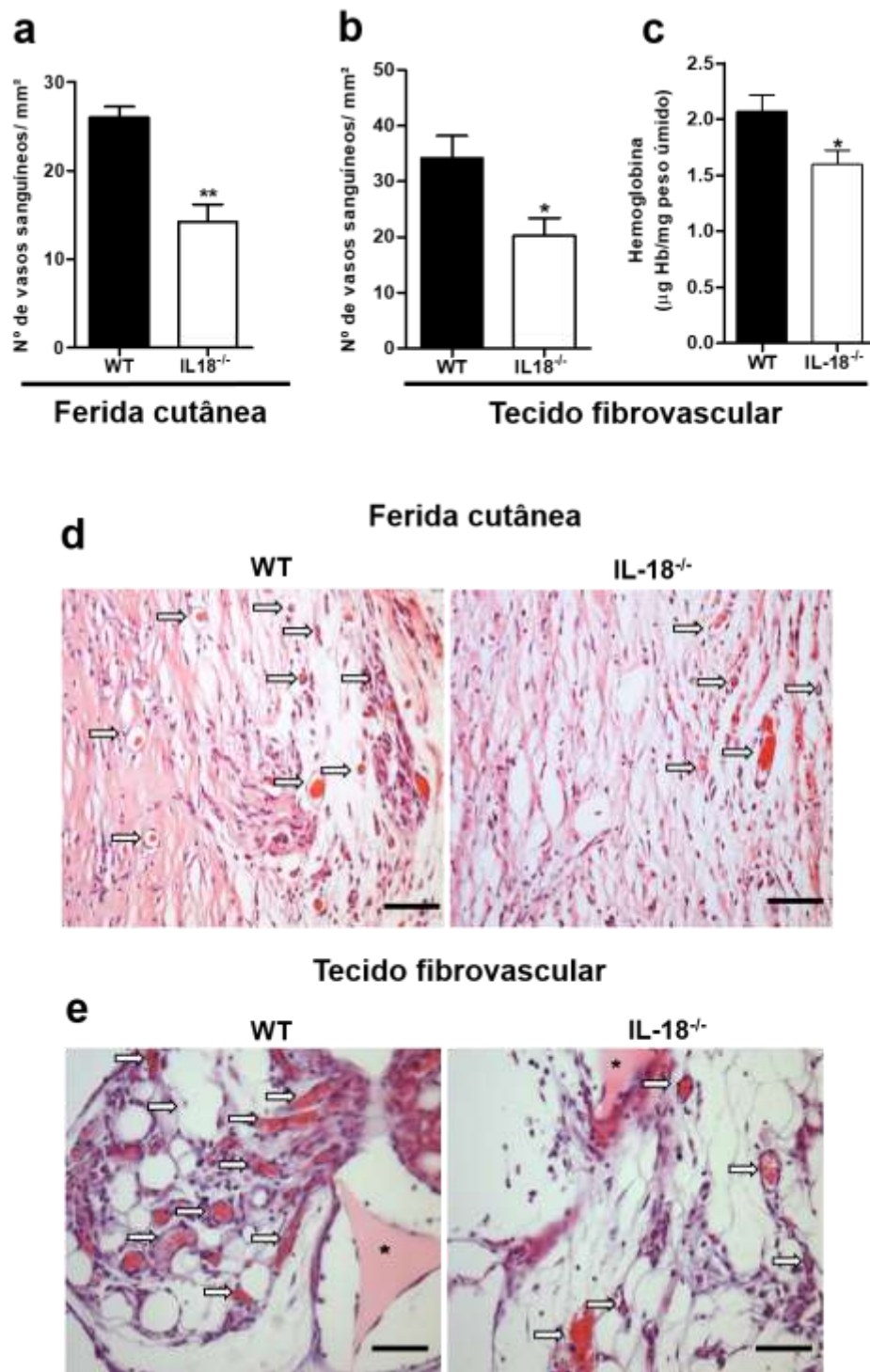


Figura 29. Avaliação da angiogênese em feridas cutâneas e no tecido fibrovascular de camundongos com deficiência de IL18^{-/-}. A angiogênese foi avaliada através da contagem de vasos de em cortes histológicos das feridas cutâneas e do tecido fibrovascular corados com H&E no 7º dia. (A) Número de vasos sanguíneos na ferida cutânea. (B) Nº de vasos sanguíneos no tecido fibrovascular subcutâneo. (C) Teor de hemoglobina do implante subcutâneo. (D) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos nas feridas cutâneas no 7º dia após a lesão. (E) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos tecido fibrovascular corados com H&E de 7 dias. Os dados representam a média ± E.P.M de 8 animais por grupo. *p<0,05; ***p<0,001 (ANOVA). Bar = 50mm. Legenda: (*), poros do implante subcutâneo, vistos como formas triangulares; setas brancas, vasos sanguíneos.

5.2.5 Deficiência de IL18 diminui a deposição de colágeno nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja

A citocina IL18 é conhecida por modular a deposição de colágeno e a fibrose tecidual. Estimou-se o conteúdo de colágeno nas feridas cutâneas e no tecido fibrovascular induzido pelo implante de esponja, através da quantificação digital do colágeno total em cortes histológicos corados com Picrosirius-Red e avaliados sob luz polarizada. Além disso, também foi mensurada a área cicatricial em cortes histológicos da ferida cutânea corados em H&E de 7 dias.

Conforme pode ser observado na Figura 30 a e c, os tecidos de animais IL18^{-/-} apresentaram uma redução na deposição de colágeno tanto na ferida cutânea de 14 dias, quanto no tecido fibrovascular de 14 dias, em comparação com animais WT. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na área cicatricial de animais IL18^{-/-}, quando comparado à animais WT (figura 30 b e d).

