

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas

**Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em
animais isentos de microbiota comensal**

Maria Cecília Campos Canesso

Belo Horizonte

Minas Gerais

2014

Maria Cecília Campos Canesso

Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em animais isentos de microbiota comensal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia).

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos

(Dep. Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG)

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Lucíola Barcelos pela introdução ao meio científico e pelas experiências adquiridas desde a iniciação científica até o mestrado. Obrigada também pela oportunidade, apoio, orientação, dedicação, entusiasmo e paciência durante os anos em que estive no laboratório.

À Angelica pelo companheirismo, co-orientação e todos os ensinamentos. Não só aqueles obtidos dentro do laboratório mas muitos outros aprendizados proporcionados pela nossa convivência. Obrigada pelas horas de atenção às minhas dúvidas, incertezas e por tentar, sempre que possível, me guiar e mostrar caminhos, sem me deixar jamais desanimar e desistir de meus objetivos.

Agradeço aos amigos do LanCet pelo incentivo, discussões científicas, trabalhos diários, ajudas nos experimentos e pelas boas risadas e momentos de descontração tão importantes para aliviar o estresse do dia-a-dia. Agradeço em especial ao Tiago, que esteve comigo durante todo o desenvolvimento desse trabalho sempre me ajudando.

Ao grupo Imunofarmacologia, em especial às minhas grandes amigas, por todos os momentos prazerosos e ajudas de última hora.

Às meninas do NucleUs pela companhia durante os 4 anos e meio da graduação, por dividirem todas as alegrias e as tristezas desta caminhada. A todos os meus amigos, de perto ou de longe, obrigada pelos passos dados juntos, pela alegria e momentos de descontração

Especialmente aos meus pais e meu irmão pelo apoio incondicional nos momentos de escolha, pelo carinho e por ter me dado a melhor educação e suporte para a realização desse trabalho. Muito obrigada pela paciência nas horas em que esta me faltava.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	08
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 - Reparo tecidual.....	15
1.1.1 - Fases da cicatrização de feridas cutâneas.....	15
1.1.1.1 - Fase inflamatória	18
1.1.1.2 - Fase proliferativa.....	20
1.1.1.3 - Fase de remodelamento	22
1.2 - Influência do sistema imunológico no reparo tecidual	23
1.3 – Microbiota	26
1.4 - Microbiota e sistema imune	29
1.4 - Microbiota e cicatrização de feridas.....	31
2 – JUSTIFICATIVA.....	32
3 – OBJETIVOS	34
3.1 - Objetivo geral.....	35
3.2 - Objetivos específicos	35

4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 – Animais.....	37
4.2 - Modelo experimental de feridas cutâneas excisionais	38
4.3 - Grupos experimentais.....	39
4.4 Quantificação do infiltrado de neutrófilos na região da ferida.....	39
4.5 Quantificação do infiltrado de macrófagos na região da ferida.....	40
4.6 Análise da produção de mediadores solúveis	41
4.7 Contagem total e diferencial de células do sangue.....	42
4.8 Quantificação da expressão de mRNA através de qPCR em tempo real	42
4.9 Avaliações histológicas	45
4.10 Análises estatísticas	46
5 - RESULTADOS.....	47
5.1 O fechamento de feridas cutâneas excisionais é acelerado nos camundongos germ-free.....	48
5.2 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios em feridas cutâneas de animais convencionais e germ-free.....	50
5.3 Perfil de leucócitos nas feridas dos camundongos germ-free é alterada	52
5.4 Genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados são altamente expressos nas feridas dos animais germ-free	56
5.5 Angiogênese é aumentada na ferida dos camundongos germ-free.....	52
5.6 Deposição de colágeno e formação de cicatriz é alterada nas feridas dos camundongos germ-free	60

5.7 Animais germ-free colonizados restauram o fenótipo observado nos animais convencionais.....	62
6 – DISCUSSÃO	65
7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
8 – CONCLUSÃO.....	75
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10 – ANEXO.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	Convencional
CXCL1/KC	Quimiocina motivo C-X-C ligante 1/ Quimocina 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	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
E.P.M	Erro padrão da média
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FIZZ1	Proteína encontrada na zona inflamatória
GF	<i>Germ free</i> (isentos de germe)
H&E	Hematoxilina-Eosina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	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
PAMPs	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-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μL	Microlitros
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fases da cicatrização de feridas cutâneas	16
FIGURA 2 - Atividades pro- e anti-inflamatória dos leucócitos na pele	24
FIGURA 3 - Composição microbiana do trato gastrointestinal	28
FIGURA 4 - Diversidade da microbiota comensal da pele	29
FIGURA 5 - Delineamento experimental.....	38
FIGURA 6 - Esquema ilustrativo da medida de Língua epitelial.....	46
FIGURA 7 - Cicatrização de feridas é acelerada nos animais germ-free.....	49
FIGURA 8 - Cinética de produção de citocinas nas feridas dos animais germ-free e convencionais durante a cicatrização de feridas cutâneas	51
FIGURA 9 - Cinética de acúmulo de leucócitos nas feridas cutâneas excisionais dos animais germ-free e convencionais	54
FIGURA 10 - Fotomicrografias representativas de seções da ferida de animais germ-free e convencionais 1 dia após a lesão	55
FIGURA 11 - Genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados são altamente expressos nas feridas dos animais germ-free	57
FIGURA 12 - Angiogênese na região das feridas é aumentada nos animais germ-free	59
FIGURA 13 - Deposição de colágeno na pele ferida e formação de cicatriz nos animais germ-free e convencionais	61
FIGURA 14 - Animais germ-free colonizados restauram o fenótipo dos animais convencionais	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Contagem de leucócitos no sangue periférico	55
TABELA 2 - Níveis de citocinas nas feridas dos animais convencionais e convencionalizados 3 dias após a lesão.....	64

RESUMO

A microbiota comensal possui alto impacto na saúde e na doença através da modulação e desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro. As células imunes estão envolvidas em praticamente todos os aspectos do processo de reparo de feridas; entretanto, o impacto da microbiota comensal sobre a cicatrização de feridas cutâneas é amplamente desconhecido. No presente trabalho nós avaliamos a influência da microbiota comensal sobre o reparo tecidual de feridas cutâneas excisionais utilizando para isso animais germ-free (GF) *Swiss/NIH*. Nós observamos macroscopicamente que a taxa de fechamento de ferida é acelerada na ausência da microbiota comensal. Concordando com esses dados, a avaliação histológica de epitelização da ferida também foi acelerada nos animais GF em comparação com os convencionais (CV) *Swiss/NIH*. As feridas dos animais GF apresentaram uma diminuição significativa no acúmulo de neutrófilos e um aumento no infiltrado de mastócitos e macrófagos. Interessantemente, genes relacionados com macrófagos de cicatrização alternativamente ativados são altamente expressos nas feridas dos animais GF. Além disso, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, do fator de crescimento angiogênico VEGF e angiogênese foram mais altos na ferida desses animais. De maneira oposta, a cicatriz e os níveis do fator pro-fibrogênico TGF- β 1 foram bastante reduzidos após a lesão nos animais GF comparado aos animais CV. A convencionalização dos animais GF com a microbiota dos animais CV restaurou a taxa de fechamento das feridas, o acúmulo de neutrófilos e macrófagos, a produção de citocinas e a formação de cicatriz para a mesma proporção que os CV. De maneira geral, nossos dados sugerem que na ausência de qualquer contato com a microbiota comensal a cicatrização de feridas é acelerada e sem formação de cicatriz, parcialmente devido a redução do acúmulo de neutrófilos e aumento no acúmulo de macrófagos de cicatrização alternativamente ativados, bem como melhor estimulação da angiogênese no local da ferida. Entender como os comensais regulam o processo de cicatrização proporciona não apenas novas direções na fisiopatologia das feridas, mas também pode apoiar estratégias para tratamento de feridas através da manipulação da microbiota.

Palavras chave: cicatrização de feridas cutânea, animais germ-free, microbiota, inflamação, cicatriz, angiogênese

ABSTRACT

The commensal microbiota has a high impact on health and disease by modulating the development and homeostasis of host immune system. Immune cells are involved in virtually every aspect of the wound repair process; however, the impact of commensal microbiota on skin wound healing is largely unknown. Here, we evaluated the influence of commensal microbiota on tissue repair of excisional skin wounds by using germ-free (GF) *Swiss/NIH* mice. We observed that macroscopic wound closure rate is accelerated in the absence of commensal microbiota. Accordantly, histologically assessed wound epithelization was accelerated in GF in comparison with conventional (CV) *Swiss/NIH* mice. The wounds of GF mice presented a significant decrease in neutrophil accumulation and an increase in mast cell and macrophage infiltration into wounds. Interestingly, alternatively activated healing macrophage-related genes were highly expressed in wound tissue of GF mice. Moreover, levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, the angiogenic growth factor VEGF and angiogenesis were higher in the wound tissue of those mice. Conversely, scarring and levels of the pro-fibrogenic factor TGF- β 1 were greatly reduced in GF mice wounded skin when compared to CV mice. Of note, conventionalization of GF mice with CV microbiota restored wound closure rate, neutrophil and macrophage accumulation, cytokine production and scarring to the same extent as CV mice. Overall, our findings suggest that, in the absence of any contact with microbiota, skin wound healing is accelerated and scarless, partially due to reduced accumulation of neutrophils, increased accumulation of alternatively activated healing macrophages and better angiogenesis at wound sites. Understanding how commensals regulate the healing process provides not only new directions in the pathophysiology of wounds, but also could support strategies to treat wounds by manipulating microbiota.

Keywords: skin wound healing, germ-free mice, microbiota, inflammation, scar, angiogenesis

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Reparo tecidual

A capacidade de reparar uma lesão é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares, o reparo está restrito à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais (como os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares) e de moléculas de alta complexidade (como proteínas de elevada complexidade estrutural, RNAs e o DNA). Em organismos mais complexos, o reparo envolve uma vasta rede de interações entre diferentes células e moléculas. Neste caso, o reparo de lesões pode ocorrer de duas formas: (1) por regeneração, com a recomposição da morfologia e da atividade funcional normal do tecido ou (2) por cicatrização, com reestabelecimento da homeostasia do tecido, embora haja perda da atividade funcional no local da lesão pela formação de cicatriz fibrótica (Ferguson & O'Kane, 2004).

Sendo assim, caso não ocorra comprometimento das funções e células (residentes ou não) precursoras do epitélio e/ou do estroma, o tecido passará pelo processo de regeneração. Entretanto, se a ferida/lesão for muito extensa e houver comprometimento numérico e/ou funcional de tal componente regenerativo, ocorrerá o processo de cicatrização do tecido lesado (Stappenbeck & Miyoshi, 2009). Cabe ressaltar que, em mamíferos, a cicatrização é a principal forma de reparo tecidual, sendo a regeneração restrita a órgãos/tecidos como fígado e gengivas, dependendo, entretanto, da extensão da lesão (Ferguson & O'Kane, 2004).

1.1.1 Fases da cicatrização de feridas cutâneas

Define-se por ferida cutânea qualquer ruptura da integridade da pele, podendo esta apresentar diferentes profundidades, tamanhos ou formas e ser causada por razões distintas (Ferguson & O'Kane, 2004).

A cicatrização de uma ferida incide em eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstrução dos tecidos envolvidos, na tentativa de manter a estrutura anatômica e a função normal da região (Li, Chen, &

Kirsner, 2007). Para atingir esse objetivo, o processo de cicatrização envolve três fases que se sobrepõem no tempo e espaço: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (fase proliferativa) e (3) remodelamento da derme (fase de maturação) (Eming, Brachvogel, Odorisio, & Koch, 2007).

Resumidamente, após um estágio inicial inflamatório, caracterizado pela ativação de células residentes e pela infiltração de leucócitos, segue-se à formação de um tecido fibroproliferativo rico em colágeno e vasos sanguíneos neoformados, bem como a ocorrência de epitelização da região da lesão e, finalmente, a fase de maturação envolve o remodelamento da derme (Shaw & Martin, 2009). Essas fases serão descritas com mais detalhes a seguir (Figura 1).

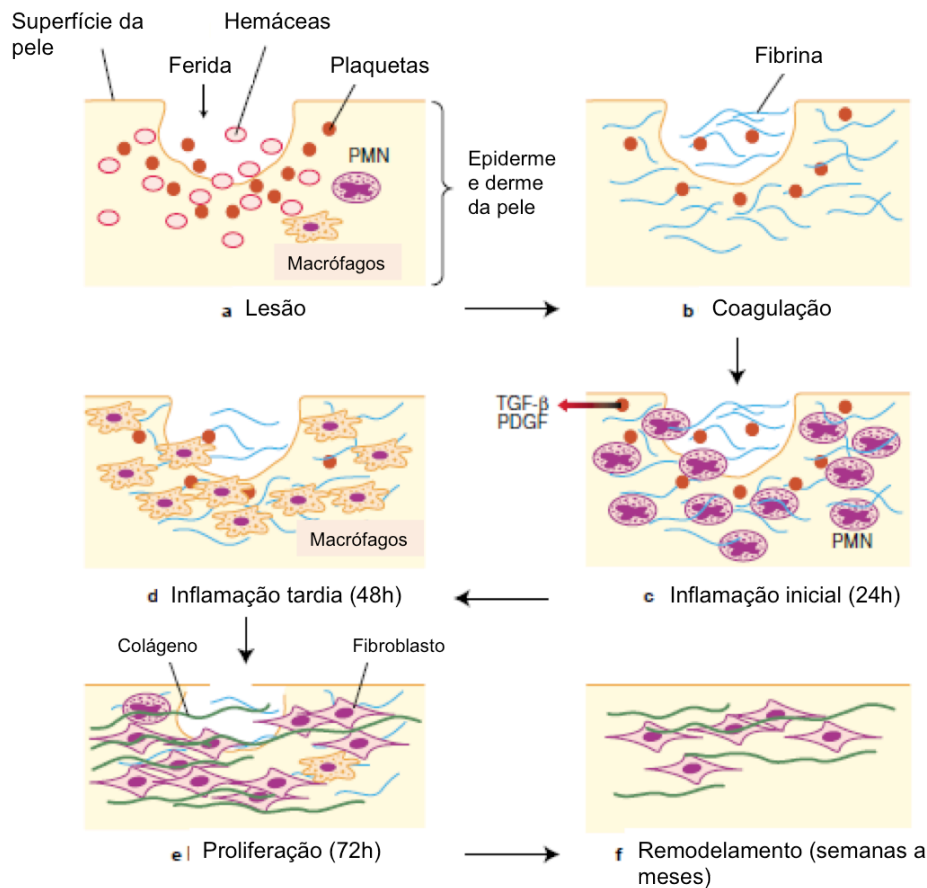


Figura 1: Fases da cicatrização de feridas cutâneas. (A) Imediatamente após a lesão na pele elementos sanguíneos e aminas vasoativas extravasam dos vasos sanguíneos da derme danificados. Permeabilidade vascular é temporariamente aumentada para permitir que neutrófilos (células polimorfonucleares - PMN), plaquetas e proteínas do plasma infiltrem na região da ferida. Em seguida acontece vasoconstrição em resposta a fatores liberados por essas células. (B) Ocorre coagulação quando as plaquetas se agregam com fibrina, a qual é depositada na ferida após sua conversão do fibrinogênio. (C) As plaquetas liberam diversos fatores, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) que atraem PMNs para ferida, sinalizando o início da inflamação. (D) 48h após a lesão, macrófagos substituem as PMNs, sendo a principal célula inflamatória presente na lesão. Esses dois tipos celulares juntos removem os restos celulares da ferida, liberando fatores de crescimento e começam a reorganizar a matriz extracelular. (E) A fase proliferativa começa por volta de 72h após a lesão com os fibroblastos, recrutados para ferida pelos fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno. (F) Apesar da taxa de síntese de colágeno diminuir após aproximadamente três semanas, a reorganização do colágeno ocorre por meses após a lesão na fase de remodelamento do reparo. Adaptado de (Beanes, Dang, Soo, & Ting, 2003).

1.1.1.1 Fase inflamatória

Devido à sua localização estratégica na interface entre o corpo e o ambiente externo, as células epiteliais (neste caso, os queratinócitos epidermais) recebem sinais do ambiente e transmitem estes para as células imunes residentes na pele. Essa comunicação é alcançada pela expressão de receptores de reconhecimento de padrões moleculares que podem se ligar a microorganismos ou a fatores de estresse ambiental, como, por exemplo, o ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas da pele e o RNA liberado de células necróticas após lesão, respectivamente (Lai et al., 2009). De fato, as citocinas produzidas pelos queratinócitos são um dos principais contribuintes para o início da inflamação na pele (Lai et al., 2009; Pasparakis, Haase, & Nestle, 2014).

Além dos queratinócitos, outras células residentes como macrófagos, mastócitos e células endoteliais são ativadas após uma lesão, culminando também com a produção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e aminas vasoativas e consequente amplificação do processo (Li et al., 2007). Por exemplo, esses mediadores químicos agem no endotélio vascular aumentando a permeabilidade vascular e induzindo a expressão de moléculas de adesão que promovem a ligação estável de neutrófilos e monócitos sanguíneos ao endotélio no local da lesão. Estas células sanguíneas efetoras (como os neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas) são atraídas para região da ferida pelas quimiocinas liberadas pelas células residentes. Além disso, os vasos lesionados, em resposta a mediadores locais, especialmente a partir da desgranulação de mastócitos, rapidamente se contraem para evitar maiores perdas de sangue (Medzhitov, 2008).

Em uma tentativa de conter a hemorragia local, ocorre também a ativação de agregação plaquetária resultando na formação de um trombo rico em plaquetas, que tampona a lesão tecidual provisoriamente (Lefkovits, Plow, & Topol, 1995). Esse trombo rico em plaquetas (trombo branco) é rapidamente infiltrado pela fibrina, sendo então chamado de trombo fibrinoso. Em seguida, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se então o trombo vermelho, responsável principal pela oclusão do vaso sanguíneo rompido (Davies, 1990). A formação desse trombo é importante também pois atua como uma matriz temporária na qual fatores quimiotáticos se ligam e permitem a migração de células da circulação e de regiões adjacentes para o tecido lesionado (Beanes et al., 2003).

As plaquetas ativadas, por sua vez, liberam importantes fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), além de quimiocinas e outras proteínas. Quando liberados, esses mediadores se difundem pela matriz provisória, e estão diretamente ligados a outras etapas do processo de reparo tecidual, como a inflamação, a angiogênese e a migração celular (Li, Zhang, & Kirsner, 2003).

Durante a fase inflamatória, a agregação plaquetária é seguida pela infiltração de leucócitos no local da ferida. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a região inflamada, atraídos pelos mediadores solúveis (como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC e CCL2/MCP-1) e auxiliados pelas moléculas de adesão das células endoteliais (como P- e E-selectinas, ICAM-1 e -2) (Beanes et al., 2003). Os neutrófilos tem como função primária a eliminação de microorganismos pela fagocitose e pela liberação de varias substâncias antimicrobianas (espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos catiônicos, eicosanoides) e proteases (elastase, proteinase 3) as quais são potencialmente lesivas para o hospedeiro quando produzidas em excesso. Além disso, essas células também estão envolvidas na remoção de restos celulares, liberando proteases e outras enzimas, além de produzirem várias citocinas que contribuem para o processo inflamatório (Eming, Krieg, & Davidson, 2007).

A menos que o estímulo para recrutamento de neutrófilos para área da ferida continue, o infiltrado de neutrófilos cessa depois de poucos dias e estas células entram em apoptose, dando início à resolução da inflamação com a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. A quimiocina CCL2/MCP-1 é quimioatraente não só para os neutrófilos mas também para os macrófagos, atuando na sua migração para o tecido inflamado (Eming, Krieg, et al., 2007). Os macrófagos auxiliam os neutrófilos em sua função primária, fagocitando os microorganismos e processando-os nos fagossomas, apresentando peptídeos pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) às células T auxiliares. Nesse contexto, a fagocitose por essas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo (DiPietro, 1995). Além disso, por influência de ligantes aos seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanoides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (como frações de complemento e fatores de

coagulação) e enzimas relacionadas ao remodelamento da matriz extracelular (como colagenases e metaloproteases de matriz) (Lucas et al., 2010; Mantovani, Biswas, Galdiero, Sica, & Locati, 2013; Pasparakis et al., 2014) . Além da ativação por ligantes, outra forma de ativação dos macrófagos é por alterações físico-químicas do microambiente. Devido ao trombo formado nos vasos que se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido. O influxo de neutrófilos e macrófagos pra essa região aumenta a demanda por oxigênio com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH (Pasparakis et al., 2014).

Essa combinação de hipóxia e pH baixo, bem como a produção de mediadores pró-resolutivos, ativa os macrófagos para a produção de fatores de crescimento que influenciarão as fases seguintes de proliferação e remodelamento do tecido em reparo (Mantovani et al., 2013; Medzhitov, 2010).