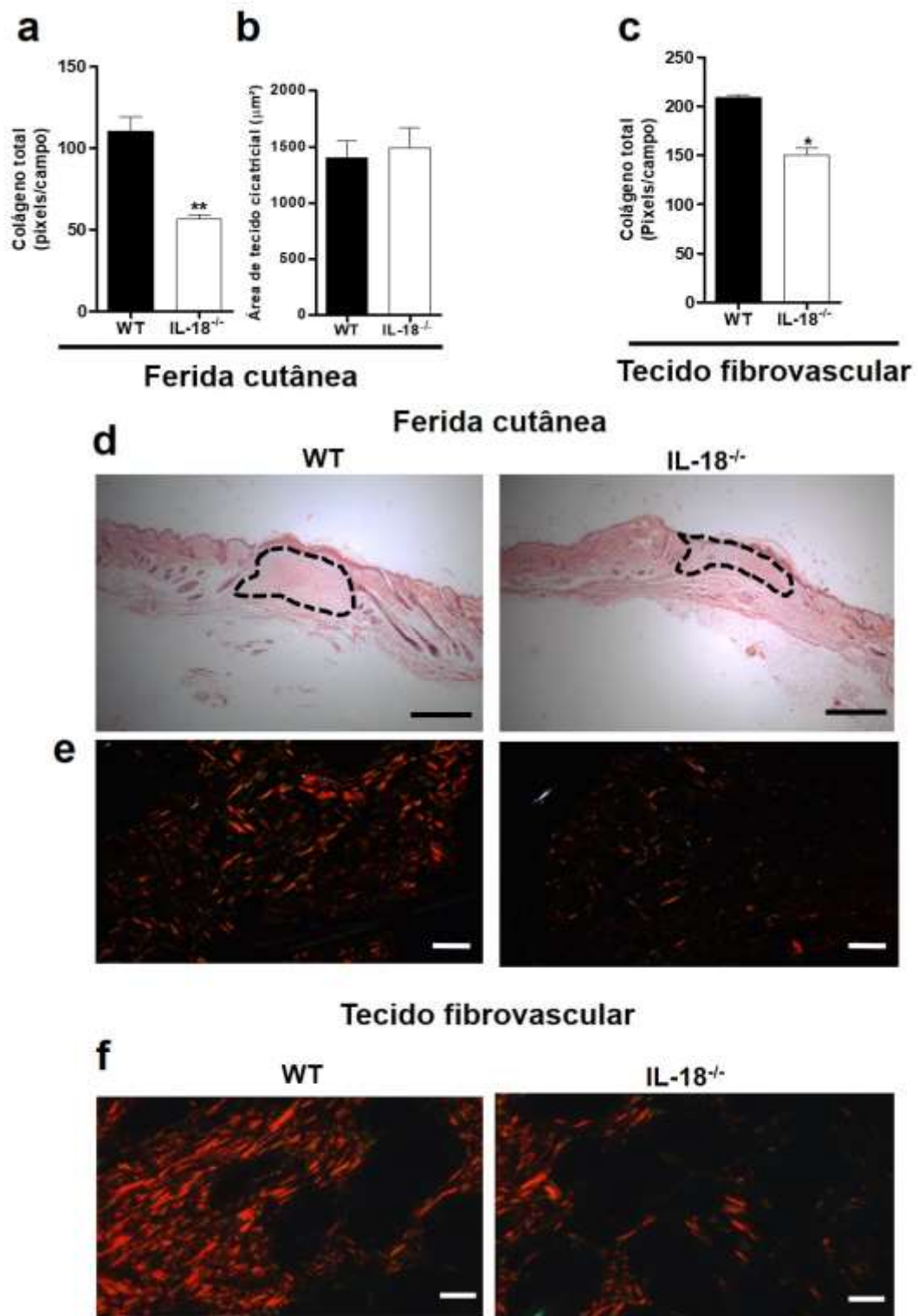


Figura 30. Avaliação da deposição de colágeno em feridas de camundongos IL18^{-/-}. A quantidade de colágeno foi avaliada em cortes histológicos de feridas cutâneas no 14^o dia e no tecido fibrovascular no 14^o dia, ambos corados com Picosirius Red. (A) Deposição de colágeno na ferida cutânea. (B) Área de cicatriz. (C) Fotomicrografias representativas do tecido de granulação de 14 dias corados com Picosirius Red e observados sob luz polarizada (ampliação original $\times 40$). (D) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos coradas com H&E de 14 dias, evidenciando a área da cicatriz. Os dados morfométricos foram obtidos usando o software ImageProPlus 7.0. Os dados representam a média \pm E.P.M de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (ANOVA). Bar = 50 μ m.

5.3 Resultados III

5.3.1 Dieta rica em fibras acelera o fechamento das feridas cutâneas, porém este efeito é atenuado em camundongos IL18^{-/-}.

Visto que a dieta rica em fibras solúveis acelerou o fechamento das feridas cutâneas e promoveu aumento sustentado dos níveis da citocina IL18, bem como camundongos IL18^{-/-} apresentaram prejuízo do processo cicatricial, a etapa seguinte foi avaliar se os efeitos da dieta rica em fibra eram dependentes da produção da citocina IL18. Para tanto, camundongos WT ou IL18^{-/-} alimentados com uma dieta rica em fibra foram avaliados quanto ao perfil de fechamento, inflamação, angiogênese e fibrogênese.

O fechamento da ferida cutânea foi avaliado através da mensuração da área da ferida no 3º, 7º, 10º e 14º dia após a lesão inicial. As feridas dos camundongos do grupo WT-HF quando comparado ao grupo WT-LF, apresentaram um aumento na taxa de fechamento da ferida no 3º (p<0,001), 5º (p<0,001), 10º (p<0,05) e 14º (p<0,05). Entretanto, camundongos IL18^{-/-} alimentados com a dieta rica em fibra (IL18^{-/-} HF), apresentaram uma redução na percentagem de fechamento das feridas no 3º, 5º e 7º dia, quando comparado ao grupo WT-HF (figura 31).

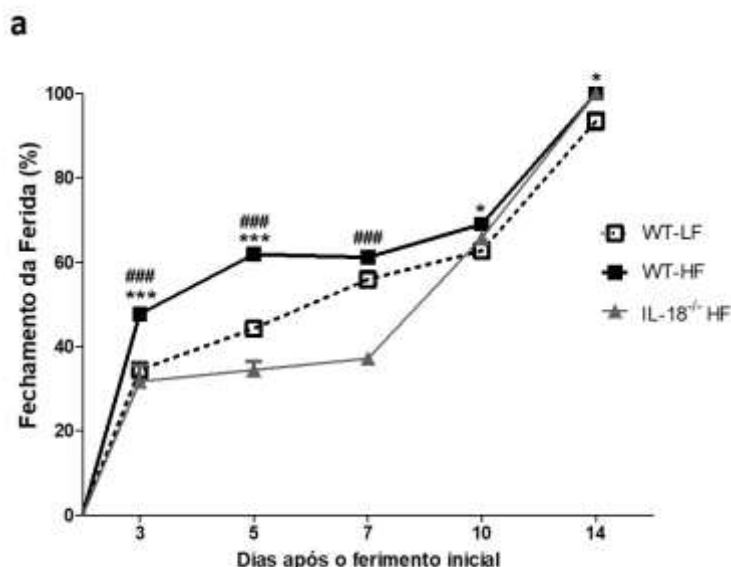


Figura 31. Efeitos da dieta rica em fibra sobre o fechamento da ferida nas feridas de camundongos WT e IL18^{-/-}(goma guar). Os dados representam a média ± E.P.M, n=8 animais por grupo e para cada ponto da cinética. *p<0,05; ***p<0,001 (Two-way ANOVA). Legenda: (*) representa a comparação entre o grupo WT-HF versus WT-LF e (#) WT-HF versus IL18^{-/-} HF.

5.3.2 Dieta rica em fibras reduz o infiltrado de neutrófilos e estimula o infiltrado de macrófagos na ferida, porém este efeito é atenuado em camundongos *IL18^{-/-}*.

O infiltrado inflamatório na ferida foi avaliado através do ensaio enzimático de MPO e NAG, que é uma avaliação indireta do conteúdo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. As feridas de camundongos do grupo WT-HF, quando comparadas as feridas de camundongos do grupo WT-LF, apresentaram uma redução da atividade enzimática de MPO no 3º dia ($p < 0,001$) e um aumento da atividade de NAG no 7º dia ($p < 0,001$). Entretanto, as feridas do grupo *IL18^{-/-}* HF, apresentaram um aumento da atividade enzimática de MPO no 7º dia ($p < 0,001$) e redução da atividade de NAG no 7º dia ($p < 0,001$) quando comparadas as feridas de camundongos do grupo WT-HF.

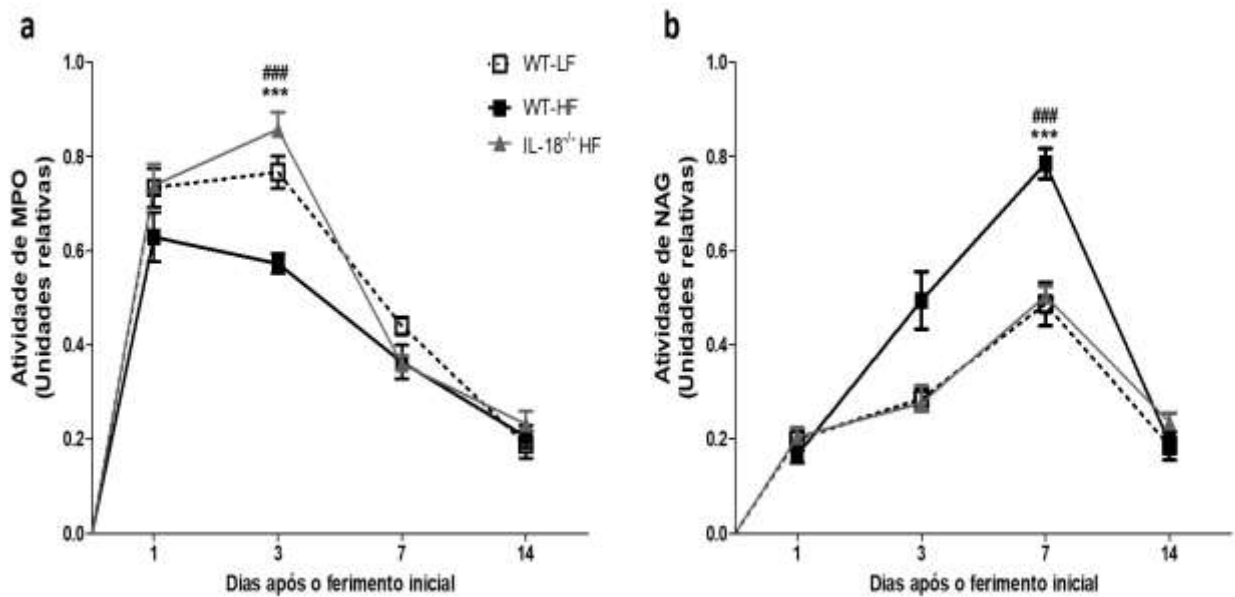


Figura 32. Efeitos da dieta rica em fibras sobre o infiltrado de leucócitos nas feridas de camundongos WT e *IL18^{-/-}* (goma guar). (A) Acúmulo de neutrófilos e (B) Acúmulo de macrófagos nas feridas, avaliados por meio do ensaio enzimático de MPO e NAG, respectivamente. $n=8$ animais por grupo e para cada ponto da cinética. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA). Legenda: (*) representa a comparação entre o grupo WT-HF versus WT-LF e (#) WT-HF versus *IL18^{-/-}* HF.).

5.3.3 Dieta rica em fibras estimula a formação de componentes do tecido de granulação, porém este efeito é atenuado na ausência de IL-18.

Os componentes do tecido de granulação foram avaliados através da contagem de vasos sanguíneos, área do tecido de granulação, ambas avaliações em cortes histológicos corados em H&E no 7º dia após a lesão inicial. O conteúdo de colágeno total foi avaliado através de morfometria digital de cortes histológicos de 14 dias corados com Picrosirius Red e avaliado sob luz polarizada.

As feridas dos camundongos do grupo WT-HF, quando comparado às feridas dos animais do grupo WT-LF, apresentaram um aumento do número de vasos sanguíneos ($p < 0.05$), uma redução tanto da área do tecido de granulação ($p < 0,001$), quanto do conteúdo total de colágeno ($p < 0,01$).

Por outro lado, as feridas de camundongos do grupo IL18^{-/-}-HF apresentaram uma redução do número de vasos sanguíneos ($p < 0,001$), um aumento tanto da área do tecido de granulação ($p < 0,001$) e do conteúdo total de colágeno, quando comparado as feridas de camundongos WT-HF.

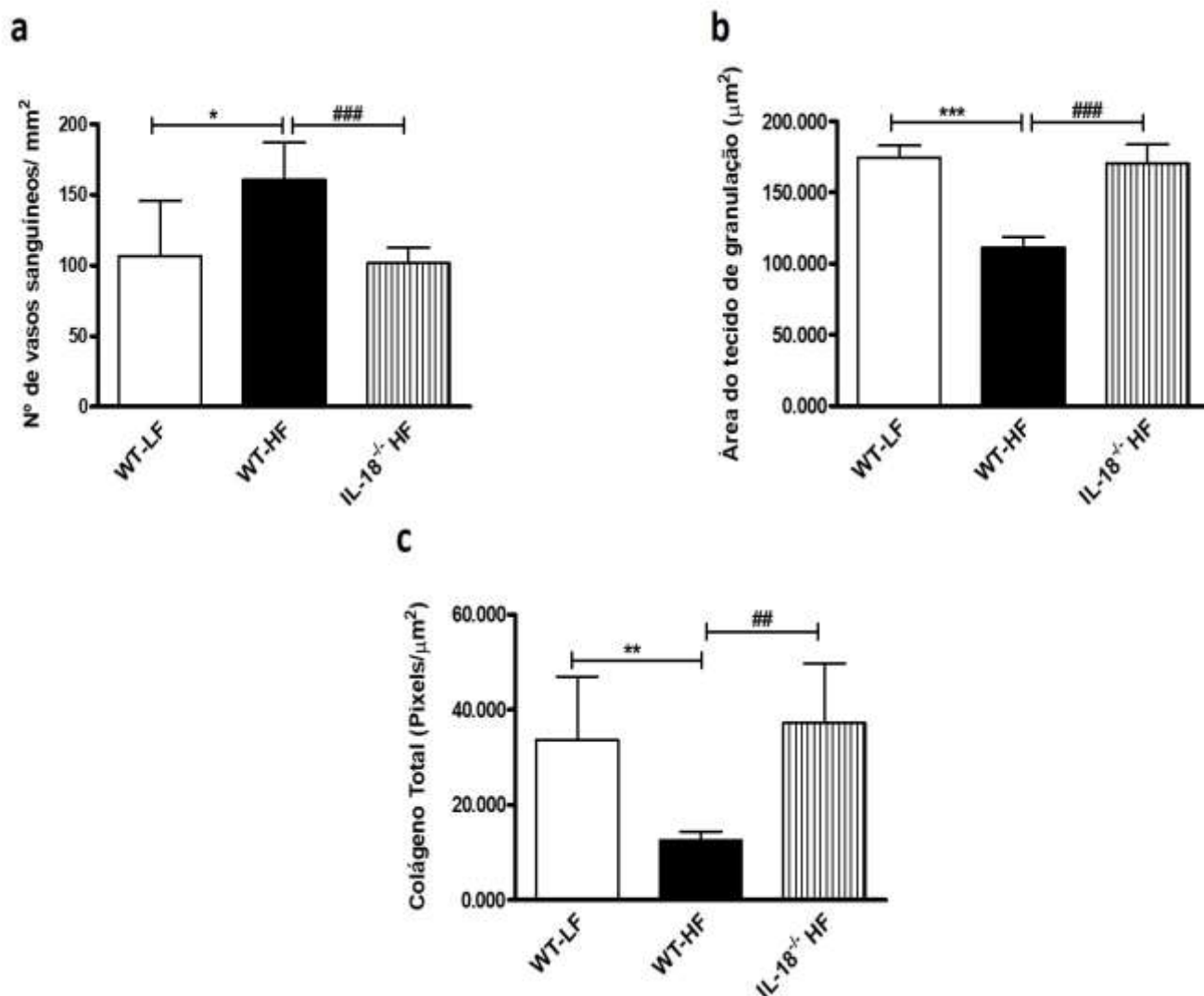


Figura 33. Efeitos da dieta rica em fibra sobre componentes do tecido de granulação nas feridas de camundongos WT e IL18^{-/-}(goma guar). (A) Número de vasos sanguíneos; (B) Área do tecido de granulação; (C) Colágeno Total. Os dados representam a média ± E.P.M, n=8 animais por grupo e para cada ponto da cinética. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (One-way ANOVA). Legenda: (*) representa a comparação entre o grupo WT-HF versus WT-LF e (#) WT-HF versus IL18^{-/-} HF.

5.3.4 O efeito da dieta rica em fibras sobre o fechamento da ferida é dependente da IL-18 derivada das células hematopoiéticas.

Para entender se a influência da citocina IL18 derivada de células da medula óssea ou de células residentes eram determinantes para o efeito da dieta rica em fibra, realizou-se o transplante de medula óssea de animais WT doadores para camundongos IL18^{-/-} receptores (para verificar a influência das células residentes) e de IL18^{-/-} doadores para WT receptores (para verificar a influência das células circulantes). Realizado o transplante de medula óssea entre WT e IL18^{-/-}, os animais foram alimentados com a dieta rica em fibra.

As feridas dos camundongos do grupo WT para WT HF apresentaram diferenças significativas no 3º(p<0,0001), 5º(p<0,0001), 7º(p<0,0001) e 10º (p<0,0001) no fechamento da ferida, quando comparados as feridas de camundongos do grupo WT para WT-LF.