1.1.1.2 Fase proliferativa

Devido à liberação de mediadores químicos produzidos principalmente por macrófagos, a migração, a proliferação e a ativação de fibroblastos são intensificadas. Esses fibroblastos migram da região das bordas para o centro da ferida, proliferam e começam a produzir componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, levando à formação de tecido conjuntivo na região da lesão. Este processo é chamado de fibroplasia e é controlado especialmente por citocinas da família do TGF- β (Li et al., 2007).

Três isoformas do TGF- β são atualmente conhecidas nos mamíferos, o TGF- β 1, TGF- β 2 e o TGF- β 3. Apesar das diferentes isoformas atuarem através da mesma via de sinalização intracelular, elas apresentam funções distintas durante o processo de cicatrização de feridas (Finnsen, McLean, Di Guglielmo, & Philip, 2013). Trabalhos recentes têm demonstrado que o TGF- β 1 é responsável pela formação de uma cicatriz fibrosa durante o processo cicatricial, ao passo que a cicatrização de feridas cutâneas sem a formação de cicatriz observada nos fetos se deve aos altos níveis de TGF- β 3 encontrados nas feridas (Penn, Grobelaar, & Rolfe, 2012).

Para que o processo de fibroplasia seja eficiente é necessária a ocorrência, em

paralelo, da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região através da migração, proliferação e ativação de células endoteliais (Reinke & Sorg, 2012). A neovascularização é essencial neste estágio uma vez que aumenta a oferta de oxigênio para o tecido em formação e melhora a nutrição das células metabolicamente ativas. Nesse contexto, o fator de crescimento do endotélio (VEGF) é o principal fator solúvel regulador da formação de novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese (Howdieshell et al., 2001).

A fase de formação do tecido de granulação é, portanto, iniciada com a fibroplasia e é composta principalmente por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, bem como por componentes de matriz extracelular tais como fibronectina, ácido hialurônico e colágeno (Guidugli Neto, 1987). Os macrófagos são células importantes nessa fase produzindo moléculas que modulam ambos os processos de fibroplasia e angiogênese como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Essas citocinas são importantes na indução da migração de células bem como na proliferação e produção de matriz extracelular. Dessa forma, pode-se dizer que os macrófagos possuem um papel fundamental na transição entre inflamação e formação do tecido de granulação na fase proliferativa (Goren et al., 2009; Leibovich & Ross, 1975; Martinez, Sica, Mantovani, & Locati, 2008).

Os fatores de crescimento e citocinas produzidos durante a formação do tecido de granulação também influenciam na epitelização da região da ferida. Esse processo é caracterizado pela migração e proliferação de células epiteliais, os queratinócitos. Quando o tecido de granulação chega ao nível da epiderme, os queratinócitos tornam-se células hiperproliferativas e migratórias. Além disso, essas células podem secretar componentes da matriz extracelular e polipeptídeos sinalizadores (tais como metaloproteinase de matriz 1 e 9), ao mesmo tempo em que seu citoesqueleto é alterado para a produção de queratina (Li et al., 2007; Wahli, 2002). Vale ressaltar que, a própria natureza anatômica da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação de fibroblastos, bem como de células epiteliais, a partir das suas margens, fenômeno este denominado "efeitos de vizinhança livre" (Montesano & Orci, 1988).

A migração e ativação de fibroblastos, somada à formação de novos vasos sanguíneos e à epitelização da região da ferida, permitem que os componentes da nova matriz extracelular passem a ser localmente produzidos principalmente por estas células. Os fibroblastos passam a depositar inicialmente uma matriz mais frouxa composta por grandes quantidades de fibronectina que, embora seja substrato que desempenha outras funções, basicamente serve para a fixação das próprias células do tecido de granulação (Reinke & Sorg, 2012). Outra substância produzida em grande quantidade nesse estágio é o ácido hialurônico. Estas duas substâncias predominam na matriz durante as primeiras fases do reparo, propiciando um microambiente eficiente para a movimentação das células presentes na fase proliferativa. Com o avançar do processo, a produção e maturação de fibras colágenas são intensificadas, levando à formação de matriz extracelular mais densa (Longaker et al., 1991).

À medida que o leito da ferida é então preenchido com tecido de conjuntivo, a quantidade de macrófagos e fibroblastos vai sendo reduzida. Nesse momento, a ação de fibroblastos especializados, os chamados miofibroblastos, promove contração da ferida, auxiliando assim na redução da área de superfície de lesão (Li et al., 2007; Reinke & Sorg, 2012).

1.1.1.3 Fase de remodelamento

Na fase final de maturação do tecido de granulação que, inicialmente, é rico em colágeno do tipo III, ocorre a substituição deste por fibras colágenas mais espessas, denominadas do tipo I (Welch, Odland, & Clark, 1990). À medida que o processo de cicatrização vai avançando e o leito da ferida vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno do tipo I, a região da lesão assume a aparência de uma massa fibrótica, característica da cicatriz. Em paralelo, observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais (Chodorowska & Rogus-Skorupska, 2004). Interessantemente, a partir de estudos sobre a cicatrização cutânea em embriões (um modelo de reparo com pouca ou nenhuma formação de cicatriz), tem-se sugerido que a taxa de substituição de colágeno tipo III por colágeno tipo I determina a formação de cicatriz ou regeneração da derme após lesão (Li et al., 2007; Longaker et al., 1991).

A fase de remodelamento persiste por um grande tempo mesmo após o fechamento da ferida (Beanes et al., 2003). Nessa fase, que se estende para os meses seguintes à formação do tecido de granulação, a matriz extracelular sofre uma contínua e lenta transformação através de etapas sucessivas de produção, maturação, digestão e re-orientação de fibras de colágeno (Reinke & Sorg, 2012).

Ao final desta etapa, anexos da pele, como glândulas e folículos pilosos, sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz empalidece devido à deficiente regeneração dos melanócitos e à hipo-vascularização resultante do desaparecimento dos neocapilares (Johnston, 1990).

1.2. Influência do sistema imunológico no reparo tecidual

O recrutamento de leucócitos inflamatórios para uma ferida, além de ser uma aquisição evolutiva dos mamíferos para evitar a invasão de microrganismos, é também um componente crítico durante o reparo tecidual devido ao amplo espectro de mediadores liberados e a profunda influência que estes exercem sobre todas as outras células do tecido em reparo sendo, portanto, tradicionalmente considerado vantajoso para a cicatrização de feridas. No entanto, alguns estudos têm questionado a real vantagem da resposta inflamatória, sugerindo que, na verdade, a mesma dificulta o reparo tecidual (Wilgus 2008; Eming *et al.*, 2007). (Figura 2)

De fato, evidências sugerem que neutrófilos e alguns tipos de macrófagos podem, na verdade inibir a cicatrização de feridas (Martin et al., 2003). Foi demonstrado, por exemplo, que a depleção de neutrófilos acelera significativamente a re-epitelização, apesar de não alterar parâmetros do reparo dermal (Dovi, He, & DiPietro, 2003; Simpson & Ross, 1972). É sabido que o controle deficiente na ativação de neutrófilos é responsável por danos teciduais, uma vez que essas células são responsáveis pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases, capazes de destruir não apenas patógenos mas também o próprio tecido ao seu redor, influenciando de maneira negativa a cicatrização (Nauseef & Borregaard, 2014; Scapini & Cassatella, 2014).

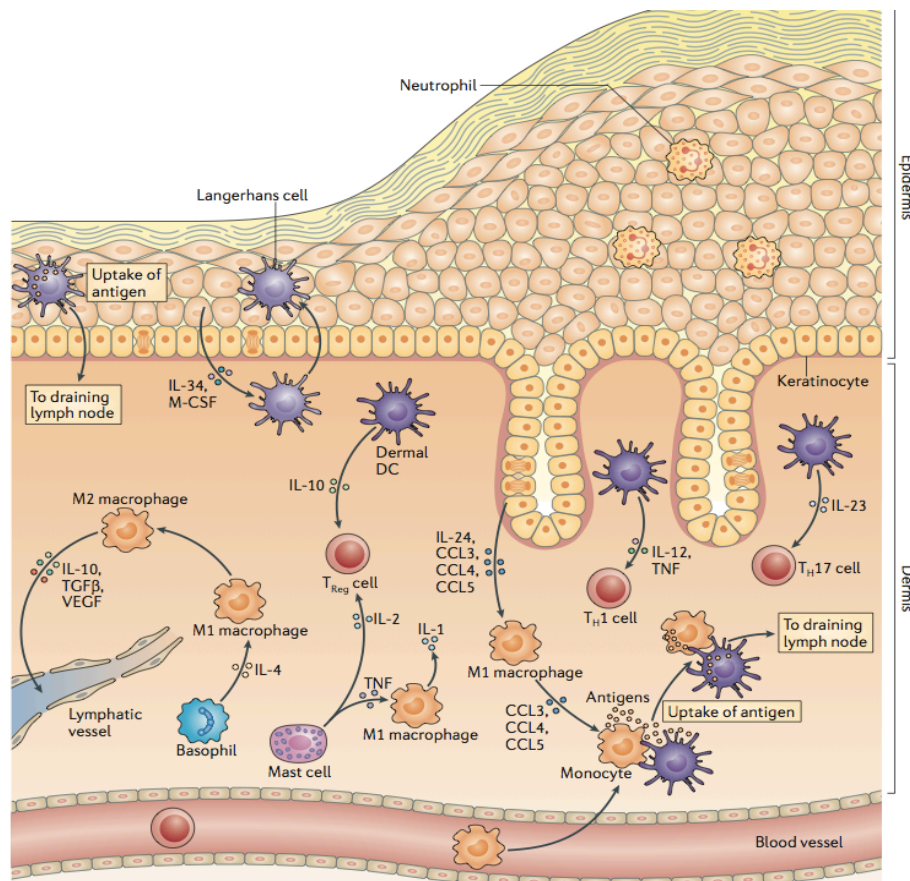


Figura 2: Células mielóides possuem atividades pró- e anti-inflamatória na pele. A pele é populada por células mielóides residentes e circulantes. Células de Langerhans migram para epiderme em resposta ao gradiente do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e interleucina 34 (IL-34) produzidos pelos queratinócitos epidermais. Monócitos migram do sangue e fazem o patrulhamento através da derme. IL-24 derivado da epiderme induz a produção de quimiocinas pelos macrófagos, as quais podem atrair monócitos para a pele. Células dendríticas (DCs) podem capturar antígenos e transportá-los para os linfonodos. Basófilos, mastócitos e DCs dermais estabelecem um balanço de mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios através da produção de citocinas que facilitam ou diminuem as respostas inflamatórias, respectivamente. IL-4 derivado dos basófilos estimulam a diferenciação de macrófagos M1 em macrófagos M2 que produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , bem como VEGF, que facilita o crescimento de vasos linfáticos para eliminação rápida do antígeno. Além disso, mastócitos e DCs dermais produzem IL-2 e IL-10, respectivamente, que facilitam a geração de células T reguladoras (Treg). De maneira oposta, mastócitos podem liberar TNF, o qual estimula a produção da interleucina pró-inflamatória IL-1 por macrófagos M1. DCs dermais apresentam antígenos para células T possibilitando sua polarização para células T auxiliaadoras 1 (Th1) ou Th17 sob a influência de citocinas como IL-12, TNF e IL-23. (Pasparakis et al., 2014).

Os macrófagos, por sua vez, parecem ter uma papel crítico no processo de reparo tecidual uma vez que apresentam diferentes subtipos os quais atuam de maneiras diferentes sobre o processo de cicatrização. Os macrófagos ativados compreendem um espectro de estados de ativação que variam de um fenótipo inflamatório clássico (M1) a um fenótipo não-clássico ou alternativo (M2), também chamados de "macrófagos de reparo", que promovem a cicatrização de feridas e angiogênese (Ferrante & Leibovich, 2012; Martinez et al., 2008). Os macrófagos classicamente ativados são caracterizados por serem ativados por interferon- γ (IFN- γ) e pelo fator de necrose tumoral (TNF), resultando em uma população de macrófagos com alta capacidade microbicida e produtora de citocinas pro-inflamatórias. Já os macrófagos alternativamente ativados são ativados principalmente por IL-4 e passam a produzir grandes quantidades da citocina anti-inflamatória IL-10, além de atuar no processo angiogênico uma vez que também são importantes fontes de VEGF, por exemplo (Lin et al., 2006; Mosser & Edwards, 2008).

Nesse contexto, um dos papéis importantes dos mediadores da inflamação, juntamente com sinais de outros tipos celulares, é o de regular a formação de novos vasos sanguíneos. Os neovasos fornecem suprimentos de oxigênio e nutrientes adequados para o tecido em cicatrização, além de facilitar o acesso de leucócitos e a remoção de material residual. Durante o reparo tecidual, a formação de um novo vaso sanguíneo pode ocorrer via ativação e recrutamento de células endoteliais (angiogênese e linfangiogênese) e/ou células progenitoras endoteliais (vasculogênese) ou, indiretamente, como resultado da ativação de leucócitos (Adams & Alitalo, 2007; Eming, Brachvogel, et al., 2007).

Interessantemente, tem sido demonstrado que embriões podem reparar feridas na ausência de resposta inflamatória e sem formação de cicatriz. Nesse caso, o reparo tecidual é acelerado e é caracterizado pela relativa escassez de leucócitos inflamatórios (Armstrong & Ferguson, 1995; Krummel et al., 1987; Stramer, Mori, & Martin, 2007) e de miofibroblastos (Cass, Sylvester, Yang, Crombleholme, & Adzick, 1997), além de apresentar maior organização da matriz extracelular, maior proporção de colágeno do tipo III em relação ao tipo I (Merkel, DiPaolo, Hallock, & Rice, 1988), altos níveis da citocina TGF- β 3 e baixos níveis das isoformas TGF- β 1 e TGF-

$\beta 2$ (Ferguson & O'Kane, 2004) e maiores níveis do fator de crescimento do endotélio vascular VEGF (Beanes et al., 2003).

A fim de se retomar a homeostasia tecidual, é essencial que haja resolução completa do processo inflamatório. De uma maneira geral, o processo de resolução ocorre via inibição do recrutamento de neutrófilos e estimulação do recrutamento de macrófagos não-flogísticos, bem como promoção da fagocitose de células apoptóticas e de microrganismos e, finalmente, remoção dos fagócitos via vasos linfáticos (Cao, Lawrence, Strickland, & Zhang, 2005; Randolph, 2008; Serhan et al., 2007). Falhas no processo de resolução da inflamação estão associadas ao estabelecimento de feridas crônicas não cicatrizantes (Menke, Ward, Witten, Bonchev, & Diegelmann, 2007; Pierce, 2001) e à formação de cicatriz excessiva e fibrose (Wynn, 2008).

1.3 Microbiota

Os micro-organismos são integrantes fundamentais na construção da Terra e tem sido essenciais na evolução da vida muito antes do surgimento dos Eucariotos. Os microorganismos vivem em comunidades bem organizadas nas diversas regiões da biosfera. A associação entre a comunidade microbiana e seu hospedeiro eucarioto tem demonstrado, atualmente, uma forte interação que vai além de uma simples relação física e que permite uma variedade de benefícios fisiológicos (Bik, 2009).

Bactérias e vertebrados tem co-evoluído há milhares de anos vivendo em relação de simbiose. Mamíferos são colonizados por microorganismos que estão presentes nas superfícies do corpo cobertas por células epiteliais e expostas ao ambiente externo tais como o trato gastrointestinal e respiratório, a vagina e a pele (Tlaskalova-Hogenova et al., 2004). Essa relação de simbiose promove diversos benefícios ao hospedeiro, como por exemplo, defesa contra a colonização de patógenos oportunistas, suplementação de nutrientes essenciais, bem como, metabolismo de composto não-digestíveis, desenvolvimento da arquitetura intestinal, e principalmente, na regulação do sistema imune. Nas últimas décadas, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de elucidar melhor essa intrínseca relação (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010; Macpherson & Harris, 2004; Marchesi & Shanahan, 2007; Salzman, 2011; Sekirov, Russell, Antunes, & Finlay, 2010).

O trato gastrointestinal, por exemplo, é constituído por uma extensa variedade de microorganismos, sendo que todo o conteúdo genético microbiano excede o complexo genoma humano, e este grande número de bactérias é 10 vezes superior ao número total de células do indivíduo humano (Turnbaugh et al., 2007). Dessa forma, alguns autores consideram a existência de um “superorganismo” dentro do organismo humano (Eberl, 2010). O conjunto de linhagens microbianas que vivem em um ambiente particular é denominado microbiota. Com relação à microbiota intestinal, cerca de 10^{14} bactérias (mais de 1000 espécies diferentes) estão distribuídas por todo o trato gastrointestinal, sendo a maior parte concentrada no intestino grosso (Gill et al., 2006).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas como a metagenômica, que identifica por meio do 16S rRNA microbiano, tem possibilitado o estudo do genoma microbiano. O projeto de elucidação do genoma da microbiota humana (microbioma) tem sido desenvolvido desde 2007 (Turnbaugh et al., 2007) e permite identificar bactérias antes não identificadas por não serem estas cultiváveis. Estima-se que o genoma da nossa microbiota ultrapasse em 100 vezes o número de nossos genes (Ley, Peterson, & Gordon, 2006).

As comunidades microbianas comensais no intestino e na pele apresentam alta diversidade no nível de espécie, porém baixa diversidade em nível de filo. Em todos os vertebrados a microbiota comensal intestinal é dominada por dois filios: os Gram-negativos Bacteroidetes e os Gram-positivos Firmicutes, compreendendo cerca de 90% dos filios presentes no intestino. Os outros 10% da população total pertencem predominantemente aos filios Proteobacteria e Actinobacteria (Gallo & Hooper, 2012; Gill et al., 2006) (Figura 3).

A microbiota da pele também é predominantemente composta por espécies dos filios Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. Entretanto, a representação proporcional desses filios difere daquela encontrada no trato gastrointestinal, sendo as Actinobacterias o filo dominante de bactérias na pele (Grice & Segre, 2011). Além disso, é importante ressaltar que existe uma variedade na composição da microbiota da pele mesmo em um mesmo indivíduo, dependendo da região do corpo avaliada (Figura 4).

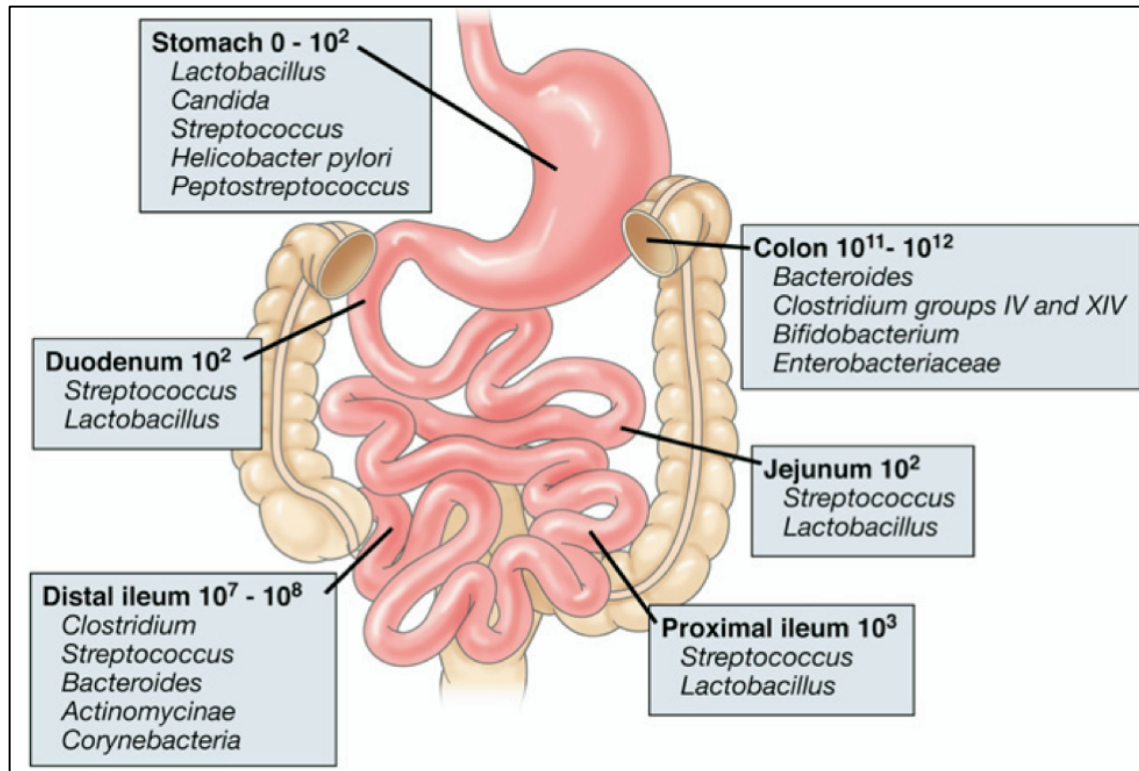


Figura 3: Composição microbiana do trato gastrointestinal (Sartor, 2008).