Por outro lado, os camundongos do grupo IL18^{-/-} para WT HF apresentaram um atraso no fechamento da ferida no 3º (p<0,01), 5º (p<0,001), 7º (p<0,001) e 10º dia (p<0,001), diferente do fechamento da ferida em camundongos do grupo WT para IL18^{-/-} HF, que não apresentaram diferenças significativas, em comparação ao grupo WT para WT HF. Estes resultados indicam que os efeitos da dieta rica em fibra sobre a ferida, especialmente, o fechamento da ferida, dependem em parte da presença de IL-18 derivada de células do compartimento hematopoiético.

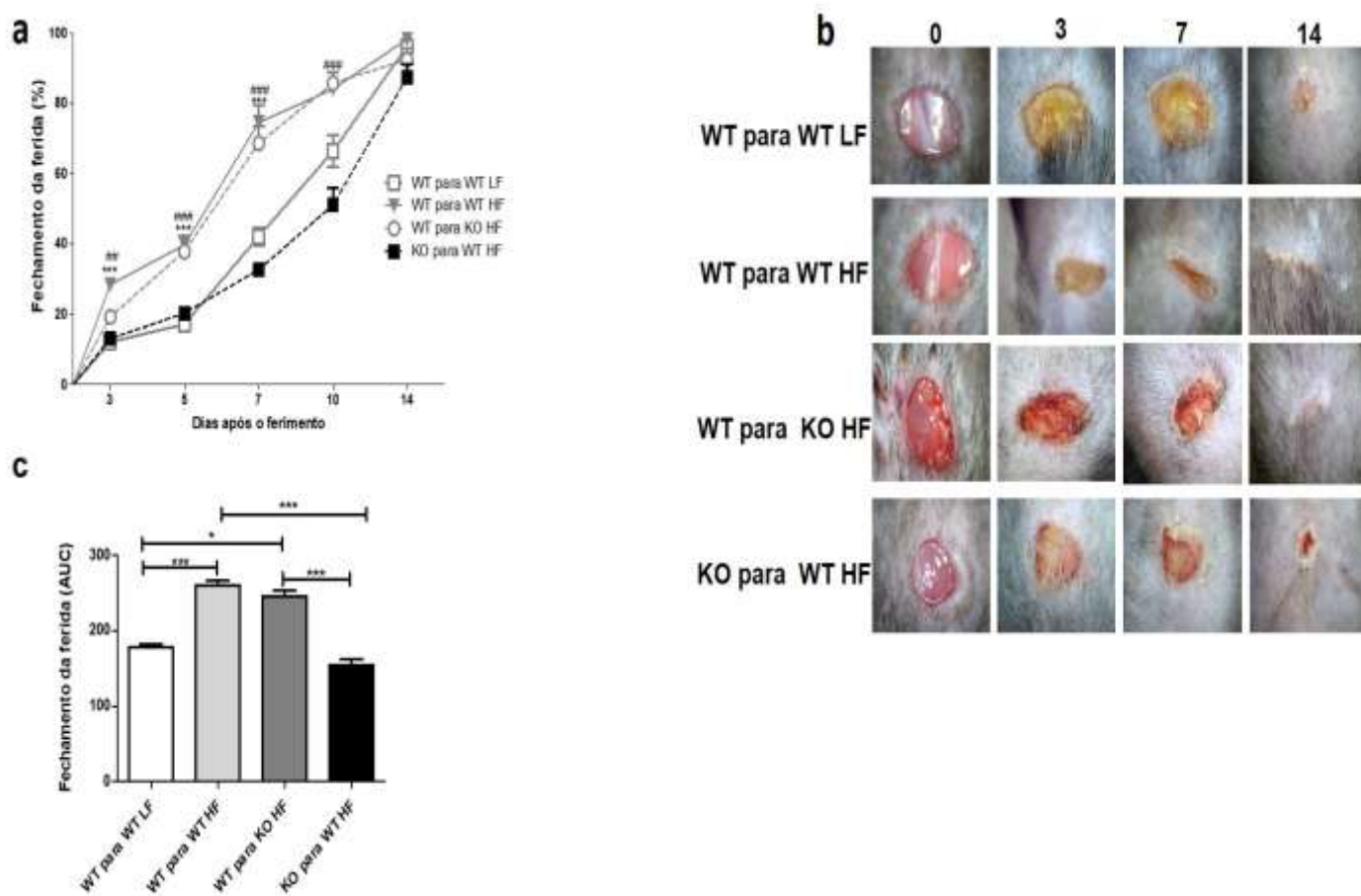


Figura 34. Efeitos da dieta rica em fibra sobre o fechamento da ferida em quimeras de medula óssea entre camundongos WT e IL18^{-/-} (goma guar). (A) Cinética de fechamento da ferida cutânea. (B) Imagens representativas das feridas nos dias 3, 7, 10 e 14. (C) Área sob a curva da cinética de fechamento da ferida. Os dados representam a média \pm E.P.M, n=5 animais por grupo e para cada ponto da cinética. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA). Legenda: (*) representa a comparação entre o grupo WT-HF versus WT-LF e (#) WT-HF versus IL18^{-/-} HF.

5.4 Resumo dos resultados

Tabela 9 - Resumo dos principais resultados do objetivo I.

Análise	WT-LF (controle)	WT-HF	GPR43KO - HF
Fechamento da ferida	↓	↑	↓
MPO	↑	↓	↑
NAG	↓	↑	↓
Tecido de granulação	↑	↓	↑
Contagem de vasos sanguíneos	↓	↑	↓
Colágeno	↑	↓	↑
Cicatriz	↑	↓	↑

Tabela 10 - Resumo dos principais resultados do tratamento com acetato intra-implante.

Análise	PBS (controle)	0,1µg/mL	1,0 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Hemoglobina	-	-	-	-	-
MPO	-	-	-	-	-
NAG	-	-	-	-	-
Colágeno	-	-	-	-	-

Tabela 11 - Resumo dos principais resultados do tratamento oral com acetato.

Análise	PBS (controle)	0,1µg/mL	1,0 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Hemoglobina	-	-	↑	↑	-
MPO	-	-	↓	-	-
NAG	-	-	↑	-	-

Colágeno	-	-	↑	-	-
----------	---	---	---	---	---

Tabela 12 - Resumo dos principais resultados do objetivo II.

Análise	WT	IL18^{-/-}
Fechamento da ferida	↑	↓
MPO	↑	↓
NAG	↑	↓
Tecido de granulação	↑	↓
Contagem de vasos sanguíneos	↑	↓
Colágeno	↑	↓
Cicatriz	-	-

Tabela 13 - Resumo dos principais resultados do objetivo III.

Análise	WT-LF	WT-HF	IL18^{-/-} HF
Fechamento da ferida	↓	↑	↓
MPO	↓	↓	↑
NAG	↓	↑	↓
Contagem de vasos sanguíneos	↓	↑	↓
Tecido de granulação	↑	↓	↑
Colágeno	↑	↓	↑

Tabela 14 - Resumo dos principais resultados do objetivo III (Avaliação dos efeitos da dieta rica em fibra em camundongos IL18^{-/-})

Análise	WT-LF	WT-HF	IL18^{-/-} HF
Fechamento da ferida	↑	↑	↓
MPO	↓	↓	↑
NAG	↓	↑	↓
Contagem de vasos sanguíneos	↓	↑	↓
Colágeno	↑	↓	↑

Tabela 15 - Resumo dos principais resultados do objetivo III (Avaliação dos efeitos da dieta rica em quimera de camundongos WT e IL18^{-/-}).

Análise	WT para WT-LF	WT para WT-HF	WT para IL18^{-/-}	IL18^{-/-} para WT-HF
Fechamento da ferida	↓	↑	↑	↓

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se que a dieta rica em fibras solúveis é capaz de modular componentes do tecido de granulação, acelerando o fechamento de feridas cutâneas e reduzindo a área de cicatriz. Observou-se a modulação de processos importantes para a formação do tecido de granulação, tais como inflamação, angiogênese e fibrogênese, sendo esses efeitos dependentes da expressão do receptor GPR43 de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), bem como da produção da citocina IL-18 derivada de células circulantes.

Atualmente, discute-se bastante sobre o fato de a microbiota intestinal contribuir para a saúde geral do hospedeiro, desempenhando uma série de funções fundamentais, tais como metabolismo de nutrientes, manutenção da integridade estrutural da barreira mucosa intestinal, modulação do sistema imunológico e proteção contra agentes patogênicos (JANDHYALA *et al.*, 2015). De fato, uma das importantes funções da microbiota intestinal é a degradação de polissacarídeos vegetais oriundos da dieta, fornecendo ao hospedeiro substratos ricos em energia como, por exemplo, os SCFAs (SIMPSON; CAMPBELL, 2015; WOTING; BLAUT, 2016). Essas moléculas não só participam das vias relacionadas ao metabolismo energético das células do cólon, mas também possuem a capacidade de influenciar a atividade de diferentes tipos celulares, tais como células inflamatórias e epiteliais (BRANDSMA *et al.*, 2015).

As fibras são classificadas como fibras solúveis, viscosas ou facilmente fermentáveis no cólon, como a pectina e goma guar, ou como fibras insolúveis como o farelo de trigo que tem ação no aumento de volume do bolo fecal, mas com limitada fermentação no cólon. Assim, pelo fato das fibras solúveis apresentarem maiores taxas de fermentação no intestino, esses tipos de fibras, alteram significativamente a composição da microbiota intestinal e, conseqüentemente, estimulam a produção de altas concentrações de SCFAs (BERNAUD; RODRIGUES, 2013). Dentre os SCFAs, como o acetato, propionato e butirato são produzidos durante a fermentação de fibras alimentares solúveis e ocorrem na proporção de aproximadamente 60: 20: 20, respectivamente. Assim, o acetato é considerado o mais abundante (DEN BESTEN *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que parte do acetato produzido no intestino durante a fermentação de fibras alimentares seja capaz de ser absorvido pela circulação sistêmica e é distribuído para os tecidos

periféricos, promovendo a modulação de respostas inflamatórias em locais distantes do intestino (TAN *et al.*, 2017).

Os resultados deste trabalho, demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta rica em fibra apresentaram um aumento na taxa de fechamento da ferida cutânea, acompanhado de efeitos modulatórios sobre componentes da resposta inflamatória, angiogênica e cicatricial, quando comparados aos animais alimentados com dieta contendo baixo teor em fibras. Resultados similares foram observados nos experimentos envolvendo tanto a suplementação com goma guar, quanto com pectina, sugerindo que, independente da fonte, a suplementação alimentar com fibras solúveis exerce efeitos positivos sobre a cicatrização de feridas cutâneas.

Esses efeitos foram abolidos na ausência do receptor GPR43, indicando que este é um receptor relevante para os efeitos da dieta rica em fibras solúveis na cicatrização. Esse achado é consistente com dados da literatura que mostram que os efeitos da dieta rica em fibras solúveis sobre a resposta inflamatória são em grande parte dependentes do receptor GPR43 (VIEIRA *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2017).

Na literatura há inúmeros trabalhos demonstrando que tanto goma guar, quanto pectina, tem como principal SCFAs produzido o acetato (HEINRITZ *et al.*, 2016). O acetato quando comparado com o butirato e propionato, possui maior atividade anti-inflamatória (TEDELIND *et al.*, 2007). A administração de acetato por via oral é capaz de atenuar a resposta inflamatória em modelos experimentais de colite e artrite (VIEIRA *et al.*, 2015; MASLOWSKI *et al.*, 2009; MACIA *et al.*, 2015b; VIEIRA *et al.*, 2017). De fato, nossos resultados utilizando o modelo experimental de formação de tecido de granulação induzido pelo implante subcutâneo de esponjas evidenciaram redução do conteúdo de neutrófilos e aumento do conteúdo de macrófagos em implantes de animais tratados com acetato por via oral.

Além disso, nossos experimentos também mostraram que a administração de acetato por via oral é capaz de aumentar conteúdo de hemoglobina intra-implante, sugerindo a estimulação da angiogênese, bem como reduzir o conteúdo de colágeno intra-implante. Corroborando esses achados, alguns trabalhos demonstram que SCFAs também podem atuar sobre outros tipos celulares como,

por exemplo, células endoteliais, através da ativação do receptor GPR43 (VINOLO *et al.*, 2011) ou influenciar o comportamento de outras células, tais como neutrófilos e macrófagos, através da modulação da secreção de citocinas e quimiocinas, como TNF, IL-10 e CCL-2/MCP-1 (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005), as quais podem influenciar na angiogênese e na fibrogênese. Além disso, LIU *et al.* (2016) demonstraram que a administração de butirato local é capaz de estimular a angiogênese tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Curiosamente, no presente trabalho, o tratamento local com acetato não foi capaz de alterar os componentes do tecido fibrovascular. Em parte, especula-se que uma provável ação do acetato sobre a microbiota intestinal seja a responsável por essa discrepância entre os efeitos do tratamento oral e local. De fato, a administração oral de SCFAs parece promover alterações significativas sobre a microbiota, bem como a redução de mediadores pró-inflamatórios como TNF (TEDELIND *et al.*, 2007; SIMPSON; CAMPBELL, 2015).

Tem sido demonstrado que a dieta rica em fibras solúveis estimula a produção local de citocinas através da ligação do acetato derivado da fermentação dessas fibras a receptores GPR43 e conseqüentemente ativação de vias associadas à resposta inflamatória (TAN, J. *et al.*, 2016; ULVEN, 2012; HALNES *et al.*, 2017). A dieta rica em fibras solúveis alterou a resposta inflamatória na ferida, aumentando os níveis de citocinas como TNF, CXCL-1/KC, IL-4, IL-1 β e IL-18. Essas citocinas e quimiocinas, embora sejam mais conhecidas pelo seu papel pró-inflamatório, também estão envolvidas na resposta angiogênica e na deposição de colágeno (SZADE *et al.*, 2015).

Além disso, observamos aumento da angiogênese nas feridas de camundongos alimentados com dieta rica em fibras solúveis. Embora na literatura não haja trabalhos relacionando dieta rica em fibra e angiogênese, sabe-se que camundongos isentos de microbiota comensal (*germ-free*) apresentam um aumento da angiogênese em feridas cutâneas, quando comparado a feridas de animais convencionais (CANESSO *et al.*, 2014). Ainda, Schirbel e colaboradores (2013) mostraram que o remodelamento vascular no intestino é induzido principalmente pela microbiota intestinal. Dessa forma, como a dieta rica em fibras solúveis acelerou o fechamento das feridas e considerando que formação de novos vasos sanguíneos via angiogênese é essencial para a cicatrização adequada (DIPIETRO, 2016), é possível sugerir que o efeito benéfico da dieta rica em fibras solúveis sobre o

fechamento das feridas cutâneas esteja associado à estimulação da formação de novos vasos sanguíneos, melhorando o aporte de oxigênio e nutrientes, bem como de células inflamatórias, no leito da ferida, fatores esses necessários para o adequado processo de reparo e fechamento das lesões cutâneas.

Os camundongos alimentados com as dietas ricas em fibras solúveis apresentaram ainda uma redução da área cicatricial, acompanhada de uma produção de uma diminuição de colágeno do tipo I e um aumento do colágeno do tipo III, quando comparado com animais alimentados com a dieta com baixo teor de fibras solúveis. A deposição de colágeno pode ser influenciada pela ação da citocina IL-10, a qual tem sido associada à regeneração tecidual, pois, dentre suas funções, encontram-se a promoção de efeitos pró-resolutivos/anti-inflamatórios e regulação da deposição de matriz extracelular (MEC) a partir de sua ação sobre fibroblastos (KING *et al.*, 2014). De fato, camundongos alimentados com a dieta rica em fibras solúveis apresentaram aumento da concentração local da citocina IL-10 nas feridas cutâneas, quando comparados com animais alimentados com a dieta com baixo teor de fibras solúveis. A superexpressão de IL-10 em modelos experimentais de cicatrização pós-natal, parece restaurar o fenótipo regenerativo observado durante a cicatrização cutânea fetal (PERANTEAU *et al.*, 2008). No modelo experimental de cicatrização cutânea em fetos, utilizado como modelo de reparo de feridas sem a formação de cicatrizes, observa-se uma maior proporção de colágeno tipo III em comparação com o colágeno do tipo I. Essa deposição diferencial de colágeno durante a cicatrização de feridas na pele parece contribuir para a cicatrização sem cicatrizes (XUE; JACKSON, 2015).