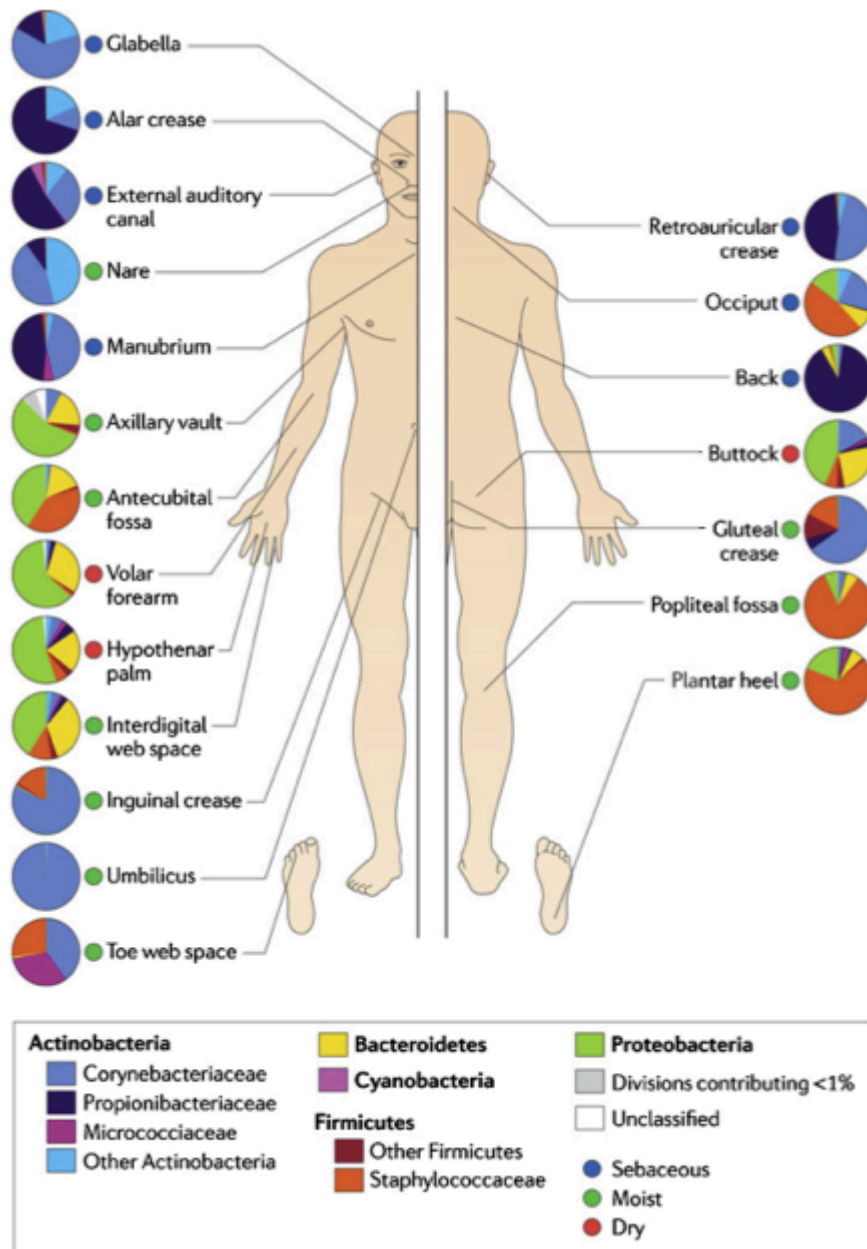


Figura 4: Diversidade da microbiota comensal da pele (Sanford & Gallo, 2013).

1.4 Microbiota e sistema imune

O sistema imune tem se desenvolvido e co-evoluído de uma maneira bem eficiente para controlar e viver com a população de microorganismos com o qual está associado. Para que exista essa relação, o hospedeiro se protege contra invasões microbianas, lesões e também a reações indesejadas contra antígenos presentes nos alimentos, enquanto os microorganismos intestinais necessitam de proteção contra

microorganismos competitivos e contra a própria resposta imune do hospedeiro (Backhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005). O epitélio participa ativamente no processo de reconhecimento da microbiota. Ele funciona como uma barreira física, impedindo a invasão dos micro-organismos mantendo a microbiota no lúmen intestinal e superfície da pele, e produzindo substâncias (peptídeos antimicrobianos, defensinas, imunoglobulina A, muco) que inibem o crescimento excessivo de bactérias indesejáveis (Chung & Kasper, 2010; Hooper & Macpherson, 2010).

Interações imunológicas-microbianas bidirecionais regulam o desenvolvimento da imunidade das mucosas e alteram a composição da microbiota, contribuindo para o bem estar geral do hospedeiro. O sistema imunológico da mucosa de crianças amadurece ao longo de vários meses após o nascimento, estando este processo intimamente ligado com o desenvolvimento e estabelecimento da microbiota intestinal, além da qualidade dos nutrientes da dieta e metabólitos produzidos pelos comensais (Jain & Walker, 2014). Exemplos desses metabólitos são os ácidos graxos de cadeia curta que são capazes de se ligar a receptores presentes na superfície de células imunes, como o receptor acoplado a proteína G GPR43, modulando a resposta inflamatória nessas células (Maslowski & Mackay, 2011). Dessa forma, a microbiota possui um papel importante na maturação e homeostase do sistema imune.

Trabalhos recentes publicados pelo nosso grupo demonstram que animais germ-free (animais isentos de microbiota comensal) apresentam alterada responsividade inflamatória e hipernociceptiva em modelos de isquemia e reperfusão intestinal (Souza et al., 2007; Souza et al., 2004), administração sistêmica de LPS (lipopolissacarídeo derivado de bactérias gram-negativas) e inflamação induzida por carragenina (Amaral et al., 2008). De acordo com esses estudos, na ausência de microbiota comensal, existe a predominância da atividade da citocina anti-inflamatória IL-10 induzida por mediadores pró-resolutivos tais como a Lipoxina-A4 e a Annexina-1, fatores estes que contribuem ativamente para um fenótipo antiinflamatório apresentado por animais germ-free (Souza et al., 2007). Têm sido demonstrado ainda que esse fenótipo observado nos animais germ-free está relacionado com a deficiência desses animais em montar uma resposta imune adaptativa devido a defeitos na imunidade inata (Chervonsky, 2010).

1.4.1 Microbiota e cicatrização de feridas

Além disso, tem-se sugerido que a influência da microbiota comensal pode ser mais ampla, indo além do desenvolvimento e homeostasia do sistema imune (tanto em nível local como sistêmico) (Smith, McCoy, & Macpherson, 2007), mas também abrangendo processos tão complexos como o metabolismo lipídico do hospedeiro e a predisposição à obesidade, o reparo tecidual e a angiogênese (Kelly, King, & Aminov, 2007; Vijay-Kumar et al., 2010). No entanto, estudos que avaliam a influência da microbiota comensal sobre a cicatrização de feridas cutâneas são bastante escassos.

Os primeiros estudos a respeito da influência da microbiota comensal sobre a cicatrização surgiram na década de 1960 e, basicamente, não encontraram diferenças entre camundongos germ-free (GF) e seus respectivos controles que apresentavam microbiota normal (animais denominados convencionais - CV) quando analisados, por histopatologia, a resposta inflamatória, as características vasculares, a produção de colágeno e a epitelização de feridas orais cirúrgicas ou decorrentes da extração dentária - revisado por (H. A. Gordon & Pesti, 1971). Por outro lado, em um estudo em ratos GF, apesar de os autores não detectarem diferença no padrão de fechamento de feridas cutâneas abertas entre animais GF e CV, foi observado que a reação inflamatória era mais intensa em animais CV (Donati, Frank, Stromberg, & McLaughlin, 1971). Além disso, foi também demonstrado que feridas incisionais de camundongos CV apresentam maior força de tensão e maior conteúdo de hidroxiprolina (Okada, 1994) e que a cicatriz de anastomoses intestinais de ratos CV apresenta maior pressão de ruptura (Okada, Bothin, Kanazawa, & Midtvedt, 1999). Recentemente, Lai *et al.* (Lai et al., 2009) demonstraram que bactérias comensais residentes na pele são capazes de inibir a resposta inflamatória cutânea, sugerindo um potencial benefício dessas para a cicatrização de feridas complicadas por inflamação excessiva.

Dessa maneira, os animais GF representam uma ferramenta valiosa para o estudo do papel da microbiota na modulação do sistema imune e conseqüentemente no processo de reparo tecidual e cicatrização de feridas.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O processo cicatricial inicia-se logo após uma lesão tecidual e tem por finalidade restaurar a integridade e função protetora da pele. Quando o processo de cicatrização de feridas ocorre de maneira inapropriada, desencadeia-se uma resposta crônica a qual pode levar ao retardo do reparo e isso representa um problema direto para o indivíduo, causando desconforto físico e/ou psicológico e demora na reabilitação, podendo até causar amputação de membros e morte por septicemia nos casos mais extremos. Portanto, existe um grande interesse no estudo dos mecanismos envolvidos no processo de reparo tecidual a fim de se determinar possíveis alvos terapêuticos.

Durante todo o processo de reparo, as células inflamatórias são claramente um componente abundante e ativo da resposta de cicatrização, participando das fases inflamatória, proliferativa e do remodelamento. Entretanto, até que ponto essas células são essenciais ou podem acabar danificando o próprio tecido ainda não é claro.

A microbiota comensal desempenha um papel importante no desenvolvimento e homeostase do sistema imune. Estudos anteriores sugerem que os animais germ-free (isentos de microbiota) parecem conseguir modular a resposta inflamatória de uma maneira diferente de um animal convencional. Essa modulação estaria correlacionada com a maturação do sistema imune proporcionada pela presença da microbiota, a qual está ausente nos animais germ-free. Sabendo da grande influência exercida pelo sistema imune sobre a cicatrização de feridas cutâneas, estes animais representam uma valiosa ferramenta de estudo para a compreensão dos mecanismos envolvidos no reparo tecidual, principalmente quando se considera a importância de uma resposta inflamatória controlada para o processo de cicatrização.

Além disso, uma vez que não se conhece quase nada sobre a cicatrização de feridas cutâneas nos animais isentos de microbiota, nós avaliamos a influência da microbiota comensal sobre o reparo tecidual de feridas cutâneas excisionais através do uso de animais germ-free.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da microbiota comensal sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais, comparando os mecanismos de reparo tecidual de camundongos isentos de microbiota comensal (germ-free) e de animais convencionais.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil temporal de fechamento e a epitelização de feridas cutâneas excisionais de camundongos germ-free e convencional;
2. Avaliar o perfil temporal do infiltrado de neutrófilos, macrófagos e mastócitos em feridas de camundongos germ-free e convencional;
3. Avaliar a angiogênese nas feridas de camundongos germ-free e convencionais;
4. Avaliar o tipo de fibras colágenas, bem como a área de cicatriz, nas feridas de camundongos germ-free e convencional;
5. Avaliar o perfil temporal da produção de mediadores inflamatórios, angiogênicos e fibróticos nas feridas de camundongos germ-free e convencionais;
6. Avaliar os efeitos da colonização de camundongos germ-free com microbiota de camundongos convencionais sobre a velocidade de fechamento das feridas, o acúmulo de neutrófilos e de macrófagos, a área de cicatriz e a produção de citocinas nas feridas dos animais convencionalizados.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas de 8-10 semanas de idade, da linhagem Swiss/NIH (Taconic, Germantown, USA). Os animais *germ-free* (GF) foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler e manuseados de acordo com técnicas clássicas de gnotobiologia (Pleasant, 1974). Esses animais receberam ração sólida e água esterilizados por calor úmido, *ad libitum*. Após a cirurgia, os camundongos foram mantidos individualmente em microisoladores no biotério do laboratório de Angiogênese e Células Tronco (LANCet). Os animais convencionais (CV) Swiss/NIH foram derivados das matrizes de GF e considerados convencionais apenas após seis gerações mantidos no biotério convencional. Os animais CV (pareados em sexo e idade) foram mantidos em biotério aberto, onde receberam a mesma ração comercial e água *ad libitum*. Após a cirurgia, os camundongos foram mantidos individualmente em microisoladores no biotério do laboratório de Angiogênese e Células Tronco. Todos os procedimentos experimentais com os animais GF foram conduzidos sob condições assépticas para evitar a contaminação dos animais. Para confirmar que os animais GF continuavam livres de germes durante o período experimental, amostras fecais desses animais foram coletadas e cultivadas em meio de cultura tioglicolato e BHI. Caso houvesse crescimento de microorganismos nesses meios, o animal não seria mais utilizado para o experimento.

O processo de colonização dos animais GF com a microbiota dos animais CV foi realizada como descrito previamente (Amaral et al., 2008). Amostras fecais foram removidas do intestino grosso de animais CV da mesma linhagem, homogeneizadas em salina (10%) e administradas nos animais GF por gavagem oral. Três semanas mais tarde esse animais foram submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais, como descrito abaixo. Para verificar se houve colonização adequada dos animais GF, amostras fecais desses animais foram cultivadas utilizando o teste do tioglicolato (Amaral et al., 2008).

Todos os procedimentos foram feitos em conformidade com as normas estabelecidas no Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Bethesda, Md, 1996), e foram realizados nas condições aprovadas pelo comitê de ética animal local, CEUA/UFMG (protocolo número 122/11).

4.2 Modelo experimental de feridas cutâneas excisionais

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) por via intraperitoneal e os pelos da região dorsal removidos com o auxílio de um barbeador. Feridas cutâneas excisionais foram criadas através do pressionamento da pele da região dorsal de camundongos GF e CV com um *punch* de biópsia circular de 5mm de diâmetro. A mensuração da área das feridas ao longo do experimento foi feita com o auxílio de um paquímetro digital para o acompanhamento da cinética de fechamento das mesmas, utilizando-se a seguinte fórmula para determinação da área de uma elipse: $[(\text{diâmetro maior}/2) \times (\text{diâmetro menor}/2) \times \text{Pi}]$, 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 fórmula: $[1 - (\text{área da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$. não foram observados sinais de infecção na região das feridas (Maeda et al., 2011). Para as análises histológicas, bioquímicas e moleculares, as feridas e a pele do contorno foram coletadas com o auxílio de um *punch* de biópsia circular de 8mm de diâmetro nos dias de eutanásia (Figura 5).

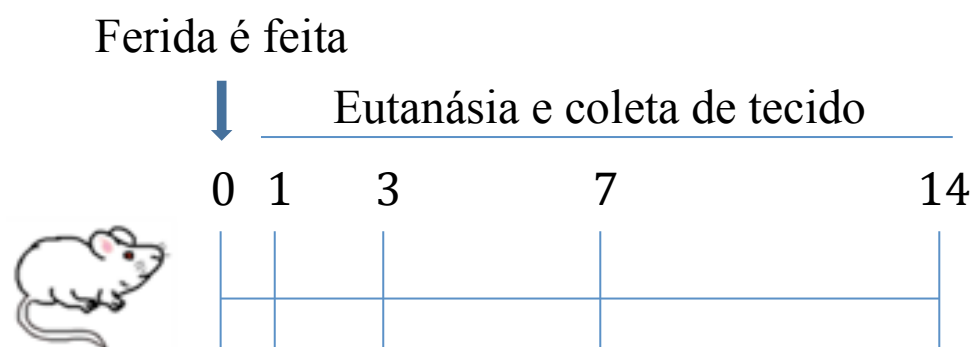


Figura 5: Delineamento experimental. Pele dos animais de todos os grupos foram coletadas para utilização como controle (basal) da pele intacta.

4.3 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos aleatoriamente (n=7-9) entre os seguintes grupos experimentais:

Animais GF submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais eutanasiados nos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia
Animais CV submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais eutanasiados nos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia
Animais GF CVZ submetidos ao modelo de feridas cutâneas excisionais eutanasiados nos dias 1, 3, 7 e 14 após a cirurgia

4.4 Quantificação do infiltrado de neutrófilos na região da ferida

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nas feridas foi mensurada pelo ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos (Souza et al., 2002). 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 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 4°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 dimetilsulfóxido (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi parada com H₂SO₄ e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa, de acordo com curva padrão do número de neutrófilos versus OD que foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (>95% pureza) e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase, padronização que havia sido realizada anteriormente no laboratório (Souza et al., 2002).

4.5 Quantificação do infiltrado de macrófagos na região da ferida

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 (Vieira et al., 2009). 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 μL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH=4,5), concentração final de 2,24 mM, a 100 μL 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 100μL de tampão glicina 0,2 M (pH=10,6) e quantificada em

espectrofotômetro a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado a partir de curva padrão da atividade de NAG, expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, mediante injeção de solução de tioglicolato de sódio a 3%. O lavado peritoneal foi realizado após tempo máximo de quatro dias pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama de tecido (Vieira et al., 2009).

4.6 Análise da produção de mediadores solúveis

Concentrações das citocinas: IL-10, VEGF, total TGF- β 1, TNF- α , e da quimiocina CXCL1/KC foram mensuradas na região da ferida utilizando-se anticorpos adquiridos do fabricante R&D Systems (Minneapolis, USA) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para dosagem de citocinas/quimiocinas, amostras de ferida foram homogeneizadas em solução de extração de citocinas, contendo 0.4M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1mM Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), 0.1mM benzethoniumchloride, 10mM EDTA e 20 KI aprotinina, na proporção de 100mg de tecido para cada mL de solução; foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - *Fischer Scientific Pennsylvania*, USA). A suspensão foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então utilizado para o ensaio enzimático, ELISA.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de solução dos respectivos anticorpos monoclonal anti-camundongo para quimiocinas/citocinas a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após quatro lavagens (400 μ L/poço - Bio-Tek Instruments, INC) com PBS-Tween 20 (0,05% - pH=7,4); adicionou-se às placas 200 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 100 μ L/poço dos padrões (500-1000 pg/mL) e das amostras diluídas (1:3) em BSA-PBS (0,1% - pH=7,4) e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight*. Após lavagem das placas, adicionou-se 100 μ L/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 100µL/poço de solução de estreptavidina (50µL de estreptavidina em 10mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo foi adicionado 100µL/poço o substrato 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 50µL/poço de H₂SO₄ 1M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

4.7 Contagem total e diferencial de células do sangue

Foram coletados 5 µl de sangue da veia da cauda dos camundongos anestesiados e diluídos em 45 µl de solução de Turk. A contagem de células totais foi realizada em Câmara de Neubauer. Além disso, lâminas de esfregaço sanguíneo foram preparadas e coradas com *Panótico Rápido* (Laborclin®, Brasil). A porcentagem de monócitos e neutrófilos foi determinada utilizando critérios morfológicos padrão (Vieira et al., 2009).

4.8 Quantificação da expressão de mRNA através de qPCR em tempo real

Os animais foram eutanasiados com uma super dose de anestésico. As feridas e a pele do contorno foram removidas com o auxílio de um punch circular de 8mm e cortadas perpendicularmente em duas metades. Uma metade foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido para estudos biológicos moleculares e a outra metade foi fixada em formalina (4% em salina isotônica) e processada para análises histológicas. Para determinar a expressão de genes associados a ativação de macrófagos inflamatórios (também chamados de M1) ou alternativos (também chamados de M2), as amostras de pele foram homogeneizadas em 750 µL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando-se um homogeneizador de tecidos elétrico (Biosystems). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 min, a uma temperatura de 15o a 30o C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200µl de Clorofórmio (MERCK), para cada 750µL de TRIZOL. Foi realizada agitação em vortex e depois incubação por 3min a 15o-30oC. A amostra homogeneizada foi centrifugada a

12.000g, por 15 min, a 2- 8⁰C. Após centrifugação, o homogenato ficou separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior (contendo o RNA). O RNA foi então transferido para um microtubo novo e foi precipitado com isopropanol (MERCK), 500µl de isopropanol para cada 750 µl de TRIZOL. As amostras foram incubadas por 10 min a 15-30°C e então centrifugadas a 12.000g por 10 min a 2-8°C. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 750µl de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC) para 750 µl de TRIZOL. O tubo foi agitado no vortex, para o desprendimento do precipitado. Então, foi feita nova centrifugação a 7.500g por 5 min a 2-8°C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do sedimento que foi, em seguida, diluído em água milli-Q, em volume suficiente para diluir toda a amostra.

A quantificação das amostras de RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano DropTechnologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água ultrapurificada (MilliQ, Millipore) e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água Milli-Q. O RNA foi quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2µl da amostra pura. A concentração foi fornecida em ng/µL e a pureza do RNA foi avaliada pela correlação 260/280(RNA/proteínas). O RNA foi estocado a -70°C.

A transcrição reversa do RNA total foi feita com o SuperScript III (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. Em um microtubo foi adicionado 2,0 µg de RNA, 50µM do primer Oligo dT(15). Foi feita uma incubação por 5 minutos a 70°C para permitir o anelamento do primer e em seguida, por 5 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes para uma concentração final de 0.5 mM de cada dNTPs, 1X do tampão, 5U da enzima Transcriptase reversa, 3.0 mM de MgCl₂, 20 unidades de RNasin e água Milli-Q autoclavada para um volume final de reação de 20µL. A mistura foi incubada por 1 hora e meia, a 42°C, quando ocorrerá a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C.