Existem trabalhos na literatura demonstrando que alguns dos efeitos da dieta rica em fibras solúveis parecem estar relacionados à ativação da via inflamassoma, estimulando, por exemplo, a produção da citocina IL-18 por células do epitélio intestinal (MACIA *et al.*, 2015). O complexo inflamassoma são reguladores centrais da resposta inflamatória, sendo a via ativada, logo após a detecção de vários fatores associados à estresse celular ou a entrada de patógenos na área da lesão, resultando em secreção de IL18(HENNIG *et al.*, 2018). A pro IL-18, um precursor inativo de IL18, já foi identificado em diferentes tipos celulares, incluindo queratinócitos, células dendríticas, macrófagos. Já o receptor de IL-18 (IL-18R) é

encontrado em macrófagos, neutrófilos, basófilos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, melanócitos, linfócitos e numerosos epitélios(LEE; CHO; PARK, 2015).

Interessantemente, no presente trabalho, observou-se aumento sustentado dessa citocina após o 7º dia da cicatrização de feridas em animais alimentados com a dieta rica em fibras solúveis. KÄMPFER *et al.* (1999) demonstraram que IL18 apresenta-se em níveis baixos de expressão na pele integra e que, logo após lesão excisional, a expressão desta citocina aumenta rapidamente, apresentando picos elevados por volta do 5º ao 7º dia após lesão, reduzindo imediatamente após, sugerindo que essa citocina possa participar do processo de cicatrização de feridas cutâneas. Curiosamente, este período do processo cicatricial é considerado ser importante para a formação do tecido de granulação. Entretanto, na literatura atual, não havia suporte para entender a participação de IL-18 na cicatrização de feridas cutâneas.

De modo interessante, animais com deleção gênica para citocina IL-18 apresentaram um atraso no fechamento das feridas cutâneas, bem como redução significativa em todos os componentes do tecido de granulação, como novos vasos sanguíneos, células inflamatórias e deposição de colágeno, tanto o modelo de feridas excisionais cutâneas quanto o modelo de implantes de esponja. Resultados semelhantes também foram observados em um estudo *in vivo* utilizando o modelo experimental de feridas excisionais, na qual os pesquisadores inibiram ou fizeram a supressão de Nod-Like Receptor, um componente da via inflamasoma (ARTLETT, 2013; MIRZA *et al.*, 2013; WEINHEIMER-HAUS *et al.*, 2015). Pode-se especular que a liberação de IL-18 e suas ações pró-inflamatórias durante as fases iniciais da cicatrização parece ser importante para aumentar a disponibilidade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas no local para estimular o crescimento do tecido de granulação. Entretanto, são necessários mais estudos para entender o papel de componentes da via inflamasoma na cicatrização de feridas e na formação do tecido de granulação.

As vias relacionadas com a citocina IL-18 são conhecidas por participar da manutenção da integridade epitelial, reparação e homeostase intestinal (ZAKI *et al.*, 2010). MACIA *et al.* (2015a) demonstraram que uma dieta rica em fibras solúveis, além de alterar a composição da microbiota intestinal, também ativa a via

inflamasoma epitelial, estimulando a produção de IL-18 no intestino, embora o papel de IL-18 na proteção do epitélio intestinal ainda não esteja claro, em parte, especula-se que as fibras alimentares, microbiota intestinal, vias associadas a ativação de GPR43 e inflamasoma, juntas, estão associadas na promoção da homeostase intestinal. Camundongos com deleção genica para a citocina IL-18 alimentados com uma dieta rica em fibra apresentaram resultados semelhantes à animais tratados com dieta com baixo teor em fibras, demonstrando, em parte, que IL-18 parece ser importante para os efeitos da dieta rica em fibra na cicatrização de feridas cutâneas.

Por fim, determinamos a contribuição de IL-18 derivada de células circulantes *versus* residentes para os efeitos da dieta rica em fibra na cicatrização de feridas, usando quimeras de medula óssea entre medulas WT e camundongos IL-18 alimentados com a dieta rica em fibra. Camundongos WT que receberam o transplante de medula óssea de camundongos deficientes de IL18^{-/-} e foram alimentados com dieta rica em fibras solúveis (IL18^{-/-} para WT HF), mostraram um fechamento de feridas atrasado, quando comparado com camundongos WT-LF que transplantados com a medula óssea de WT e camundongos IL18^{-/-} que receberam medula óssea de camundongos IL18^{-/-}. Esses dados mostram que os efeitos benéficos da fibra alimentar são, em parte, mediados por IL-18 derivada do compartimento hematopoiético, provavelmente, liberada pelas células inflamatórias no local da lesão.

Em conjunto, nosso estudo sugere que a suplementação dietética com dieta enriquecida com fibras solúveis (pectina ou goma de guar) é capaz de modular várias etapas da cicatrização de feridas, incluindo infiltração de leucócitos, produção de citocinas inflamatórias, reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, de modo dependente da ativação do receptor GPR43 e com a participação da produção da citocina IL18 de células hematopoiéticas, fornecendo perspectivas para o uso de prébióticos como modalidade terapêutica na cicatrização de feridas.

6. CONCLUSÕES

- A administração de acetato por via oral reduz o conteúdo de neutrófilos, aumenta o conteúdo de macrófagos, estimula a angiogênese, reduz o conteúdo de colágeno no tecido fibrovascular no modelo de implante de esponja;
- A dieta rica em fibras solúveis, através do receptor GPR43, acelera o fechamento de feridas cutâneas, modula a resposta inflamatória, estimula a angiogênese, reduz a deposição de colágeno e a área da cicatriz;
- A citocina IL-18 estimula a formação do tecido de granulação através da modulação de componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos, participando do fechamento de feridas cutâneas;
- A citocina IL-18 é importante para os efeitos da dieta rica em fibras solúveis, sendo a IL-18 derivada de células hematopoiéticas importante para o efeito da dieta rica em fibras solúveis na cicatrização de feridas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M. A. N. D. The sponge implant model of angiogenesis. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2016. v. 1430. p. 333–343.
- ANDREWS, J. P. *et al.* Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 51, p. 37–46, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844756>>. Acesso em: 8 set. 2016.
- ARTLETT, C. M. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *Journal of Pathology*, v. 229, n. 2, p. 157–167, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023641>>. Acesso em: 13 dez. 2014.
- BÄR, A. K. *et al.* *The Interplay of Host Microbiota and Parasitic Protozoans at Mucosal Interfaces: Implications for the Outcomes of Infections and Diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l.: s.n.], 2015
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 27 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679531>>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 57, n. 6, p. 397–405, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302013000600001&lng=pt&tlng=pt>.
- BIENENSTOCK, J. *et al.* Microbiota and the gut-brain axis. *Nutrition reviews*, v. 73 Suppl 1, n. suppl 1, p. 28–31, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175487>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- BODNAR, R. J. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 11, p. 641–650, nov. 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0594>>.
- BRANDSMA, E. *et al.* The immunity-diet-microbiota axis in the development of metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*, v. 26, n. 2, p. 73–81, 2015. Disponível em: <http://136.145.90.90:2088/sp-3.18.0b/ovidweb.cgi?&S=GBMPFPDNEKDDKHAGNCJKCGMCGIPAA00&Link+Set=S.sh.22|3|sl_10>.
- BRUNO, A. *et al.* Orchestration of angiogenesis by immune cells. *Frontiers in oncology*, v. 4, n. July, p. 131, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4078768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 ago. 2014.
- BULTMAN, S. J. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, maio 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201500902>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

CANESSO, M. C. C. *et al.* Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 10, p. 5171–5180, 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400625>>.