Para as reações subseqüentes de amplificação, 1µl da amostra de cDNA foi utilizada. A PCR foi realizada em um volume final de 10µl contendo 5µL de Power SYBRGreen PCR Master Mix 2X (Applied biosystems), 1,0µl de primer sense a

5 μ M, 1,0 μ l de primer anti-sense a 5 μ M e 2 μ l de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto, a 95°C e, em seguida, 15 segundos, a 95°C para desnaturação, 1minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos são repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de melting: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA,EUA). Os dados foram analisados utilizando-se a seguinte fórmula: $\Delta\Delta C_t$ = o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do C_t (cycle threshold - é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescencia exceda o limiar) do grupo controle. Em que ΔC_t = C_t do gene alvo – C_t do gene constitutivo do camundongo (18S).

Todas as reações foram replicadas. Os primers usados foram:

NOS2 forward: AGC ACT TTG GGT GAC CAC CAG GA

reverse: AGC TAA GTA TTA GAG CGG CGG CA

IFN- γ forward: ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT

reverse: TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA

FIZZ-1 forward: ACC TTT CCT GAG ATT CTG CCC

reverse: CAG TGG TCC AGT CAA CGA GTA AGC

DECTIN-1 forward: GGA ATC CTG TGC TTT GTG GTA GTA G

reverse: GGA AGG CAA GAC TGA GAA AAA CCT C

MRC-1 forward: TCT TTT ACG AGA AGT TGG GGT CAG

reverse: ATC ATT CCG TTC ACC AGA GGG

ARG-1 forward: TGA CAT CAA CAC TCC CCT GAC AAC

reverse: GCC TTT TCT TCC TTC CCA GCA G

18S forward: CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG

reverse: CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC

4.9 Avaliações histológicas

A coleta das amostras foi feita como descrito acima. Após um tempo mínimo de 24 horas de fixação em formalina (4% em salina isotônica), as amostras foram submetidas às etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia (5 µm – micrótomo (OLYMPUS, Alemanha) e as fatias de tecido foram coradas com Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma) ou Azul de Toluidina e analisados em microscópio óptico (Olympus BX43 com a câmera Olympus Q-color 5). Fatias de tecido também foram coradas com Picro-Sirius para quantificação de colágenos e analisados sob luz polarizada. Análises morfométricas foram realizadas em imagens digitais utilizando o programa ImageProPlus 7.0.

A extensão da epitelização (que compreende a distância que o novo epitélio tinha prolongado a partir da margem da ferida, definida pela presença de folículos pilosos de pele não ferida, também conhecida como língua epitelial - ver Figura 6) e a tamanho do tecido cicatricial (compreende a área a partir da junção dermo-epidérmica até o panículo carnosos e das bordas da ferida - delineada usando a ferramenta "contorno de forma livre" no ImageProPlus 7.0 para produzir uma medição baseada em pixels, em seguida, convertida em micrômetros quadrados) foi determinada em lâminas coradas com H&E. O número de mastócitos foi determinado através da contagem dessas células na área do tecido ferido em lâminas coradas com Azul de Toluidina. A organização e maturação das fibras colágenas foi avaliado em lâminas coradas com Picro-Sirius Red.

Para avaliação da formação de novos vasos capilares, indicando angiogênese, foi feita a contagem do número de capilares na região da ferida. Os resultados foram expressos como número de vasos por mm² de tecido analisado. Todas as análises

histomorfométricas foram realizados sem conhecimento prévio dos grupos que estavam sendo analisados ("forma cega").

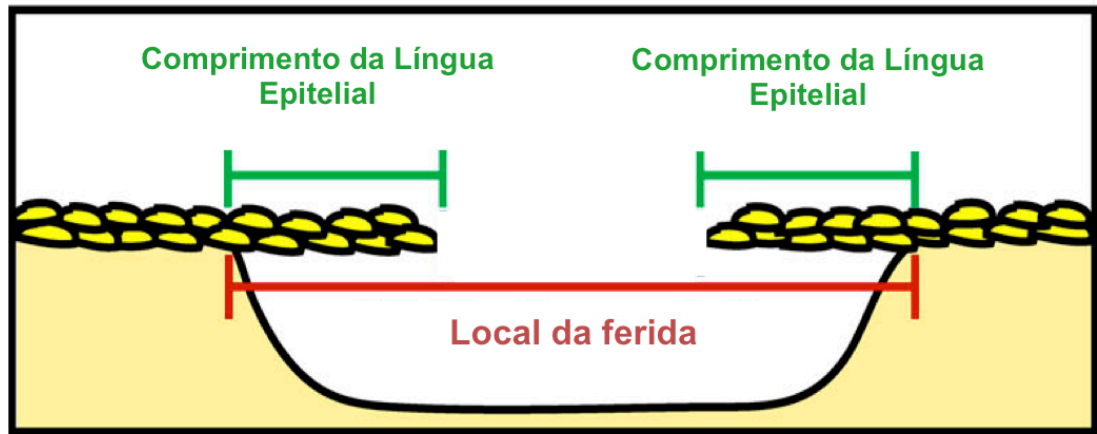


Figura 6: Esquema ilustrativo da medida de Língua epitelial (em verde) (Mori, Shaw, & Martin, 2008).

4.10 Análises estatísticas

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. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 O fechamento de feridas cutâneas excisionais é acelerado nos camundongos germ-free

Com o objetivo de avaliar se a ausência da microbiota comensal possui algum impacto sobre o processo de fechamento da ferida após uma lesão da pele excisional, nós acompanhamos a taxa de fechamento das feridas macroscopicamente. Os animais CV e GF apresentaram feridas com tamanho semelhante nos dias 1 e 3 após a lesão. Porém, os animais GF exibiram um aumento significativo na porcentagem de fechamento de feridas a partir do 5^o dia até o 14^o dia pós-ferimento quando comparados com animais CV ($p < 0,001$) (Figura 7A).

Esses resultados macroscópicos foram confirmados através da avaliação histológica de epitelização no dia 7 após a lesão. Resultados da avaliação das lâminas contendo cortes histológicos das feridas corados com hematoxilina-eosina (H&E) mostraram que a língua epitelial (um indicativo da extensão da migração do novo epitélio a partir da margem da ferida) é significativamente maior nos animais GF em comparação com os animais CV controles ($p < 0,001$) (Figura 7B e C). Estes resultados indicam que o aumento da epitelização contribuiu para o fechamento de feridas acelerado dos camundongos GF.

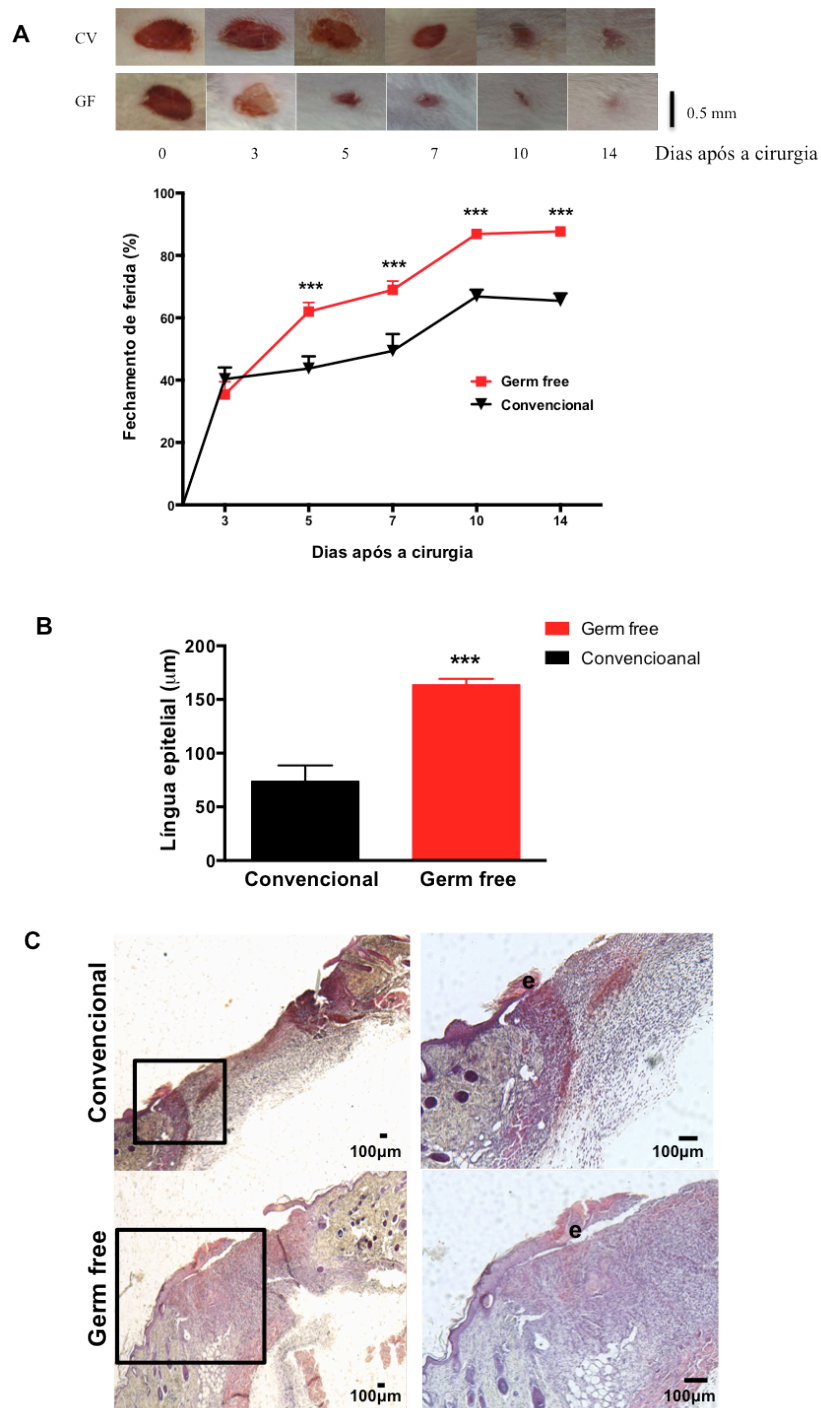


Figura 7: Cicatrização de feridas é acelerada nos animais germ-free. (A) Cinética de fechamento de feridas nos animais GF e CV. (B) Comprimento da língua epitelial no dia 7 após a cirurgia. (C) Fotomicrografias representativas de seções coradas em H&E evidenciando a língua epitelial (quadrados). Os resultados da taxa de fechamento da ferida foram expressos em porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n=7-9 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. ***p<0,001. e=epitélio.

5.2 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios em feridas cutâneas de animais convencionais e germ-free

Todas as etapas do processo de cicatrização de feridas são controladas por uma variedade de citocinas. Observou-se um aumento nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α após a lesão nas feridas dos animais CV e GF. Entretanto, apesar da quantidade de TNF- α nas feridas dos animais CV retornarem aos níveis basais depois de 1 dia de lesão, nos animais GF esses níveis são mantidos altos até o dia 3 ($p < 0,05$) (8A). De forma interessante, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 foram encontrados já mais altos na pele sem ferida dos animais GF quando comparados com os animais CV, permanecendo significativamente altos até o dia 3 após a lesão ($p < 0,05$ para todos os grupos) (Figura 8B). Nas feridas dos animais CV, similarmente à cinética de produção do TNF- α , os níveis de IL-10 retornam aos níveis basais após seu pico de produção no dia 1 após o ferimento. Os níveis de CXCL1/KC, quimioatraente para neutrófilos, não apresentou nenhuma diferença entre os grupos (Figura 8C). Estes resultados sugerem que os camundongos GF são capazes de responder prontamente a lesão da pele através do aumento dos níveis de mediadores da inflamação.

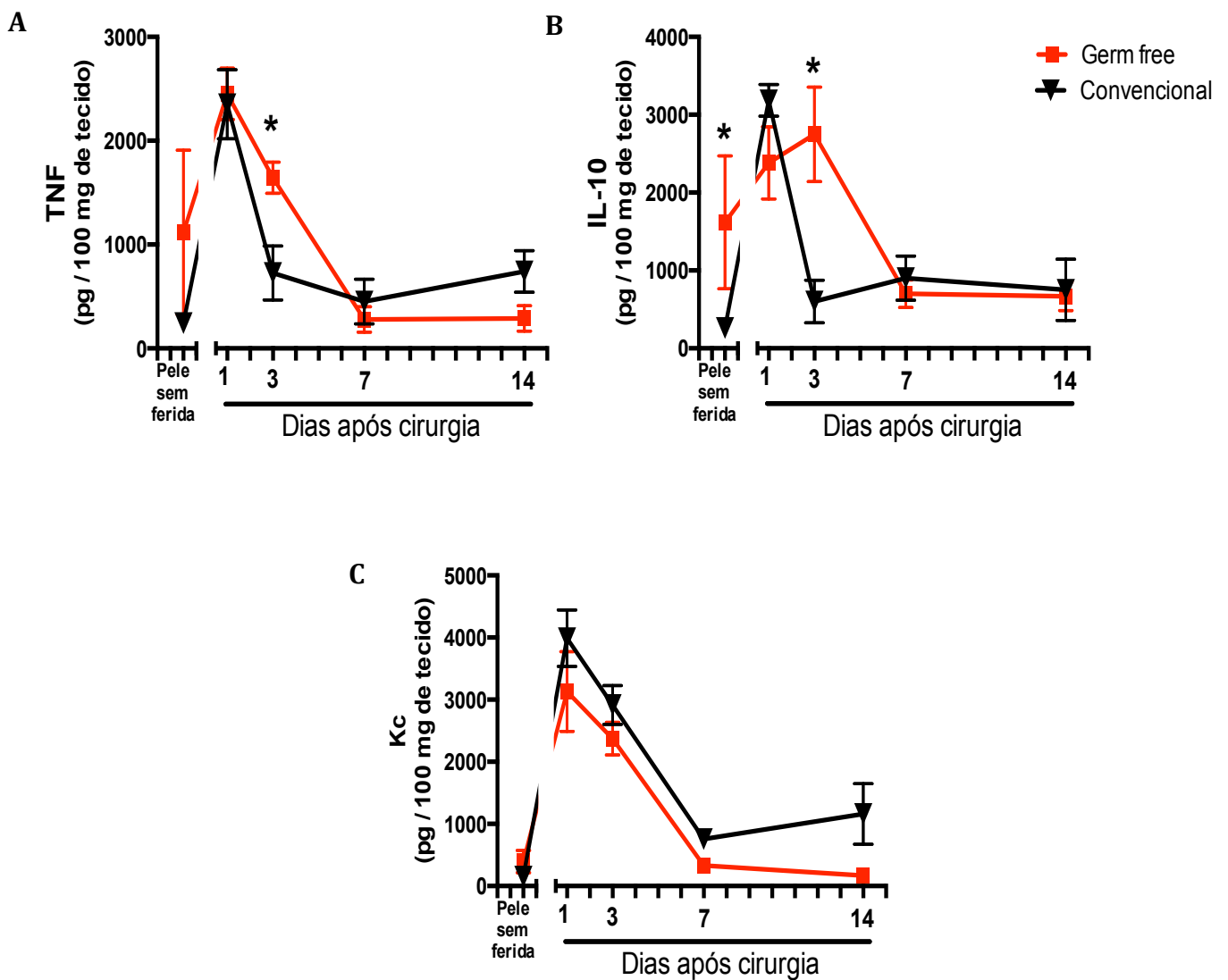


Figura 8: Cinética de produção de citocinas nas feridas dos animais germ-free e convencionais durante a cicatrização de feridas cutâneas. Perfil de produção de (A) TNF- α , (B) IL-10 e (C) CXCL1/KC nas feridas dos animais GF e CV em diferentes tempos após a cirurgia. Os níveis das citocinas foram mensurados por ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n=7-9 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. *p<0,05.

5.3 O perfil de leucócitos nas feridas dos camundongos germ-free é alterado

Os neutrófilos, macrófagos e mastócitos, são conhecidos por serem rapidamente recrutados para a área da ferida (Eming, Brachvogel, et al., 2007). Para avaliar o acúmulo de neutrófilos e macrófagos nas feridas, foram feitos ensaios bioquímicos baseados na atividade de MPO e NAG, sendo MPO a enzima mais abundante nos neutrófilos e NAG expresso em grandes quantidades pelos macrófagos ativados. Ambos têm demonstrado ser marcadores úteis e confiáveis para neutrófilos e macrófagos, respectivamente, em ambientes inflamatórios como a cicatrização de feridas (Barcelos et al., 2004; Barcelos et al., 2005). Foi observado que o acúmulo de neutrófilos foi atrasado e em uma magnitude menor nas feridas dos animais GF quando comparados com os CV controles (Figura 9A). Enquanto o acúmulo de neutrófilos nas feridas dos animais CV atinge o seu pico no dia 1 após a lesão, esse pico só acontece no dia 3 nos animais GF. No dia 7, a atividade de MPO no leito da ferida já retornou aos níveis da pele basal nos dois grupos. Como mostrado na Figura 9A, no dia 1 após a lesão o acúmulo de neutrófilos nas feridas dos animais GF foi significativamente reduzido comparado aos animais CV ($p < 0,001$).

Em relação ao conteúdo de macrófagos nas feridas dos animais GF, este alcançou o seu pico no dia 1 após a lesão, exibindo níveis significativamente mais altos da atividade de NAG quando comparado às feridas dos animais CV ($p < 0,01$) (Figura 9B). Além disso, o conteúdo de macrófagos nas feridas dos animais GF permaneceram altos até o dia 3 após a lesão ($p < 0,05$) comparado com os animais CV, os quais apresentaram aumento nos níveis de macrófagos mais tardiamente, apenas no dia 7 após a injúria. Esses dados sugerem que, ao contrario dos neutrófilos, o acúmulo dos macrófagos na ferida dos animais GF acontece mais cedo e em níveis mais elevados do que acontece nos camundongos CV. A Figura 10 ilustra a predominância de neutrófilos nas feridas dos animais CV e a predominância de células mononucleares nas feridas dos animais GF no dia 1 após a lesão.

De forma interessante, quando nós avaliamos o número de células circulantes no sangue periférico (Tabela 1), nós observamos que os animais GF sem ferida apresentam cerca de 80% menos neutrófilos no sangue periférico do que os animais CV ($p < 0,0001$). Após o ferimento, existe um aumento gradual no número de neutrófilos no sangue dos animais GF, embora seja mantido em níveis inferiores

quando comparado aos CV. De maneira similar, nós observamos que os animais GF sem ferida apresentam cerca de 60% menos monócitos no sangue periférico do que os animais CV ($p=0,0002$). Entretanto, 24 horas após a lesão, enquanto o número de monócitos no sangue caiu para os níveis mais baixos nos animais CV, este tipo de células manteve-se praticamente inalterado nos GF, apresentando uma quantidade 6 vezes maior de monócitos no sangue do que os camundongos CV ($p<0,0003$).

Para quantificar o número de mastócitos na região das feridas nós utilizamos a coloração histológica por azul de toluidina. Da mesma maneira que os macrófagos, o número de mastócitos na pele dos animais GF sem ferida já é maior do que na pele dos animais CV também sem ferida. Após o ferimento, o número de mastócitos no leito da ferida aumentou significativamente e atingiu os níveis mais altos no dia 1 após a lesão em ambos os grupos. Interessantemente, enquanto o número de mastócitos diminuiu significativamente depois do dia 1 pós-lesão nos camundongos CV, o número dessas células permaneceram altos nas feridas dos animais GF durante todo o período experimental (Figura 9C).

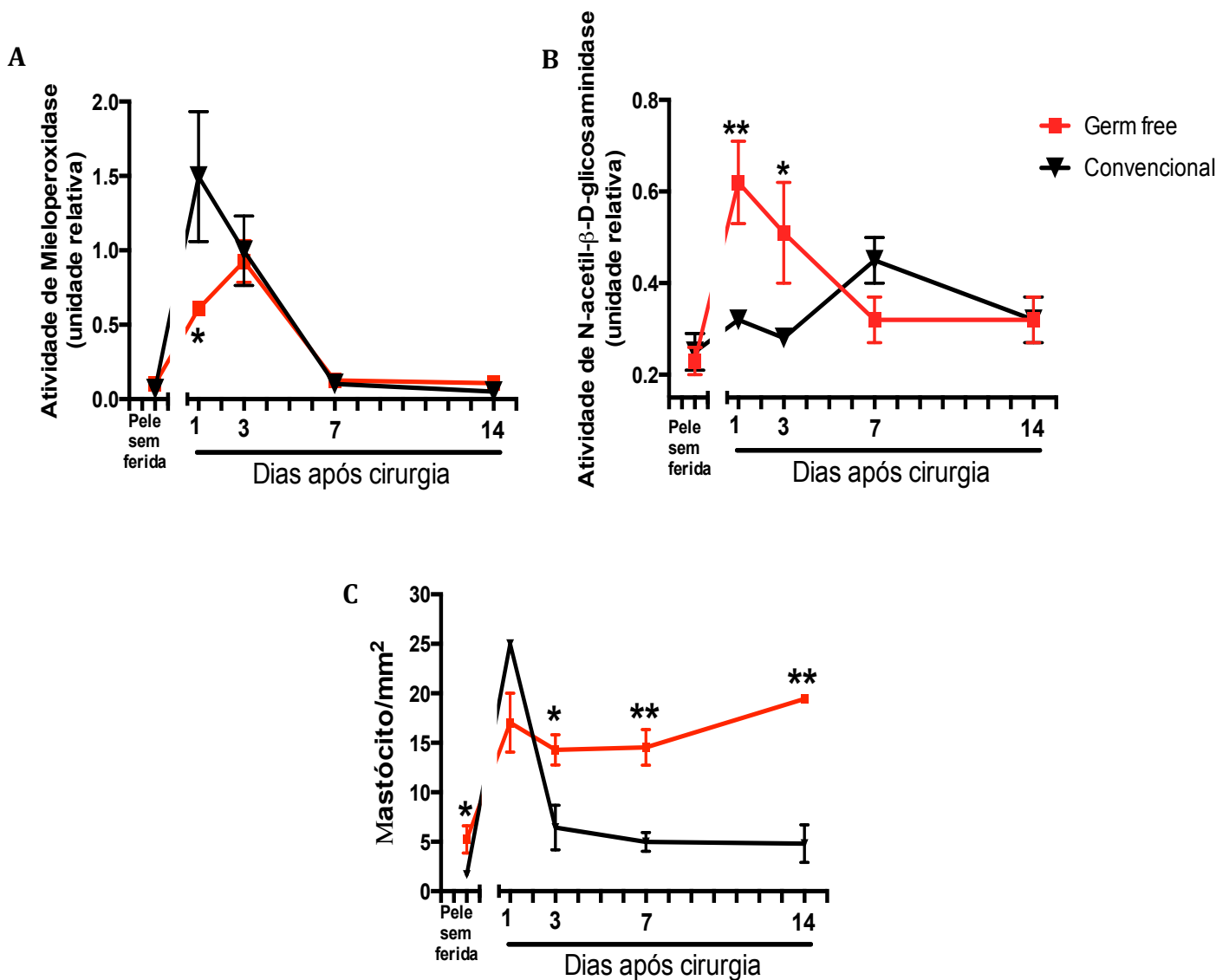


Figura 9: Cinética de acúmulo de leucócitos nas feridas cutâneas excisionais dos animais germ-free e convencionais. Acúmulo de (A) neutrófilos e (B) macrófagos nas feridas foi feito através da avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase, respectivamente. (C) Mastócitos foram quantificados através de contagem cega em seções de tecido coradas com azul de toluidina. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n=7-9 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

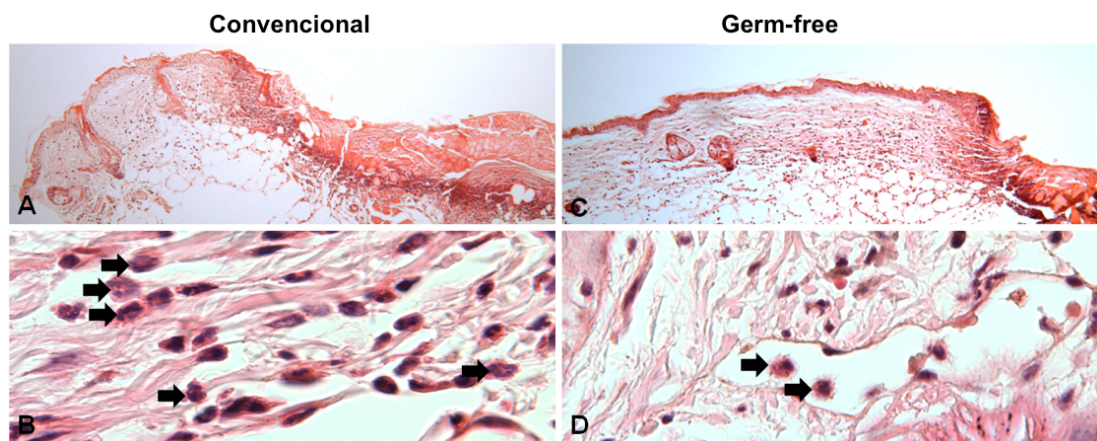


Figura 10: Fotomicrografias representativas de seções da ferida de animais CV e GF 1 dia após a lesão. Fotomicrografias representativas de seções da ferida de animais CV (painel da esquerda) e GF (painel da direita) 1 dia após a lesão coradas em H&E. Animais CV apresentaram um infiltrado inflamatório de células na derme, predominantemente de neutrófilos (setas). Os animais GF exibiram um acúmulo de células mononucleares e alguns neutrófilos na derme (setas). (A) e (C) aumento de 4x, (B) e (D) aumento de 100x.

Tabela 1: Contagem de leucócitos no sangue periférico.

Grupos	Número total de leucócitos (número de células por mm ³ de sangue)		Monócitos (número de células por mm ³ de sangue)		Neutrófilos (número de células por mm ³ de sangue)	
	CV	GF	CV	GF	CV	GF
Dia 0	160±15	74±9 (***)	12±1	5±1 (***)	53±8	8±2 (***)
Dia 1	50±10	72±5	1±0.1	7±1 (***)	6±1	11±2
Dia 3	228±14	95±11 (***)	18±2	9±1 (***)	64±7	18±3 (***)
Dia 7	162±20	136±20	11±2	10±2	43±6	35±7
Dia 14	114±14	70±6 (*)	7±2	5±0.1	54±15	12±3

(***) ≠ CV p<0.001 (*) ≠ CV p<0.05

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m., n=5-7 camundongos por cada grupo e tempo avaliado.

5.4 Genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados são altamente expressos nas feridas dos animais germ-free

Nosso próximo passo então foi avaliar qual subtipo de macrófago poderia estar atuando nas feridas dos animais GF e CV. Para caracterizar fenotipicamente os macrófagos infiltrados no tecido da ferida, nós analisamos as feridas para expressão de mRNA de genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados (Dectina-1, receptor 1 para manose, Fizz-1 e arginase-1) e para genes relacionados com macrófagos classicamente ativados (IFN- γ e iNOS). Observou-se que os genes relacionados a macrófagos alternativamente ativados de cicatrização foram altamente expressos nas feridas dos animais GF nos dias 3 e 7 após a lesão quando comparados aos animais CV. De maneira oposta, genes relacionados com macrófagos classicamente ativados, com excessão do iNOS, estavam menos expressos nos animais GF e altamente expressos nos animais CV nos dias 3 e 7 após a lesão (Figura 11).

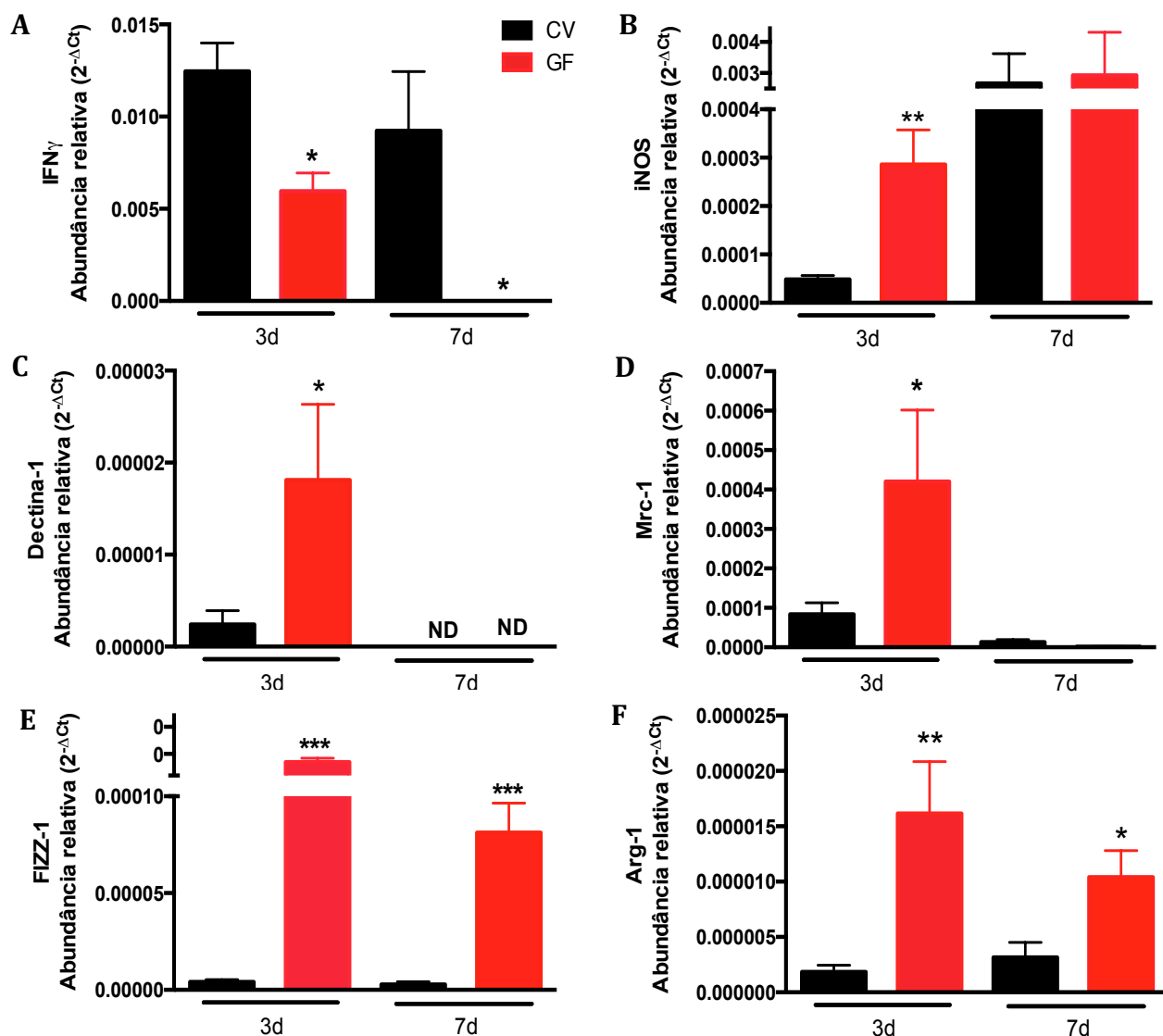


Figura 11: Genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados são altamente expressos nas feridas dos animais germ-free. Expressão dos mRNAs (A) IFN- γ , (B) iNOS, (C) Dectina-1, (D) Mrc-1, (E) Fizz-1 e (F) Arginase-1 nas feridas dos animais GF e CV foi avaliada por qPCR. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n=4-5 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

5.5 Angiogênese é aumentada na ferida dos camundongos germ-free

A cinética da formação de novos vasos sanguíneos, ou angiogênese, na ferida dos animais GF e CV foi analisada através da avaliação da densidade de capilares em cortes histológicos corados com H&E. No dia 3 após a lesão a densidade de capilares nas feridas dos animais GF estava significativamente aumentada quando comparada aos camundongos CV ($p < 0,001$). Estes níveis se mantiveram altos nos GF durante todo o período experimental (Figura 12A e C). Os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um importante fator de crescimento angiogênico, foi mensurado por ELISA. Em concordância com os dados de angiogênese, os níveis de VEGF estavam significativamente aumentados na pele sem ferida e no dia 3 após a lesão nos camundongos GF comparados com os animais CV ($p < 0,05$ para todos os grupos) (Figura 12B).

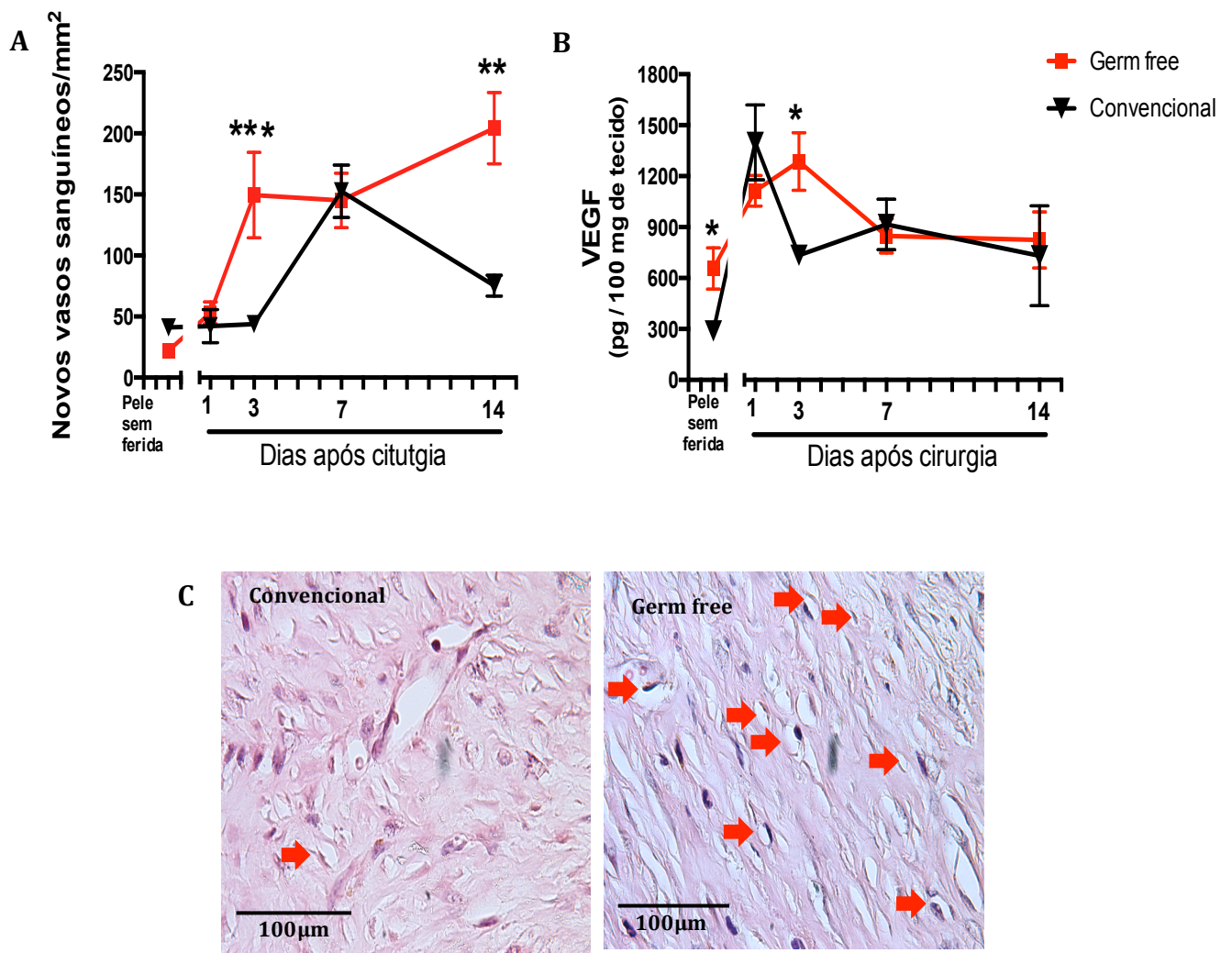


Figura 12: Angiogênese na região das feridas é aumentada nos animais germ-free. (A) Densidade de vasos sanguíneos e (B) níveis de VEGF nas feridas de camundongos GF e CV. (C) Fotomicrografias representativas de seções coradas em H&E 3 dias após a cirurgia evidenciando os vasos sanguíneos (setas). A densidade dos vasos sanguíneos foi avaliada por contagem cega em seções de tecido corados em H&E e está representado como números de vasos por mm² de tecido de granulação. Os níveis de VEGF foram mensurados por ELISA. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m., n=7 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

5.6 Deposição de colágeno e formação de cicatriz é alterada nas feridas dos camundongos germ-free

Na fase de remodelamento do novo tecido a dimensão e alinhamento da deposição de colágeno durante a cicatrização de feridas dérmicas pode determinar a gravidade da formação do tecido cicatricial e, conseqüentemente, a perda de função comparado ao tecido original. Nós avaliamos então a deposição de colágeno na região da ferida 14 dias após a lesão através da coloração de cortes histológicos por Picro-Sirius red. Os níveis das fibras colágenas mais largas (tipo I), vistas corados em tons de laranja a vermelho brilhante, foram similares nos camundongos GF e CV. Entretanto, os níveis das fibras colágenas mais finas (tipo III), vistas coradas em verde, foram significativamente maiores nas feridas dos animais GF comparadas aos CV (Figura 13A, C e D). Os níveis do TGF- β 1 total, uma citocina pro-fibrigênica, foram significativamente maiores nas feridas dos animais CV quando comparados aos GF ($p < 0,01$ no dia 3 e $p < 0,05$ no dia 7) (Figura 13B). Interessantemente, a área do tecido cicatricial foi significativamente maior nos camundongos CV quando comparados aos GF (Figura 13E, F e G).

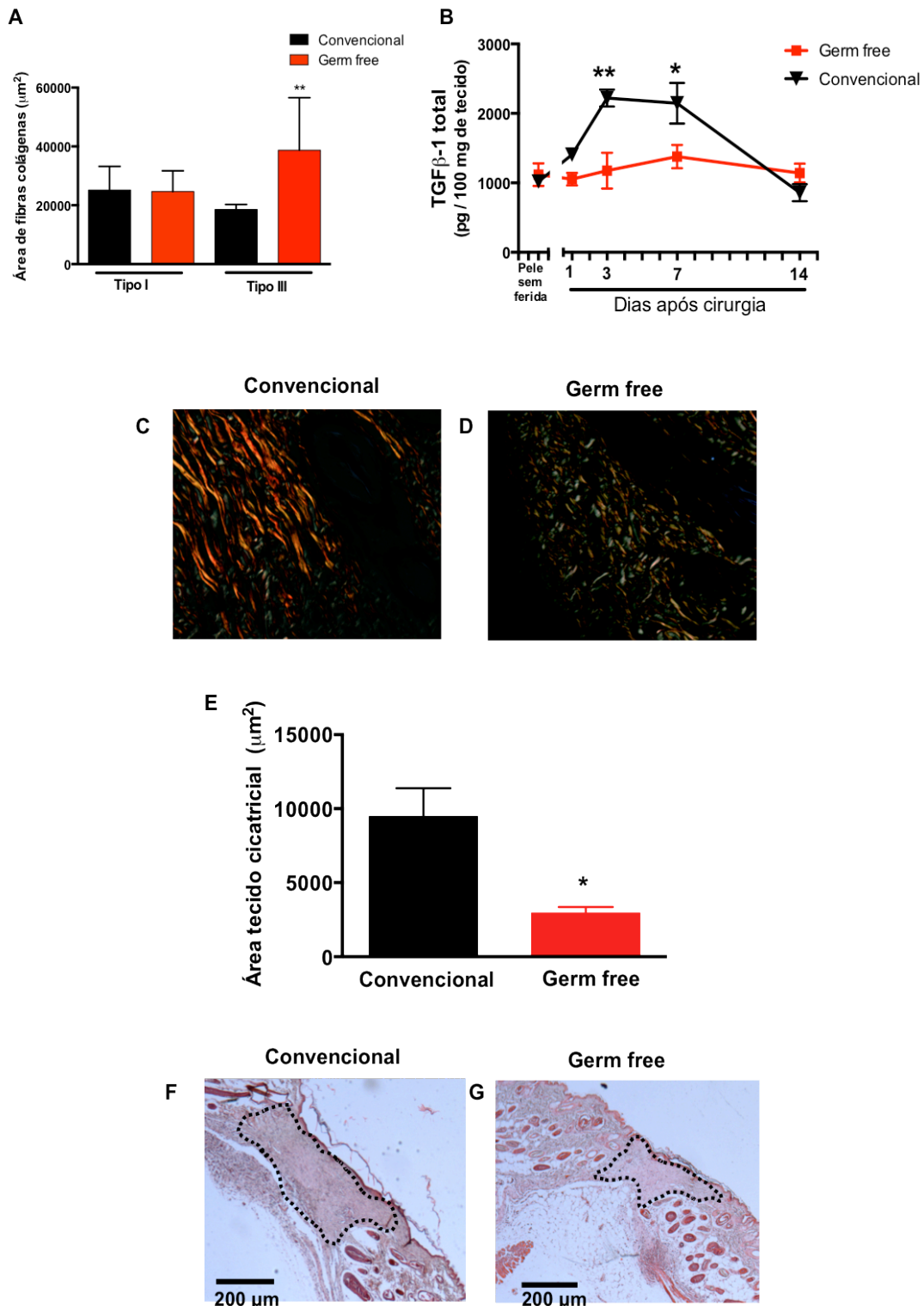


Figura 13: Deposição de colágeno na pele ferida e formação de cicatriz nos animais germ-free e convencionais. (A) Área da ferida ocupada por colágeno tipo I e tipo III. (B) Níveis de TGF-β1 total foram avaliados por ELISA. (C, D) Fotomicrografias representativas do tecido de granulação 14 dias após a lesão coradas com Picosirius e observadas sob luz polarizada. (E) Área de tecido cicatricial 14 dias após a lesão. (F, G) Fotomicrografias representativas de seções coradas em H&E 14 dias após a cirurgia evidenciando tecido cicatricial (área de linha pontilhada). Os resultados foram apresentados como média ± e.p.m., n=5-7 camundongos por cada grupo e tempo avaliado. *p<0,05 e **p<0,01.