CANESSO, M. C. C. *et al.* Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 10, p. 5171–5180, 17 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25326026>>. Acesso em: 20 out. 2014.

CASSINI-VIEIRA *et al.* Estimation of Wound Tissue Neutrophil and Macrophage Accumulation by Measuring Myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) Activities. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e1662>>.

CASSINI-VIEIRA, P. *et al.* DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 92, p. 81–9, 15 dez. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010114003389>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

CASTOR, M. G. M. *et al.* Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 91, n. 4, p. 629–639, 2012.

CHRISTENSEN, G. J. M.; BRÜGGEMANN, H. *Bacterial skin commensals and their role as host guardians. Beneficial Microbes*. [S.l.: s.n.], 2014

COELHO, N. M.; MCCULLOCH, C. A. Contribution of collagen adhesion receptors to tissue fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-016-2440-8>>.

COGEN, A. L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skin microbiota: A source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, v. 158, n. 3, p. 442–455, 2008.

CONLON, M.; BIRD, A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*, v. 7, n. 1, p. 17–44, 24 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/7/1/17/>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

CULLUM, N. *et al.* Wounds research for patient benefit: a 5-year programme of research. [S.l.]: NIHR Journals Library, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27583319>>. Acesso em: 8 set. 2016.

DEN BESTEN, G. *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R036012>>.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.4MR0316-102R>>.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 979–984, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.4MR0316-102R>>. Acesso em: 3 set. 2016.

EMING, S. A. *et al.* Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, v. 6, n. 265, p. 265sr6, 3 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473038>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

EVAVOLD, C. L.; KAGAN, J. C. *How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity*. *Journal of Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2018

FLINT, H. J. The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews*, v. 70, n. SUPPL. 1, 2012.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care*, v. 4, n. 9, p. 560–582, 1 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339534>>. Acesso em: 8 set. 2016.

GASSE, P. *et al.* IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, v. 117, n. 12, p. 3786–99, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2066195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

GÉRARD, P. *Gut microbiota and obesity*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. [S.l.: s.n.], 2016

GODWIN, J. W.; PINTO, A. R.; ROSENTHAL, N. A. Chasing the recipe for a pro-regenerative immune system. *Seminars in cell & developmental biology*, 10 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521522>>. Acesso em: 9 set. 2016.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*, v. 29, n. 3, p. 153–162, 2015.

GREAVES, N. S. *et al.* Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*, v. 72, n. 3, p. 206–217, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23958517>>. Acesso em: 1 ago. 2014.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. *The skin microbiome*. *Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2011

GROVER, M.; KASHYAP, P. C. Germ free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology Motility*, v. 26, n. 6, p. 745–748, 2014.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. *Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics*. *Nature Medicine*. [S.l.: s.n.], 2015

GUPTA, A.; KUMAR, P. Assessment of the histological state of the healing wound. *Plastic and Aesthetic Research*, v. 2, n. 5, p. 239, 2015. Disponível em: <<http://parjournal.net/article/view/1209/663>>.

H. KÄMPFER, ET AL. Lack of interferon-gamma production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing. *Molecular Medicine*, v. 6, n. 12, p. 1016–1027, 2000.

HALNES, I. *et al.* Soluble fibre meal challenge reduces airway inflammation and expression of GPR43 and GPR41 in asthma. *Nutrients*, v. 9, n. 1, 2017.

HASEGAWA, M.; INOHARA, N. *Regulation of the gut microbiota by the mucosal immune system in mice. International Immunology*. [S.l: s.n.], 2014

HEINRITZ, S. N. *et al.* Impact of a high-fat or high-fiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients*, v. 8, n. 5, 2016.

HENNIG, P. *et al.* The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 2, p. 562, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/562>>.

HOLMES, C. J. *et al.* Dynamic Role of Host Stress Responses in Modulating the Cutaneous Microbiome: Implications for Wound Healing and Infection. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 1, p. 24–37, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2014.0546>>.

HU, C.; WONG, F. S.; WEN, L. Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacological research*, v. 98, p. 9–15, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747961>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

JOSE, P. A.; RAJ, D. Gut microbiota in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 24, n. 5, p. 403–9, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125644>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

KAPLANSKI, G. *Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. Immunological Reviews*. [S.l: s.n.], 2018

KASTELLORIZIOS, M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. Multiple tissue response modifiers to promote angiogenesis and prevent the foreign body reaction around subcutaneous implants. *Journal of Controlled Release*, v. 214, p. 103–111, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915300353>>.

KEENAN, M. J. *et al.* Improving healthspan via changes in gut microbiota and fermentation. *Age*, v. 37, n. 5, 2015.

KING, A. *et al.* Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Advances in wound care*, v. 3, n. 4, p. 315–323, 2014.

KOPITAR-JERALA, N. *The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. Frontiers in Immunology*. [S.l: s.n.], 2017

KOUTSOS, A.; TUOHY, K. M.; LOVEGROVE, J. A. Apples and cardiovascular health-is the gut microbiota a core consideration? *Nutrients*, v. 7, n. 6, p. 3959–98, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016654>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. *Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell*. [S.l: s.n.], 2014

LE, M. *et al.* Transforming Growth Factor Beta 3 Is Required for Excisional Wound Repair In Vivo. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, 2012.

LEE, J. H.; CHO, D. H.; PARK, H. J. *IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. International Journal of Molecular Sciences*. [S.l: s.n.], 2015

LEI-LESTON, A. C.; MURPHY, A. G.; MALOY, K. J. *Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation. Frontiers in Immunology*. [S.l: s.n.], 2017

LISTON, A.; MASTERS, S. L. *Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. Nature Reviews Immunology*. [S.l: s.n.], 2017

LIU, D. *et al.* Low Concentration of Sodium Butyrate from Ultrabraid+NaBu suture, Promotes Angiogenesis and Tissue Remodelling in Tendon-bones Injury. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. *Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. Nature Immunology*. [S.l: s.n.], 2005

MACIA, L. *et al.* Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature communications*, v. 6, n. August, p. 6734, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/ncomms/2015/150401/ncomms7734/full/ncomms7734.html>>.

MAIER, H. M. *et al.* Nutrition supplementation for diabetic wound healing: a systematic review of current literature. *Skinmed*, v. 11, n. 4, p. 217–24; quiz 224–5, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053007>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: Biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology*, v. 25, n. 3, p. 167–173, 2016.

MAQUART, F. X.; MONBOISSE, J. C. Extracellular matrix and wound healing. *Pathologie-biologie*, v. 62, n. 2, p. 91–5, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650524>>. Acesso em: 9 set. 2016.

MARCHESI, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, v. 65, n. 2, p. 330–339, fev. 2016. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-309990>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

- MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. , ago. 2015, p. 370–378. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175283>>. Acesso em: 9 set. 2016.
- MASLOWSKI, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, v. 461, n. 7268, p. 1282–6, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08530>>.
- MEISSNER, M. H. Venous ulcer care: which dressings are cost effective? *Phlebology: The Journal of Venous Disease*, v. 29, n. 1 Suppl, p. 174–180, 1 maio 2014. Disponível em: <<http://phl.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0268355514529699>>.
- MIRZA, R. E. *et al.* Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 62, n. 7, p. 2579–87, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23493576>>. Acesso em: 3 set. 2016.
- MISHRA, A. K.; DUBEY, V.; GHOSH, A. R. *Obesity: An overview of possible role(s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. Metabolism: Clinical and Experimental.* [S.l: s.n.]. , 2016
- MOREIRA, C. F. *et al.* Skin Wound Healing Model - Excisional Wounding and Assessment of Lesion Area. *BIO-PROTOCOL*, v. 5, n. 22, 2015. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e1661>>.
- MORTON, L. M.; PHILLIPS, T. J. Wound healing update. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, v. 31, n. 1, p. 33–7, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361287>>. Acesso em: 5 ago. 2012.
- PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery*, v. 187, n. 5A, p. 11S–16S, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147986>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- PATEL, S.; MAHESHWARI, A.; CHANDRA, A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *Journal of wound care*, v. 25, n. 1, p. 46–55, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762498>>. Acesso em: 8 set. 2016.
- PERANTEAU, W. H. *et al.* IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *The Journal of investigative dermatology*, v. 128, n. 7, p. 1852–1860, 2008.
- PORTOU, M. J. *et al.* The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. , ago. 2015, p. 31–36. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869514>>. Acesso em: 9 set. 2016.
- POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 873–887, 16 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925313>>. Acesso em: 14 jul. 2012.