5.7 Animais germ-free colonizados restauram o fenótipo observado nos animais convencionais

Com o intuito de demonstrar que todas as alterações observadas nos animais GF eram devido á ausência da microbiota comensal, camundongos GF foram colonizados com as fezes dos animais CV por 21 dias. Após esse período, feridas excisionais foram criadas nos animais convencionalizados (CVZ), seguindo o modelo descrito neste trabalho, sua área foi mensurada e a região da ferida foi coletada para análises. Interessantemente, nós observamos que os animais CVZ restauram o fenótipo de fechamento de feridas dos animais CV (Figura 14A). Corroborando com os dados de fechamento de ferida, os níveis de neutrófilos e macrófagos acumulados na região da ferida após a lesão foi similar nos animais CV e CVZ (Figura 14B e C).

Os níveis das citocinas TNF- α e IL-10 se mostraram diferentes entre os animais GF e CV principalmente no dia 3 após a lesão. Sendo assim, nós comparamos os níveis dessas citocinas nos animais CVZ e CV no dia 3 após a cirurgia a fim de confirmar se a colonização dos animais GF com a microbiota comensal afetaria também a produção de citocinas. Conforme o esperado os níveis de TNF- α , IL-10 e CXCL1/KC nos animais CVZ retornaram aos mesmos níveis dos animais CV (Tabela 2). Além disso, sendo a formação de um grande tecido cicatricial um evento indesejado quando se trata de reparo tecidual, nós observamos que a colonização com a microbiota induziu a formação de cicatriz 14 dias após a lesão nos animais CVZ com área semelhante á observada nos animais CV (Figura 14D, F e G). Esses resultados sugerem que o fenótipo de cicatrização de feridas acelerado observado na pele dos animais GF é, de fato, devido á ausência da microbiota comensal.

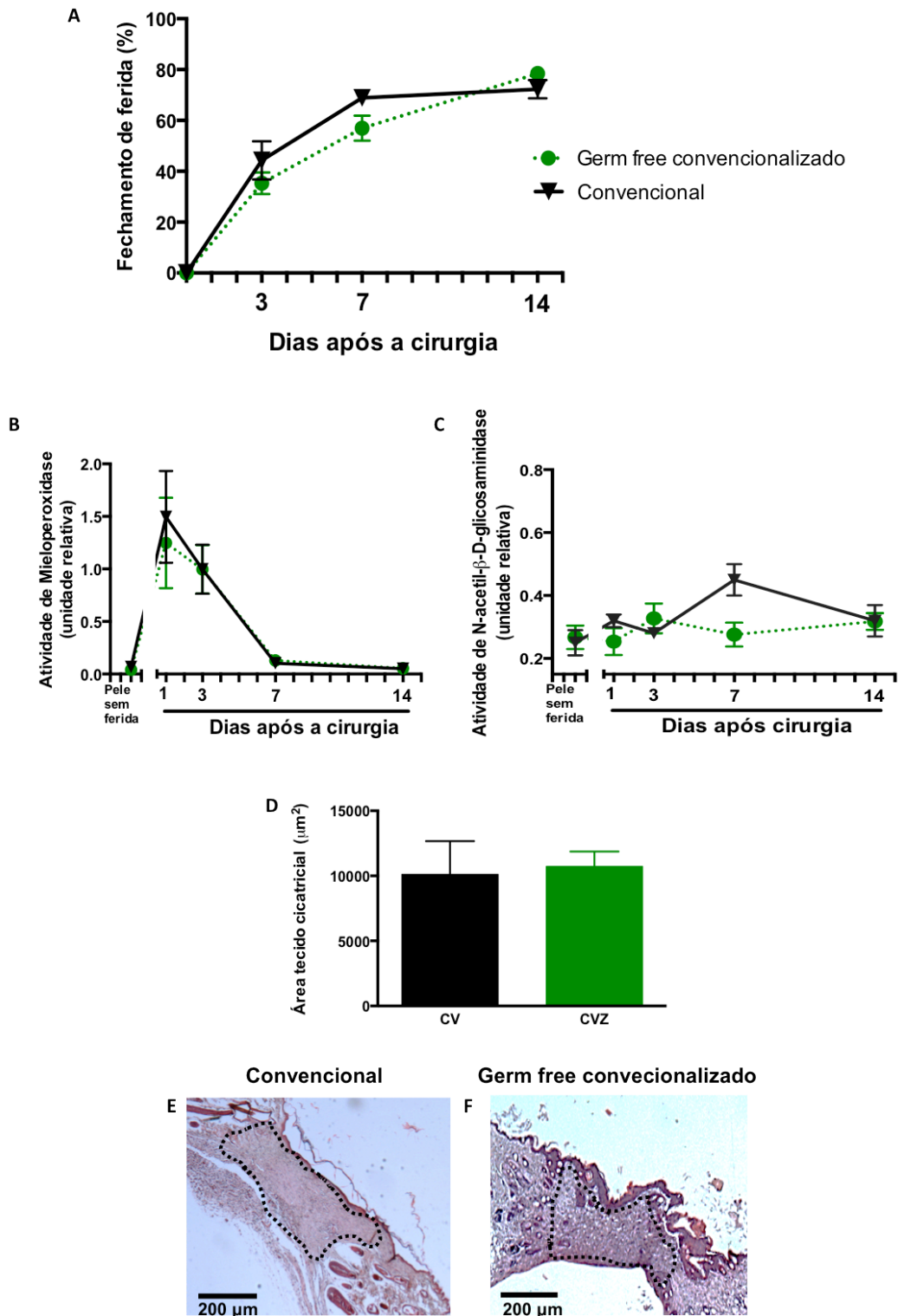


Figura 14 Animais germ-free colonizados restauram o fenótipo dos animais convencionais. (A) Recomposição da microbiota nos animais GF 21 dias antes da lesão, referido como convencionalização, restauram o fenótipo de fechamento de feridas dos animais CV. Níveis de (B) neutrófilos e (C) macrófagos acumulados na região da ferida após a lesão nos animais CV e CVZ. (D) Área de tecido cicatricial 14 dias após a lesão. (E, F) Fotomicrografias representativas de seções coradas em H&E 14 dias após a cirurgia evidenciando tecido cicatricial (área de linha pontilhada). Os resultados foram apresentados como média ± e.p.m., n=5-7 camundongos por cada grupo e tempo avaliado.

Tabela 2: Níveis de citocinas nas feridas dos animais convencionais e convencionalizados 3 dias após a lesão.

Dia 3	CV	CVZ
TNF-α (pg/100 mg de tecido)	725 \pm 261	975 \pm 218
IL-10 (pg/100 mg de tecido)	602 \pm 273	855 \pm 188
CXCL1/KC (pg/100 mg de tecido)	2913 \pm 314	3327 \pm 499

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Tecidos de superfície como a pele e o trato intestinal estão continuamente expostos a um grande número de microrganismos, a maioria dos quais são inofensivos ou benéficos para o hospedeiro. Apesar de existir um aumento considerável de trabalhos avaliando a diversidade das comunidades microbianas do intestino e da pele em situações de saúde e doença (Gallo & Hooper, 2012) e o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e modulação do sistema imune (Maslowski & Mackay, 2011), a influência da microbiota na cicatrização de feridas cutâneas é amplamente desconhecido. Dessa forma, o presente trabalho teve o intuito de avaliar o impacto da microbiota na epitelização, inflamação, angiogênese e formação de cicatriz após lesão excisional na pele através de um estudo comparativo entre camundongos GF e CV.

Nos mamíferos adultos, a cicatrização de feridas é um processo altamente dinâmico que envolve uma complexa sequência de eventos celulares e bioquímicos que se sobrepõem entre si e vão desde uma resposta imediata à lesão das células da pele e invasão de sinais microbianos até respostas inflamatórias e angiogênicas culminando com fibroplasia da ferida e formação de tecido cicatricial (Shaw & Martin, 2009). Sinais endógenos de dano (DAMPs) e sinais microbianos (PAMPs) ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como, por exemplo, os receptores do tipo Toll (TLR) nos leucócitos, ativando então resposta antimicrobiana e cascata de sinalização inflamatória (Muzio, Polentarutti, Bosisio, Manoj Kumar, & Mantovani, 2000). De forma interessante, (Lai et al., 2009) demonstraram que a microbiota comensal residente na pele é capaz de modular uma resposta inflamatória local após uma lesão. Foi demonstrado que o ácido lipotecóico (LTA) produzido por *Staphylococcus epidermidis*, um componente da microbiota comensal da pele, é capaz de inibir a liberação de citocinas inflamatórias por queratinócitos, bem como inibir a inflamação iniciada por uma lesão de maneira dependente de TLR2 derivado do epitélio. No caso dos animais GF, a única possibilidade de estimulação da resposta cicatricial logo após a lesão da pele são os sinais de dano da estrutura da pele, uma vez que esses animais são isentos de microbiota e todo o processo acontece em condições estéreis. Dessa forma, pode-se dizer que a resposta à lesão da pele nos animais GF é ativada por padrões moleculares associados a dano derivados do hospedeiro e pela ativação de células residentes perturbadas.

Os neutrófilos são uma das primeiras células imunes recrutadas para o local da lesão. A principal função dessas células é proteger o hospedeiro de infecções combatendo microrganismos invasores e fagocitando restos celulares. Entretanto, neutrófilos ativados secretam uma série de substâncias bioativas, como proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais em excesso, devido a carga microbiana, por exemplo, podem levar a danos teciduais graves (Wilgus, 2008). De fato, (Dovi et al., 2003) demonstraram que neutropenia induzida por soro anti-neutrófilos acelera a taxa de fechamento da ferida sem alterar a qualidade global do processo de cicatrização cutânea em camundongos. No presente trabalho, além do fechamento epitelial acelerado, foi observado conteúdo de neutrófilos reduzido 24 horas após a lesão nas feridas dos animais GF, apesar dos níveis de CXCL1, uma quimiocina importante para o recrutamento de neutrófilos, serem produzidos na mesmas quantidades que os animais CV em resposta a lesão. Portanto, nossos dados são consistentes com a ideia de que a redução do infiltrado neutrofilico no local da ferida correlaciona com o fechamento de ferida mais acelerado. Mecanicamente, os nossos dados sugerem que o atraso no infiltrado de neutrófilos após a lesão nos camundongos GF pode ser, em parte, devido a neutropenia nesses animais antes da lesão, e não devido a produção local reduzida de quimioatraentes relacionados com neutrófilos uma vez que a produção de CXCL1 foi similar em animais GF e CV. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade dos neutrófilos dos camundongos GF serem hiporesponsivos aos quimioatraentes (Braund, Hook, & Medlicott, 2007).

Juntamente com o influxo de neutrófilos em resposta a danos ou micróbios, os monócitos circulantes penetram na região da ferida e se diferenciam em macrófagos maduros. O papel dos macrófagos na condução de um reparo tecidual bem sucedido tem sido um assunto de ampla discussão. Alguns estudos debatem que a resposta inflamatória pode servir à função de prevenir infecção em detrimento de um reparo fibrótico e com formação de cicatriz. Isso tem sido observado em embriões e em camundongos deficientes na expressão do fator de transcrição PU.1 (*PU.1 null mice*), que regula a diferenciação de células mielóides; esses animais cicatrizam sem inflamação nem formação de cicatriz excessiva desde que a linhagem de monócitos ainda não tenha se estabelecido (Cowin, Brosnan, Holmes, & Ferguson, 1998; Hopkinson-Woolley, Hughes, Gordon, & Martin, 1994; Martin et al., 2003). No entanto, a ativação adequada de macrófagos parece ser essencial para o reparo da pele

uma vez que a depleção destas células resulta em perturbações graves do processo de cicatrização, prejudicando a angiogênese e a deposição de colágeno (DiPietro, Burdick, Low, Kunkel, & Strieter, 1998; Goren et al., 2009; Leibovich & Ross, 1975). Neste trabalho, ao contrário do reduzido infiltrado de neutrófilos, foi observado um aumento significativo no infiltrado de macrófagos nas feridas dos animais GF quando comparado aos animais CV, corroborando o papel benéfico dos macrófagos de ferida no reparo da pele.

Uma das características dos macrófagos é a sua capacidade de se tornar ativado em resposta a sinais de perigo endógenos e exógenos aumentando a inflamação. De forma contrária, com a eventual eliminação do insulto, essas células contribuem também para a resolução da resposta inflamatória (Zhang & Mosser, 2008). De fato, os macrófagos são uma população de células diversa e dinâmica que podem executar uma grande variedade de funções críticas na cicatrização de feridas. Os macrófagos ativados compreendem um espectro de estados de ativação que variam de um fenótipo inflamatório clássico (M1) a um fenótipo não-clássico ou alternativo (M2), também chamados de "macrófagos de reparo", que promovem a cicatrização de feridas e angiogênese (Ferrante & Leibovich, 2012; Martinez et al., 2008; Mosser & Edwards, 2008). Interessantemente, os genes relacionados com macrófagos alternativamente ativados foram altamente expresso no tecido da ferida de camundongos GF, o que sugere a presença predominante deste fenótipo de macrófago na ausência de microbiota. Entretanto, é relevante salientar que os genes relacionados com macrófagos classicamente ativados também foram expressos nas feridas dos animais GF, mostrando a importância dos dois subtipos de macrófagos no processo de reparo tecidual, exercendo funções diferentes.

Além disso, foi observado altos níveis de IL-10 nas feridas dos animais GF. IL-10 é uma citocina reguladora com funções fundamentais no controle de inflamação e danos nos tecidos, atuando na diminuição da resposta inflamatória a uma lesão, mas também criando um ambiente favorável à diferenciação de macrófagos M2 reguladores e ao reparo do tipo regenerativo (Peranteau et al., 2008). Evidências têm demonstrado que IL-10 pode ser responsável pelo reparo sem a formação de cicatriz observado na pele de embriões (Liechty, Kim, Adzick, & Crombleholme, 2000). De maneira global, isso poderia adicionalmente explicar a cicatrização de feridas

acelerada e sem cicatriz nos animais GF, bem como a expressão predominante dos genes relacionados a macrófagos com fenótipo M2 nas feridas desses animais. É importante salientar que embora níveis elevados de IL-10 possam diminuir a inflamação, esse processo ainda acontece nos animais GF uma vez que podemos observar níveis elevados da citocina pró-inflamatória TNF- α , além da presença predominante de macrófagos e mastócitos no leito da ferida. Estes dados sugerem um processo inflamatório controlado em animais GF, levando a um processo de cicatrização de feridas bem sucedido.

Mastócitos são capazes de liberar uma variedade de mediadores solúveis, porém pouco se sabe sobre eles comparado com o que sabemos sobre outras células inflamatórias. Embora tradicionalmente vistas como células efetoras de reações alérgicas e doenças parasitárias, um importante papel dos mastócitos na homeostase tecidual e na cicatrização de feridas tem sido descrito (Galli & Tsai, 2008; Oskeritzian, 2012; Weller, Foitzik, Paus, Syska, & Maurer, 2006). No presente trabalho foi observado um infiltrado elevado e sustentado de mastócitos nas feridas dos animais GF durante todo o período experimental, em contraste com um pico transiente de mastócitos observado 24 horas após a lesão nas feridas dos camundongos CV. Por um lado, esse tipo de célula inflamatória parece desempenhar um papel importante na fase de proliferação, onde a angiogênese é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido nascente. Similarmente aos macrófagos M2, os mastócitos liberam fatores de crescimento angiogênico como, por exemplo, o VEGF, bem como metaloproteinases que preparam o tecido circundante para a angiogênese durante o reparo da pele (Ng, 2010). Além disso, os mastócitos são capazes de liberar grandes quantidades de IL-4, que é um dos fatores estimulantes da diferenciação de macrófagos para o perfil M2 (Gessner, Mohrs, & Mohrs, 2005; S. Gordon, 2003). De fato, o alto conteúdo de macrófagos M2 e mastócitos sugere fortemente uma conexão com os altos níveis de VEGF e o alto número de capilares nas feridas dos animais GF. Por outro lado, os mastócitos podem limitar a reação inflamatória da pele através da produção de IL-10 (Grimbaldeston, Nakae, Kalesnikoff, Tsai, & Galli, 2007) que, além de ser uma citocina relacionada à diferenciação de macrófagos para o perfil M2, pode regular negativamente a expressão do receptor de IgE Fc ϵ RI presente nos mastócitos, auxiliando assim na proteção contra sensibilização alérgica na pele (Kennedy Norton et al., 2008). No

entanto, a verdadeira fonte de IL-10 e VEGF durante a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos GF ainda precisa de ser elucidada.

Além de inflamação e angiogênese, os macrófagos e os mastócitos também são capazes de regular a fibroplasia no local das feridas, por exemplo, através da produção de TGF- β 1, um importante fator de crescimento pro-fibrogênico (Braund et al., 2007). TGF- β 1 é um mediador pluripotente crucial no reparo tecidual, podendo modular o influxo e ativação de células inflamatórias bem como a deposição de colágeno. Neste cenário, animais deficientes na via do TGF- β 1 apresentam cicatrização de feridas cutâneas acelerada devido a uma redução no infiltrado de leucócitos (Eming, Krieg, et al., 2007). Interessantemente, animais GF apresentaram níveis mais baixos de TGF- β 1 na região da ferida, o que diretamente correlaciona com o reduzido influxo de neutrófilos e formação de cicatriz na pele lesionada desses animais em comparação com os animais CV.

A presença de colágeno proporciona uma resistência à tração a pele. Entretanto, após a lesão, a formação de um tecido fibroso de cicatriz é o resultado fisiológico previsível da cicatrização de feridas em mamíferos adultos. Tem sido demonstrado que a deposição de diferentes subtipos de colágeno pode prever a futura formação de cicatriz. De fato, a pele de embriões, um modelo experimental de reparo tecidual sem formação de cicatriz, é conhecida por conter uma maior proporção de colágeno do tipo III em comparação ao colágeno de tipo I, sendo essa deposição de colágeno diferencial durante a cicatrização da pele fetal acreditada por contribuir para a cicatrização de feridas sem formação de cicatriz (Merkel et al., 1988). De maneira interessante, nós observamos neste trabalho que as feridas dos animais GF apresentam uma maior proporção de colágeno do tipo III, assim como uma área pequena de tecido cicatricial.

Finalmente, com o intuito de demonstrar que as alterações observadas nos animais GF após a lesão excisional na pele foram de fato devido à ausência da microbiota comensal, animais GF foram colonizados a partir da gavagem com suspensão de fezes de animais CV. Foi observado que os animais GF colonizados, denominados animais convencionalizados (CVZ), restauram o fenótipo dos animais CV uma vez que a taxa de fechamento das feridas desses dois grupos foi similar, bem como o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, a produção de citocinas e a

formação do tecido cicatricial.

Uma consideração viável decorrente do presente estudo é de que, na ausência da microbiota, a cicatrização de feridas cutâneas acontece sem formação de cicatriz e é composta basicamente por um mosaico de mecanismos intrínsecos de percepção e reação ao dano somado à ativação de um sistema imune "imaturo" e não primado por microrganismos (Fagundes et al., 2012; Ferrante & Leibovich, 2012; Souza et al., 2007). Nesse sentido, um paralelo pode ser traçado com a cicatrização de feridas cutâneas em embriões que ocorre em condições estéreis no útero, isto é, na ausência da microbiota. Feridas cutâneas excisionais de ambos, animais GF adultos e embriões, compartilham propriedades como reduzido conteúdo de neutrófilos, níveis altos de produção de IL-10 e VEGF e baixos de TGF- β 1, bem como uma matriz extracelular rica em colágeno tipo III e mínima formação de cicatriz após lesão da pele (Lo, Zimmermann, Nauta, Longaker, & Lorenz, 2012). Essa observação sugere uma recapitulação dos aspectos do fenótipo fetal regenerativo na pele pós-natal dos animais que nunca tiveram nenhum contato com a microbiota comensal. Desse ponto de vista, pode-se especular que o contato progressivo e dinâmico com a microbiota é um elo fundamental para a formação de cicatriz no processo de cicatrização de feridas em adultos. Possivelmente, a aquisição da habilidade de lidar com a infecção no local da ferida compense a maior formação de cicatrizes em condições não estéreis usuais. Entretanto, mais estudos são necessários para entender melhor o potencial fibrótico e os mecanismos de retardo da cicatrização influenciados pela da microbiota na pele.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação hospedeiro/micro-organismo tem grande relevância sobre diversos aspectos, principalmente em relação a patogêneses desencadeadas por micro-organismos invasores. Por outro lado, a íntima relação entre os micro-organismos que convivem simbioticamente com seu hospedeiro é de fundamental importância para a sobrevivência de ambos mediante as adversidades externas (Casadevall & Pirofski, 2003). Entretanto, a idéia de que a microbiota é indispensável no que diz respeito à habilidade do hospedeiro em produzir mediadores inflamatórios, tornando-o adaptado, não somente para o controle da eliminação de patógenos, mas também para responder a vários estímulos danosos ao organismo (Fagundes et al., 2012; Souza et al., 2004) como, por exemplo, uma lesão profunda da pele, parece não ser completamente real. Foi demonstrado nesse trabalho que os animais GF são capazes de responder a danos teciduais, montando uma resposta inflamatória mais eficiente e controlada durante reparo tecidual de feridas cutâneas excisionais.

Considerando que a resposta inflamatória é um processo imunológico essencial ao indivíduo, indo muito além do combate aos patógenos, como a manutenção da homeostase do organismo, as respostas inflamatórias exacerbadas e não controladas levam a um aumento da intensidade e duração da resposta, originando dano tecidual e desencadeando várias doenças. Assim, demonstramos neste trabalho a importância de uma resposta inflamatória tempo limitada e controlada, no qual os mecanismos pró-inflamatórios passam a ser inibidos e os mecanismos de resolução da resposta passam a ser ativados, diminuindo, dessa forma, a duração da resposta inflamatória, bem como a lesão tecidual. Nós concluímos neste trabalho que a microbiota comensal possui um papel importante na modulação do processo de cicatrização de feridas cutâneas. Estratégias terapêuticas que visam tratar feridas através da manipulação da microbiota surgem como uma nova alternativa para um problema ainda sem solução eficaz.

Mecanismos que visem controlar a resposta inflamatória, sejam estes através da manipulação da microbiota ou não, e que atuem principalmente no recrutamento de neutrófilos, na diferenciação de subtipos de macrófagos e na indução de angiogênese são essenciais para que ocorra um reparo tecidual eficiente com consequente

regeneração do tecido. Com este trabalho podemos entender um pouco mais sobre a imunofisiologia de feridas cutâneas e a influência que a microbiota comensal possui sobre esse processo.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o reparo de feridas cutâneas é acelerado e sem cicatriz na ausência da microbiota comensal, devido a um processo inflamatório controlado caracterizado por baixo acúmulo de neutrófilos e altos níveis de macrófagos alternativamente ativados, bem como um aumento de angiogênese na região da ferida. Molecularmente, pode ser associado a níveis elevados de IL-10 e VEGF e baixos níveis de TGF- β 1 desde o início do processo de cicatrização. Entender como a microbiota comensal regula o processo de cicatrização proporciona novas direções não apenas para o entendimento da fisiopatologia de feridas, mas pode também apoiar novas estratégias para tratar feridas através da manipulação da microbiota.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(6), 464-478. doi: 10.1038/nrm2183
- Amaral, F. A., Sachs, D., Costa, V. V., Fagundes, C. T., Cisalpino, D., Cunha, T. M., . . . Teixeira, M. M. (2008). Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(6), 2193-2197. doi: 10.1073/pnas.0711891105
- Armstrong, J. R., & Ferguson, M. W. (1995). Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol*, 169(1), 242-260. doi: 10.1006/dbio.1995.1141
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920. doi: 10.1126/science.1104816
- Barcelos, L. S., Talvani, A., Teixeira, A. S., Cassali, G. D., Andrade, S. P., & Teixeira, M. M. (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res*, 53(10), 576-584. doi: 10.1007/s00011-004-1299-4
- Barcelos, L. S., Talvani, A., Teixeira, A. S., Vieira, L. Q., Cassali, G. D., Andrade, S. P., & Teixeira, M. M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*, 78(2), 352-358. doi: 10.1189/jlb.1104682
- Beanes, S. R., Dang, C., Soo, C., & Ting, K. (2003). Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med*, 5(8), 1-22. doi: 10.1017/S1462399403005817

- Bik, E. M. (2009). Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr Rev*, *67 Suppl 2*, S164-171. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00237.x
- Braund, R., Hook, S., & Medicott, N. J. (2007). The role of topical growth factors in chronic wounds. *Curr Drug Deliv*, *4*(3), 195-204.
- Cao, C., Lawrence, D. A., Strickland, D. K., & Zhang, L. (2005). A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. *Blood*, *106*(9), 3234-3241. doi: 10.1182/blood-2005-03-1288
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, *1*(1), 17-24. doi: 10.1038/nrmicro732
- Cass, D. L., Sylvester, K. G., Yang, E. Y., Crombleholme, T. M., & Adzick, N. S. (1997). Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J Pediatr Surg*, *32*(7), 1017-1021; discussion 1021-1012.
- Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*, *10*(10), 735-744. doi: nri2850 [pii] 10.1038/nri2850
- Chervonsky, A. V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol*, *11*(1), 28-35. doi: 10.1038/ni.1801
- Chodorowska, G., & Rogus-Skorupska, D. (2004). Cutaneous wound healing. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med*, *59*(2), 403-407.
- Chung, H., & Kasper, D. L. (2010). Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol*, *22*(4), 455-460. doi: 10.1016/j.coi.2010.06.008
- Cowin, A. J., Brosnan, M. P., Holmes, T. M., & Ferguson, M. W. (1998). Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev Dyn*, *212*(3), 385-393. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<385::AID-AJA6>3.0.CO;2-D

Davies, M. J. (1990). A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*, 82(3 Suppl), II38-46.

DiPietro, L. A. (1995). Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*, 4(4), 233-240.

DiPietro, L. A., Burdick, M., Low, Q. E., Kunkel, S. L., & Strieter, R. M. (1998). MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest*, 101(8), 1693-1698. doi: 10.1172/JCI1020

Donati, R. M., Frank, D. W., Stromberg, L. R., & McLaughlin, M. M. (1971). The effect of the germfree state on wound healing. *J Surg Res*, 11(4), 163-172.

Dovi, J. V., He, L. K., & DiPietro, L. A. (2003). Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol*, 73(4), 448-455.

Eberl, G. (2010). A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol*, 3(5), 450-460. doi: 10.1038/mi.2010.20

Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T., & Koch, M. (2007). Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*, 42(3), 115-170. doi: 10.1016/j.proghi.2007.06.001

Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3), 514-525. doi: 10.1038/sj.jid.5700701

Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Vieira, A. T., Soares, A. C., Pinho, V., Nicoli, J. R., . . . Souza, D. G. (2012). Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol*, 188(3), 1411-1420. doi: 10.4049/jimmunol.1101682

Ferguson, M. W., & O'Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359(1445), 839-850. doi: 10.1098/rstb.2004.1475

- Ferrante, C. J., & Leibovich, S. J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1(1), 10-16. doi: 10.1089/wound.2011.0307
- Finsson, K. W., McLean, S., Di Guglielmo, G. M., & Philip, A. (2013). Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(5), 195-214. doi: 10.1089/wound.2013.0429
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2008). Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci*, 49(1), 7-19. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.09.009
- Gallo, R. L., & Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*, 12(7), 503-516. doi: 10.1038/nri3228
- Gessner, A., Mohrs, K., & Mohrs, M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol*, 174(2), 1063-1072.
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., . . . Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355-1359. doi: 10.1126/science.1124234
- Gordon, H. A., & Pesti, L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev*, 35(4), 390-429.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3(1), 23-35. doi: 10.1038/nri978
- Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schurmann, C., Linke, A., Holdener, M., . . . Frank, S. (2009). A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol*, 175(1), 132-147. doi: 10.2353/ajpath.2009.081002

- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9(4), 244-253. doi: 10.1038/nrmicro2537
- Grimbaldeston, M. A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M., & Galli, S. J. (2007). Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol*, 8(10), 1095-1104. doi: 10.1038/ni1503
- Guidugli Neto, J. (1987). The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*, 1(4), 6-8.
- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*, 10(3), 159-169. doi: 10.1038/nri2710
- Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S., & Martin, P. (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci*, 107 (Pt 5), 1159-1167.
- Howdieshell, T. R., Callaway, D., Webb, W. L., Gaines, M. D., Procter, C. D., Jr., Sathyanarayana, . . . McNeil, P. L. (2001). Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res*, 96(2), 173-182. doi: 10.1006/jsre.2001.6089
- Jain, N., & Walker, W. A. (2014). Diet and host-microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. doi: 10.1038/nrgastro.2014.153
- Johnston, D. E. (1990). Wound healing in skin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 20(1), 1-25.
- Kelly, D., King, T., & Aminov, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res*, 622(1-2), 58-69. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.03.011

- Kennedy Norton, S., Barnstein, B., Brenzovich, J., Bailey, D. P., Kashyap, M., Speiran, K., . . . Ryan, J. J. (2008). IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J Immunol*, *180*(5), 2848-2854.
- Krummel, T. M., Nelson, J. M., Diegelmann, R. F., Lindblad, W. J., Salzberg, A. M., Greenfield, L. J., & Cohen, I. K. (1987). Fetal response to injury in the rabbit. *J Pediatr Surg*, *22*(7), 640-644.
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A. L., . . . Gallo, R. L. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med*, *15*(12), 1377-1382. doi: 10.1038/nm.2062
- Lefkovits, J., Plow, E. F., & Topol, E. J. (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med*, *332*(23), 1553-1559. doi: 10.1056/NEJM199506083322306
- Leibovich, S. J., & Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, *78*(1), 71-100.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, *124*(4), 837-848. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*, *25*(1), 9-18. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007
- Li, J., Zhang, Y. P., & Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, *60*(1), 107-114. doi: 10.1002/jemt.10249
- Liechty, K. W., Kim, H. B., Adzick, N. S., & Crombleholme, T. M. (2000). Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *J Pediatr Surg*, *35*(6), 866-872; discussion 872-863. doi: 10.1053/jpsu.2000.6868

Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., . . . Pollard, J. W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*, *66*(23), 11238-11246. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278

Lo, D. D., Zimmermann, A. S., Nauta, A., Longaker, M. T., & Lorenz, H. P. (2012). Scarless fetal skin wound healing update. *Birth Defects Res C Embryo Today*, *96*(3), 237-247. doi: 10.1002/bdrc.21018

Longaker, M. T., Chiu, E. S., Adzick, N. S., Stern, M., Harrison, M. R., & Stern, R. (1991). Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann Surg*, *213*(4), 292-296.

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., . . . Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*, *184*(7), 3964-3977. doi: 10.4049/jimmunol.0903356

Macpherson, A. J., & Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, *4*(6), 478-485. doi: 10.1038/nri1373

Maeda, S., Fujimoto, M., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Takehara, K., & Hasegawa, M. (2011). Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skin wound healing via cytokine production. *Am J Pathol*, *179*(5), 2360-2369. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.048

Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, *229*(2), 176-185. doi: 10.1002/path.4133

Marchesi, J., & Shanahan, F. (2007). The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis*, *20*(5), 508-513. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282a56a9900001432-200710000-00011 [pii]

Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., & McKercher, S. R. (2003). Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol*, *13*(13), 1122-1128.

Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, *13*, 453-461.

Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*, *12*(1), 5-9. doi: 10.1038/ni0111-5

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428-435. doi: 10.1038/nature07201

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, *140*(6), 771-776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006

Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., & Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clin Dermatol*, *25*(1), 19-25. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.12.005

Merkel, J. R., DiPaolo, B. R., Hallock, G. G., & Rice, D. C. (1988). Type I and type III collagen content of healing wounds in fetal and adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, *187*(4), 493-497.

Montesano, R., & Orci, L. (1988). Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(13), 4894-4897.

Mori, R., Shaw, T. J., & Martin, P. (2008). Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med*, *205*(1), 43-51. doi: 10.1084/jem.20071412

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, *8*(12), 958-969. doi: 10.1038/nri2448

- Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P., & Mantovani, A. (2000). Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans*, 28(5), 563-566.
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat Immunol*, 15(7), 602-611. doi: 10.1038/ni.2921
- Ng, M. F. (2010). The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J*, 7(1), 55-61. doi: 10.1111/j.1742-481X.2009.00651.x
- Okada, M. (1994). The influence of intestinal flora on wound healing in mice. *Surg Today*, 24(4), 347-355.
- Okada, M., Bothin, C., Kanazawa, K., & Midtvedt, T. (1999). Experimental study of the influence of intestinal flora on the healing of intestinal anastomoses. *Br J Surg*, 86(7), 961-965. doi: 10.1046/j.1365-2168.1999.01161.x
- Oskeritzian, C. A. (2012). Mast Cells and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1(1), 23-28. doi: 10.1089/wound.2011.0357
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 14(5), 289-301. doi: 10.1038/nri3646
- Penn, J. W., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2012). The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*, 2(1), 18-28.
- Peranteau, W. H., Zhang, L., Muvarak, N., Badillo, A. T., Radu, A., Zoltick, P. W., & Liechty, K. W. (2008). IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *J Invest Dermatol*, 128(7), 1852-1860. doi: 10.1038/sj.jid.5701232
- Pierce, G. F. (2001). Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *Am J Pathol*, 159(2), 399-403. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61709-9

- Pleasants, J. E. (1974). Letter: Legislation--the solution to a dilemma. *J Oral Surg*, 32(3), 166.
- Randolph, G. J. (2008). Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 19(5), 462-468. doi: 10.1097/MOL.0b013e32830d5f09
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, 49(1), 35-43. doi: 10.1159/000339613
- Salzman, N. H. (2011). Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Curr Opin Microbiol*, 14(1), 99-105. doi: S1369-5274(10)00159-1 [pii] 10.1016/j.mib.2010.09.018
- Sanford, J. A., & Gallo, R. L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol*, 25(5), 370-377. doi: 10.1016/j.smim.2013.09.005
- Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134(2), 577-594. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059
- Scapini, P., & Cassatella, M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 124(5), 710-719. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90(3), 859-904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., . . . Wallace, J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*, 21(2), 325-332. doi: 10.1096/fj.06-7227rev
- Shaw, T. J., & Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 18), 3209-3213. doi: 10.1242/jcs.031187

Simpson, D. M., & Ross, R. (1972). The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest*, *51*(8), 2009-2023. doi: 10.1172/JCI1107007

Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*, *19*(2), 59-69. doi: 10.1016/j.smim.2006.10.002

Souza, D. G., Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Cisalpino, D., Sousa, L. P., Vieira, A. T., . . . Teixeira, M. M. (2007). The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol*, *179*(12), 8533-8543.

Souza, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F., Teixeira, M. M., & Dias, A. A. (2002). Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol*, *160*(5), 1755-1765. doi: S0002-9440(10)61122-4 [pii]

Souza, D. G., Vieira, A. T., Soares, A. C., Pinho, V., Nicoli, J. R., Vieira, L. Q., & Teixeira, M. M. (2004). The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol*, *173*(6), 4137-4146.

Stappenbeck, T. S., & Miyoshi, H. (2009). The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*, *324*(5935), 1666-1669. doi: 10.1126/science.1172687

Stramer, B. M., Mori, R., & Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*, *127*(5), 1009-1017. doi: 10.1038/sj.jid.5700811

Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., . . . Kokesova, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*, *93*(2-3), 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, *449*(7164), 804-810. doi: 10.1038/nature06244
- Vieira, A. T., Fagundes, C. T., Alessandri, A. L., Castor, M. G., Guabiraba, R., Borges, V. O., . . . Teixeira, M. M. (2009). Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am J Pathol*, *175*(6), 2382-2391. doi: 10.2353/ajpath.2009.090093
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., . . . Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, *328*(5975), 228-231. doi: 10.1126/science.1179721
- Wahli, W. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly*, *132*(7-8), 83-91. doi: 2002/07/smw-09939
- Welch, M. P., Odland, G. F., & Clark, R. A. (1990). Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol*, *110*(1), 133-145.
- Weller, K., Foitzik, K., Paus, R., Syska, W., & Maurer, M. (2006). Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*, *20*(13), 2366-2368. doi: 10.1096/fj.06-5837fje
- Wilgus, T. A. (2008). Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. *Pharmacol Res*, *58*(2), 112-116. doi: 10.1016/j.phrs.2008.07.009
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, *214*(2), 199-210. doi: 10.1002/path.2277
- Zhang, X., & Mosser, D. M. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol*, *214*(2), 161-178. doi: 10.1002/path.2284

10. ANEXO

10. Anexo

Canesso MCC, Vieira AT, Castro TBR, Schirmer BGA, Cisalpino D, Martins FS, Rachid MA, Nicoli JR, Teixeira MM, Barcelos LS. *Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota.* J Immunol 2014.



QUIDEL

MicroVue Pan-Specific C3 Reagent Kit

Expand the arsenal of Complement analysis in animals with the ability to detect depletion of C3.

Find out how this kit fills the gap of animal-specific Complement ELISA.



Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota

This information is current as of November 13, 2014.

Maria C. C. Canesso, Angélica T. Vieira, Tiago B. R. Castro, Brígida G. A. Schirmer, Daniel Cisalpino, Flaviano S. Martins, Milene A. Rachid, Jacques R. Nicoli, Mauro M. Teixeira and Lucíola S. Barcelos

J Immunol 2014; 193:5171-5180; Prepublished online 17 October 2014;

doi: 10.4049/jimmunol.1400625

<http://www.jimmunol.org/content/193/10/5171>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2014/10/17/jimmunol.1400625.DCSupplemental.html>

References This article **cites 49 articles**, 13 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/193/10/5171.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>



Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota

Maria C. C. Canesso,* Angélica T. Vieira,[†] Tiago B. R. Castro,* Brígida G. A. Schirmer,* Daniel Cisalpino,[†] Flaviano S. Martins,[†] Milene A. Rachid,[‡] Jacques R. Nicoli,[†] Mauro M. Teixeira,[§] and Lucíola S. Barcelos*

The commensal microbiota has a high impact on health and disease by modulating the development and homeostasis of host immune system. Immune cells are involved in virtually every aspect of the wound repair process; however, the impact of commensal microbiota on skin wound healing is largely unknown. In this study, we evaluated the influence of commensal microbiota on tissue repair of excisional skin wounds by using germ-free (GF) *Swiss* mice. We observed that macroscopic wound closure rate is accelerated in the absence of commensal microbiota. Accordingly, histologically assessed wound epithelization was accelerated in GF in comparison with conventional (CV) *Swiss* mice. The wounds of GF mice presented a significant decrease in neutrophil accumulation and an increase in mast cell and macrophage infiltration into wounds. Interestingly, alternatively activated healing macrophage-related genes were highly expressed in the wound tissue of GF mice. Moreover, levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, the angiogenic growth factor VEGF and angiogenesis were higher in the wound tissue of those mice. Conversely, scarring and levels of the profibrogenic factor TGF- β 1 were greatly reduced in GF mice wounded skin when compared with CV mice. Of note, conventionalization of GF mice with CV microbiota restored wound closure rate, neutrophil and macrophage accumulation, cytokine production, and scarring to the same extent as CV mice. Overall, our findings suggest that, in the absence of any contact with microbiota, skin wound healing is accelerated and scarless, partially because of reduced accumulation of neutrophils, increased accumulation of alternatively activated healing macrophages, and better angiogenesis at wound sites. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 5171–5180.

The commensal microbiota consists of microorganisms that are present on body surfaces covered by epithelial cells exposed to the external environment such as skin and the gastrointestinal tract (1). It has been shown that the impact of the commensal microbiota on health and disease can be wide-ranging from protection against pathogenic microorganisms, absorption of nutrients, and vitamin production to modulating the development and homeostasis of immune system (2–6).

Wound healing is a highly dynamic process that involves a complex sequence of cellular and biochemical events. In adult mammals, after an early inflammatory stage characterized by infiltration of neutrophils and macrophages, the formation of a fibroproliferative tissue rich in immature collagen bundles and newly formed blood vessels takes place and prompt re-epithelization occurs. Finally, the maturation phase involves dermis collagen remodeling and scar budding (7) as the usual outcome of tissue repair.

Wound inflammatory leukocytes may interfere with virtually all phases of tissue repair (8–12). On one hand, neutrophils (11) and inflammatory classically activated macrophages (13) may impair wound healing. On the other hand, macrophages may range from a proinflammatory to an anti-inflammatory/angiogenic/healing phenotype that serves to resolve inflammation and promote healing (14).

Our group has demonstrated that germ-free (GF) animals (which have no commensal microbiota) display anti-inflammatory and reduced hypernociception responses in models of ischemia and reperfusion, systemic LPS, and carrageenan-induced pain (15–17). Conversely, the chronic inflammatory response in murine models of colitis, arthritis, and asthma may be exacerbated or prolonged in GF animals (18). Animals free of commensal microbiota therefore represent a valuable tool for understanding the intrinsic mechanisms involved in tissue repair, especially when considered the importance of a controlled inflammatory response after injury. However, studies evaluating the influence of commensal microbiota on the healing of skin wounds are very scarce.