RATHINAM, Vijay A.K.; CHAN, Francis Ka Ming. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends in Molecular Medicine*, 2018.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939–51, nov. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, v. 49, n. 1, p. 35–43, 11 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797712>>. Acesso em: 31 jul. 2012.

REIS, D. B. DO *et al.* Care for people with venous ulcers: The perception of nurses in the family health strategy. *Remex: Revista Mineira de Enfermagem*, v. 17, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1415-2762.20130009>>.

RODRIGUES HOFFMANN, A. *The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. Veterinary Dermatology*. [S.l: s.n.], 2017

ROMANOVSKY, A. A. *Skin temperature: Its role in thermoregulation. Acta Physiologica*. [S.l: s.n.], 2014

SABUNCU, T. *et al.* High serum concentration of interleukin-18 in diabetic patients with foot ulcers. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, v. 104, n. 3, p. 222–226, 2014.

SALAZAR, J. J.; ENNIS, W. J.; KOH, T. J. *Diabetes medications: Impact on inflammation and wound healing. Journal of Diabetes and its Complications*. [S.l: s.n.], 2016

SANDERS, N. L.; MISHRA, A. *Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. Cytokine and Growth Factor Reviews*. [S.l: s.n.], 2016

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. *Functions of the skin microbiota in health and disease. Seminars in Immunology*. [S.l: s.n.], 2013

SANMIGUEL, A.; GRICE, E. A. *Interactions between host factors and the skin microbiome. Cellular and Molecular Life Sciences*. [S.l: s.n.], 2015

SARMENTO, F.; BERNAUD, R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 57, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v57n6/01.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

SATISH, L. Chemokines as Therapeutic Targets to Improve Healing Efficiency of Chronic Wounds. *Advances in wound care*, v. 4, n. 11, p. 651–659, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0602>>\n<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26543679>>\n<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4620534>>.

SCALES, B. S.; HUFFNAGLE, G. B. The microbiome in wound repair and tissue fibrosis. , jan. 2013, p. 323–331. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042513>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

SCHIRBEL, A. *et al.* Pro-angiogenic activity of TLRs and NLRs: A novel link between gut microbiota and intestinal angiogenesis. *Gastroenterology*, v. 144, n. 3, 2013.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. *Structure and function of the human skin microbiome. Trends in Microbiology*. [S.l: s.n.], 2013

SIMPSON, H. L.; CAMPBELL, B. J. Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 42, n. 2, p. 158–179, 2015.

SINDRILARU, A.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing. *Advances in wound care*, v. 2, n. 7, p. 357–368, set. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3842885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

SIVAPRAKASAM, S.; PRASAD, P. D.; SINGH, N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics*, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725816300493>>.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. *Advances in wound care*, v. 4, n. 11, p. 631–640, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0559>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26543677>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4620531>>.

SZADE, A. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*, v. 67, n. 3, p. 145–159, 2015.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 1, 2015.

TAN, J. *et al.* Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell Reports*, v. 15, n. 12, p. 2809–2824, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716306301>>.

TAN, J. *et al.* The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology*. [S.l: s.n.], 2014. p. 91–119. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001004000039>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

TAN, J. K. *et al.* Metabolite-Sensing G Protein–Coupled Receptors—Facilitators of Diet-Related Immune Regulation. *Annual Review of Immunology*, v. 35, n. 1, p. 371–402, 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-051116-052235>>.

TEDELIND, S. *et al.* Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 13, n. 20, p. 2826–2832, 2007.

THOMAS, P. G. *et al.* The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1. *Immunity*, v. 30, n. 4, p. 566–575, abr. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130900140X>>.

THORBURN, A. N.; MACIA, L.; MACKAY, C. R. *Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases*. *Immunity*. [S.l: s.n.], , 2014

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. 2000, [S.l: s.n.], 2000. p. 40–46.

ULVEN, T. *Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets*. *Frontiers in Endocrinology*. [S.l: s.n.], , 2012

VAN GINDERACHTER, J. A. The wound healing chronicles. *Blood*, v. 120, n. 3, p. 499–500, 19 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821998>>. Acesso em: 2 maio 2015.

VIEIRA, A. T. *et al.* A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis and Rheumatology*, v. 67, n. 6, p. 1646–1656, 2015.

VIEIRA, A. T. *et al.* Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 101, n. 1, p. 275–284, 2017. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/lookup/doi/10.1189/jlb.3A1015-453RRR>>.

VINOLO, M. A. R. *et al.* *Regulation of inflammation by short chain fatty acids*. *Nutrients*. [S.l: s.n.], , 2011

VOLIN, M. V.; KOCH, A. E. Interleukin-18: A Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, v. 31, n. 10, p. 745–51, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864160>>. Acesso em: 3 set. 2016.

WEINHEIMER-HAUS, E. M. *et al.* Nod-Like Receptor Protein-3 Inflammasome Plays an Important Role during Early Stages of Wound Healing. *PLOS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0119106, 20 mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119106>>. Acesso em: 2 set. 2016.

WHITE, E. S.; MANTOVANI, A. R. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *The Journal of pathology*, v. 229, n. 2, p. 141–4, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097196>>. Acesso em: 3 set. 2016.

- WONG, V. W. *et al.* From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics. *Plastic and reconstructive surgery*, v. 132, n. 5, p. 854e–861e, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24165637>>. Acesso em: 25 nov. 2014.
- WOTING, A.; BLAUT, M. The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*, v. 8, n. 4, p. 202, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/8/4/202>>.
- WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450–462, 15 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982353>>. Acesso em: 9 set. 2016.
- XING, S.-S.; TAN, H.-W. No Title. *Molecular Medicine*, v. 14, n. 7-8, p. 1, 2008. Disponível em: <http://www.molmed.org/content/pdfstore/395_402.Xing.00024.PDF>.
- XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in wound care*, v. 4, n. 3, p. 119–136, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4352699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- YANG, Y. *et al.* Interleukin-18 and Interferon Gamma Levels in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 72, n. 5, p. 504–514, 2014.
- ZAKI, M. H. *et al.* The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis. *Immunity*, v. 32, n. 3, p. 379–391, 2010.
- ZHANG, S. *et al.* Phagocyte-myocyte interactions and consequences during hypoxic wound healing. *Cellular Immunology*, v. 291, n. 1-2, p. 65–73, 2014.

ANEXO I – Artigos relativos à tese publicados em periódico científico

1. Resultados do papel de IFN- γ e iNOS na cicatrização de feridas.

A Interleucina (IL)-18 é um potente indutor de IFN- γ , o qual, por sua vez, é um potente estimulador da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (YANG *et al.*, 2014) (KAPLANSKI, 2018). Com o intuito de verificar se IFN- γ e iNOS poderiam estar envolvidos na cascata de sinalização desencadeada por IL-18, avaliamos a formação do tecido de granulação em animais com deleção gênica para IFN- γ (IL-18-KO) e iNOS (iNOS-KO).

As respostas observadas nos animais IFN-gama se assemelham àquelas observadas nos animais IL-18-KO, sugerindo que essa molécula pode estar envolvida na cascata de sinalização desencadeada por IL-18. Entretanto, resultados distintos, especialmente no concernente à inflamação e à deposição de colágeno, foram observados nos animais iNOS-KO.

Esses artigos não foram incluídos no corpo da tese por se tratarem de avaliações preliminares ainda sem um estudo de contrapartida nas feridas excisionais de animais suplementados com a dieta rica em fibras solúveis.

Anexo II - Manuscritos em preparação relativos à tese