The first published studies about the influence of commensal microbiota on the healing emerged in the 1960s when histological examination of oral wounds indicated no differences between GF mice and their respective conventional (CV) controls animals regarding inflammatory response and collagen production (19). In

*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Grupo de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; [†]Departamento de Microbiologia, Grupo de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; [‡]Departamento de Patologia Geral, Grupo de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and [§]Departamento de Bioquímica e Imunologia, Grupo de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Received for publication March 10, 2014. Accepted for publication September 16, 2014.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. M.C.C.C. holds a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior master of science scholarship. F.S.M., J.R.N., M.M.T., and L.S.B. hold Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico research fellowships.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Lucíola S. Barcelos, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte Minas Gerais, Brazil. E-mail address: luciolasbarcelos@gmail.com

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CV, conventional; CVZ, conventionalized; GF, germ-free; KC, keratinocyte-derived chemokine; MPO, myeloperoxidase; NAG, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

contrast, in a comparative study using GF and CV rats, a more intense inflammatory reaction in skin wounds from the latter animals was observed (20). Likewise, incisional wounds of CV mice exhibited higher tensile strength than in GF mice (21). More recently, Lai et al. (22) showed that the resident skin commensal microbiota was able to modulate local inflammatory response after injury.

In this study, we evaluated the influence of commensal microbiota on wound closure rate and tissue repair of excisional skin wounds by using GF mice. Our main findings suggest that in the absence of any contact with microbiota wound healing is accelerated and is characterized by reduced content of neutrophils, increased markers of macrophage polarization to an anti-inflammatory/wound healing phenotype, better angiogenesis stimulation into the wound bed, and reduced scar formation.

Materials and Methods

Animal procedures

All procedures complied with the standards stated in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and were conducted under conditions approved by the local animal ethics committee, Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal de Minas Gerais (protocol number 122/11). Eight- to 10-wk-old male and female GF *Swiss* were derived from a GF nucleus (Taconic Farms, Germantown, NY) and maintained in flexible plastic isolators (Standard Safety Equipment, Marietta, OH) using classical gnotobiology techniques (23). Conventional CV *Swiss* mice were derived from GF matrices and considered conventional only after six generations in the conventional facility. The process of colonizing GF mice with microbiota from CV mice was performed as described previously (15). Briefly, fecal samples from CV mice were homogenized in saline (10%) and administered by oral gavage to GF mice. Three weeks later, these animals were conducted to excisional wound healing model, as described below. To assess whether there was adequate colonization of GF mice, fecal samples were cultured using a thioglycollate test (15). All experimental procedures in GF mice were conducted under aseptic conditions to avoid contamination of animals (16).

Wounding and measurement of wounds area

Mice were anesthetized and their dorsum shaved. Four excisional wounds were created on the dorsum of mice with the aid of a sterile 5-mm circular punch, removing the entire thickness of the skin. After surgery, mice were caged individually. The area of wounds was measured at the indicated time points with a digital caliper, and the results were expressed as percentage closure relative to original size ($1 - [\text{wound area}]/[\text{original wound area}] \times 100$) (24). Suggestive signs of local infection were not detected in the wounds area.

Quantification of neutrophil and macrophage tissue accumulation

The extent of neutrophil accumulation in the wound tissue was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity, as described previously (25, 26). Briefly, after euthanasia with an overdose of anesthetic, the wound and surrounding skin area were removed and snap frozen in liquid nitrogen. On thawing and processing, the tissue (100 mg tissue/1 ml buffer) was homogenized in 0.02 mol/l NaPO₄ buffer (pH 4.7) containing 0.015 mol/l Na-EDTA, centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and the pellet was subjected to hypotonic lyses. After a further centrifugation, the pellet was resuspended in 0.05 mol/l NaPO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and rehomogenized. Suspensions were then subjected to three freeze-thaw cycles using liquid nitrogen and centrifuged for 15 min at $10,000 \times g$; supernatants were used for MPO assay. The assay was performed by measuring the change in OD at 450 nm using 1.6 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in DMSO (Merck, Rahway, NJ) and 0.003% H₂O₂ (v/v) dissolved in phosphate buffer (0.05 M Na₃PO₄ and 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide [pH 5.4]). Results were expressed as the relative unit that denotes activity of MPO.

The extent of macrophages accumulation in the wound tissue was measured by assaying *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity, as described previously (26, 27). Briefly, the tissue (100 mg tissue/1 ml buffer) was homogenized in 0.9% saline containing 0.1% Triton X-100 (v/v) and centrifuged at 4°C for 10 min at $3000 \times g$; supernatants were

used for NAG assay. The assay was performed by measuring the change in OD at 405 nm using *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich) and 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Results were expressed as the relative unit that denotes activity of NAG.

Total and differential blood cell count

Blood (5 μ l) was collected from the tail vein of anesthetized mice and diluted in Turk's solution; total cell counts were performed in a modified Neubauer chamber. In addition, a blood smear was prepared and stained with Panótico Rápido (a Diff Quick-based stain, Laborclin, Brasil). The percentage of monocytes and neutrophils was determined using standard morphological criteria (25).

Measurement of mRNA expression by real-time quantitative PCR

Animals were euthanized by an overdose of anesthetic. Wounds and surrounding skin were removed and perpendicularly cut into two halves. One-half was immediately frozen for molecular biology studies, whereas the other one was fixed in formalin (4% in isotonic saline) and further processed for histological analyses. To determine the expression of genes associated with inflammatory and alternative macrophage activation, total RNA was obtained from wounds using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) as described by the manufacturer. Real-time quantitative PCR was performed on an ABI PRISM Step-One sequence-detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The relative expression level of genes was determined by the $2^{-\Delta\Delta \text{cycle threshold (Ct)}}$ method, and data were normalized by 18S ribosome subunit expression levels. All reactions were replicated. Primers were generated for nos2 (forward, 5'-AGC ACT TTG GGT GAC CAC CAG GA-3'; reverse, 5'-AGC TAA GTA TTA GAG CCG CGG CA-3'), IFN- γ (forward, 5'-ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT-3'; reverse, 5'-TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA-3'), fizz1 (forward, 5'-ACC TTT CCT GAG ATT CTG CCC-3'; reverse, 5'-CAG TGG TCC AGT CAA CGA GTA AGC-3'), dectin1 (forward, 5'-GGA ATC CTG TGC TTT GTG GTA GTA G-3'; reverse, 5'-GGA AGG CAA GAC TGA GAA AAA CCT C-3'), mrc1 (forward, 5'-TCT TTT ACG AGA AGT TGG GGT CAG-3'; reverse, 5'-ATC ATT CCG TTC ACC AGA GGG-3'), arg1 (forward, 5'-TGA CAT CAA CAC TCC CCT GAC AAC-3'; reverse, 5'-GCC TTT TCT TCC TTC CCA GCA G-3'), and 18S (forward, 5'-CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG-3'; reverse, 5'-CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC-3').

Histological assessment

Samples were collected as described above. Five-micrometer paraffin-embedded sections were stained with H&E or toluidine blue and examined under a light microscope (Olympus BX43 with a camera Olympus Q-color 5). Sections were also stained with Picro-Sirius for collagen quantification and analyzed under polarized light. Morphometric analyses were performed on digital images using ImageProPlus 7.0 Software.

The extent of epithelialization (distance that the neoepithelium had extended from the margin of the wound as defined by the presence of hair follicles in nonwounded skin; known as epithelial tongue) and scar tissue formation (area comprising from the epidermal-dermal junction down to the panniculus carnosus and from the borders of the wound—outlined using the freeform outline tool in ImageProPlus to produce a pixel-based measurement then converted to square micrometers) was determined on H&E-stained sections. The number of mast cells was determined by counting cells in the entire area of wound tissue on toluidine-stained sections. Organization and maturation of collagen bundles were assessed on Sirius Red-stained sections. All histomorphometric analyses were performed in a blind manner.

Measurement of cytokine/chemokine concentrations in the wounds

Animals were euthanized by an overdose of anesthetic and the wounds and surrounding skin area were removed and snap frozen in liquid nitrogen. On thawing and processing, the tissue was homogenized in extraction solution (100 mg tissue/1 ml), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethoniumchloride, 10 mM EDTA, and 20 KI aprotinin, using Ultra-Turrax. The suspension was then spun at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was used for ELISAs, which were performed using kits from R&D Systems (Minneapolis, MN) for murine IL-10, VEGF, total TGF- β 1, TNF- α , and CXCL1/keratinocyte-derived chemokine (KC), according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in duplicate. The threshold of sensitivity for each cytokine/chemokine was 7.5 pg/ml.

Statistical analysis

Analyses were performed using the GraphPad Prism 5.3 software. Results are presented as the mean \pm SEM. Comparisons between two groups were carried out using Student *t* test for unpaired data. Three or more group comparisons were carried out using one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Two-way ANOVA was used for graph lines to verify the interaction between the independent variables time and strain and was followed by Bonferroni posttest. A *p* value < 0.05 was considered significant.

Results

Wound closure is accelerated in germ-free mice

First, to evaluate whether the absence of commensal microbiota had any impact on wound closure after an excisional skin injury, we followed the rate of macroscopic wound closure. We observed that GF mice exhibited a significant increase in percentage of wound closure after day 3 postwounding compared with CV animals ($p < 0.001$) (Fig. 1A).

These macroscopic findings were confirmed by histological assessment of epithelialization at day 7 postwounding. On H&E-stained paraffin sections, the length of the epithelial tongues (an indicative of the neoeepithelium migration extent from the margin of the wound) was significantly increased in GF mice in comparison with CV control mice ($p < 0.001$) (Fig. 1B). These findings indicate that enhanced epithelialization contributed to the accelerated wound closure of GF mice.

Sustained high levels of IL-10 and TNF- α in the early phase of wound healing in GF mice

All steps of the healing process are controlled by a wide variety of cytokines. We observed an increase in wound levels of the proinflammatory cytokine TNF- α after injury in both GF and CV groups. However, although in CV mice TNF- α dropped to basal levels at day 1 postinjury, in GF mice it was kept at higher levels at least till day 3 ($p < 0.05$) (Fig. 2A). Interestingly, levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were higher in the nonwounded skin of GF mice when compared with CV mice, remaining significantly high until day 3 after wounding ($p < 0.05$ for all groups) (Fig. 2B). In wounds from CV mice, similar to TNF- α kinetics, levels of IL-10 decreased to basal after its peak at day 1 postinjury. Levels of CXCL1/KC, a chemoattractant for neutrophils, did not show any difference between groups (Fig. 2C). These results suggest that GF mice are able to promptly respond to skin injury by increasing levels of inflammation mediators.

Wound leukocyte profile is markedly altered in germ-free mice

Neutrophils, macrophages, and mast cells are known to rapidly be recruited into the wound area (9). To evaluate accumulation of neutrophils and macrophages into wounds, we used MPO- and NAG-based activity assays, respectively. MPO is the most abundant enzyme in neutrophils, and NAG is expressed in high levels in activated macrophages; both have been shown to be useful and reliable markers for neutrophil and macrophage infiltration, respectively (26, 27). We observed that neutrophilic accumulation was delayed and of lower magnitude into wounds of GF mice when compared with CV controls (Fig. 3A). Although neutrophil accumulation into wounds of CV animals reached the peak at day 1 after injury, this peak was displaced to day 3 in GF animals. At day 7, MPO activity in wound bed had returned to basal skin levels in both groups. As shown in Fig. 3A, at day 1 after injury, neutrophils accumulation into wounds of GF mice was significantly reduced when compared with CV mice ($p < 0.001$).

In wounds of GF mice, macrophage accumulation reached the peak at day 1, and levels of NAG activity were significantly higher than those in wounds of CV mice ($p < 0.01$) (Fig. 3B). Moreover,

macrophage content in wounds of GF mice remained high until day 3 ($p < 0.05$), as compared with CV mice, which showed increased levels of macrophages only later, at day 7 postinjury. These data suggest that, contrary to neutrophils, macrophage accumulation in GF mouse wounds happens earlier and at higher levels than in CV mice. Supplemental Fig. 1 illustrates the predominance of neutrophils in wounds of CV mice and of mononuclear cells in wounds of GF mice at day 1 postwounding.

Of note, when we evaluated the number of circulating cells in the peripheral blood (Table I), we observed that nonwounded GF mice have $\sim 80\%$ less neutrophils in the peripheral blood than CV mice. After wounding, there was a gradual increase in blood neutrophil number in GF mice, although it was still lower than in CV mice. Similarly, we observed that nonwounded GF mice had $\sim 60\%$ less monocytes in the peripheral blood than CV mice. Nevertheless, 24 h after injury, although the number of blood monocytes dropped to the lowest levels in CV mice, this cell type remained basically unaltered in the blood of GF mice.

To quantify the number of mast cells at wound sites, we used toluidine blue histological staining. Similarly to macrophages, the number of mast cells in GF nonwounded skin was already higher than in CV mouse nonwounded skin. After wounding, the number of mast cells in the wound bed rose significantly and reached the highest levels at day 1 postinjury in both groups. Interestingly, although the number of mast cell decreased significantly after day 1 postinjury in CV mice, mast cells remained high throughout the observational period in GF mice (Fig. 3C).

Alternatively activated macrophage-related genes are highly expressed in wound tissue of GF mice

We then evaluated which subtype of macrophages would be accumulating in the wounds of GF and CV mice. To phenotypically characterize the macrophages infiltrating the wound tissue, we analyzed the expression of mRNA for alternatively activated macrophage-related genes (Dectin-1, Mannose receptor-1, Fizz-1, and Arginase-1) and for classically activated macrophage-related genes (IFN- γ and inducible NO synthase [iNOS]). We observed that alternatively activated healing macrophage-related genes were more highly expressed in wound tissue of GF mice at days 3 and 7 after wounding, as compared with CV mice. In contrast, genes related to classically activated macrophages were less expressed in GF and highly expressed in CV mice at days 3 and 7 postinjury (Fig. 4).

Wound angiogenesis is increased in germ-free mice

The kinetics of angiogenesis in the wound tissues was analyzed by evaluating capillary density in H&E-stained sections. At day 3 after wounding, the capillary density in the wound of GF mice was significantly increased relative to CV mice ($p < 0.001$), and it remained high until the end of the experimental time (Fig. 5A, 5C). Levels of VEGF, an important angiogenic growth factor, were measured by ELISA. In line with angiogenesis, levels of VEGF were significantly higher in wounds of GF mice when compared with CV mice ($p < 0.05$) (Fig. 5B).

Altered collagen deposition and scar formation in GF mice

The extent of collagen deposition and alignment during dermal healing may determine the severity of scar tissue formation and consequently loss of function compared with the original tissue. We then looked at collagen deposition on the wound area 14 d after tissue injury by staining histological sections with Picro-Sirius red. The levels of type I larger collagen fibers, seen as bright orange to red bundles, were similar in GF and CV mice. However, levels of type III thinner collagen fibers, seen as green fibrils, were significantly higher in wounds from GF compared with CV mice

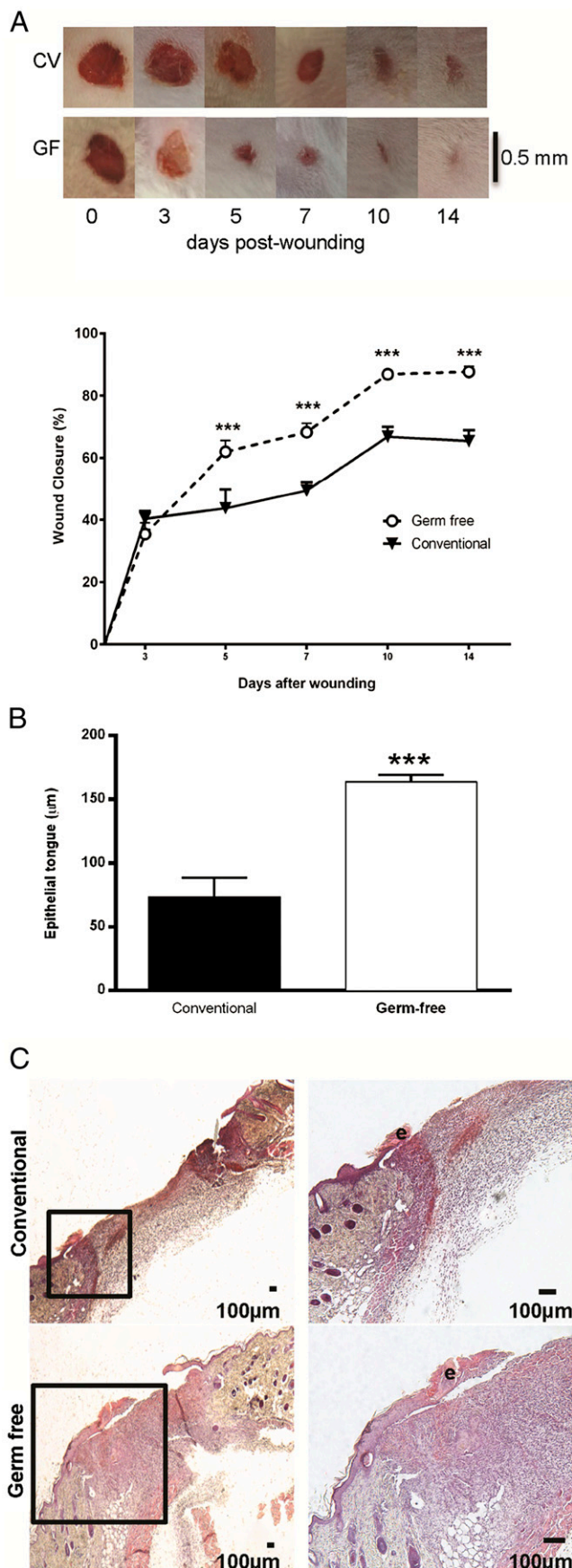


FIGURE 1. Wound closure is accelerated in GF mice. **(A)** Time-course of wound closure in GF and CV mice. **(B)** Epithelial tongue length at day 7 postwounding. **(C)** Representative photomicrographs of H&E-stained sections evidencing epithelial tongues (square). Results of wound closure

(Fig. 6A, 6C, 6D). Levels of total TGF- β 1, a profibrogenic cytokine, were significantly higher in wounds from CV mice when compared with GF mice ($p < 0.01$ at day 3 and $p < 0.05$ at day 7) (Fig. 6B). Interestingly, scar tissue area was significantly larger in CV mice when compared with GF mice (Fig. 6E–G).

GF colonized mice restore wound healing to conventional mouse level

To demonstrate that alterations observed in GF mice are due to the absence of commensal microbiota, GF mice were colonized with feces of CV mice for 21 d. After that, excisional wounds were created on conventionalized (CVZ) mice. Interestingly, we observed that CVZ mice restore the phenotype of CV mice, as seen by the wound closure rate, inflammatory cell accumulation and scar tissue formation (Fig. 7). Wounding cytokines at day 3 after surgery were also unaltered (TNF- α 725 ± 261 versus 975 ± 218 , IL-10 602 ± 273 versus 855 ± 188 , and CXCL1 2913 ± 314 versus 3327 ± 499 , CV versus CVZ). These results suggest that the accelerated wound healing phenotype observed in the skin of GF mice is in fact due to the absence of commensal microbiota.

Discussion

Surface tissues, such as skin and intestinal tract, are continuously exposed to a number of microorganisms, most of which are harmless or beneficial to the host. Although there is an increasing amount of literature systematically evaluating gut and skin microbial communities diversity in healthy and disease (28) and also evaluating the role of gut microbiota on the development and modulation of immune system (29), the influence of microbiota on skin wound healing is largely unknown. In this study, we disclose the impact of microbiota on epithelization, inflammation, angiogenesis, and scar formation after excisional skin injury by a comparative study in GF and CV mice. To the best of our knowledge, the present work provides the first direct evidence for innate/genetically encoded wound healing mechanisms in adult skin excisional lesions in contrast with the ones that occur in the setting of body interactions with microorganisms.

In adult mammals, wound healing is a highly dynamic process that involves a complex and overlapping sequence of cellular and biochemical events that range from an immediate response to damage of skin cells and invading microbial signals to inflammatory and angiogenic responses and finally wound fibroplasia and scar formation (7). Damage or microbial signals activate pattern recognition receptors such as TLRs in leukocytes that then trigger antimicrobial defense and/or inflammatory signaling cascades (30). Interestingly, Lai et al. (22) showed that the resident skin commensal microbiota is able to modulate local inflammatory responses after injury in an epithelial-derived TLR dependent manner. In the case of GF mice, the only cue to stimulate the healing response just after skin injury are signals from the damage of skin structures once these animals are devoid of microbiota and the whole process occurs in sterile conditions. In other words, the response to skin injury in GF animals is triggered by host-derived damage associated molecular patterns and activation of disturbed resident cells. Activation of inflammatory cells is consequently an integral part of wound healing.

rate were expressed as percentage closure relative to original size ($1 - [\text{wound area}]/[\text{original wound area}] \times 100$). For epithelial tongue length, measurement was considered the extension of the new epidermis from the boundaries of the healthy one to the tip of migrating/proliferating keratinocytes. Data represent the mean \pm SEM, $n = 7$ –9 mice for each time point and group. *** $p < 0.001$. e, epithelium.

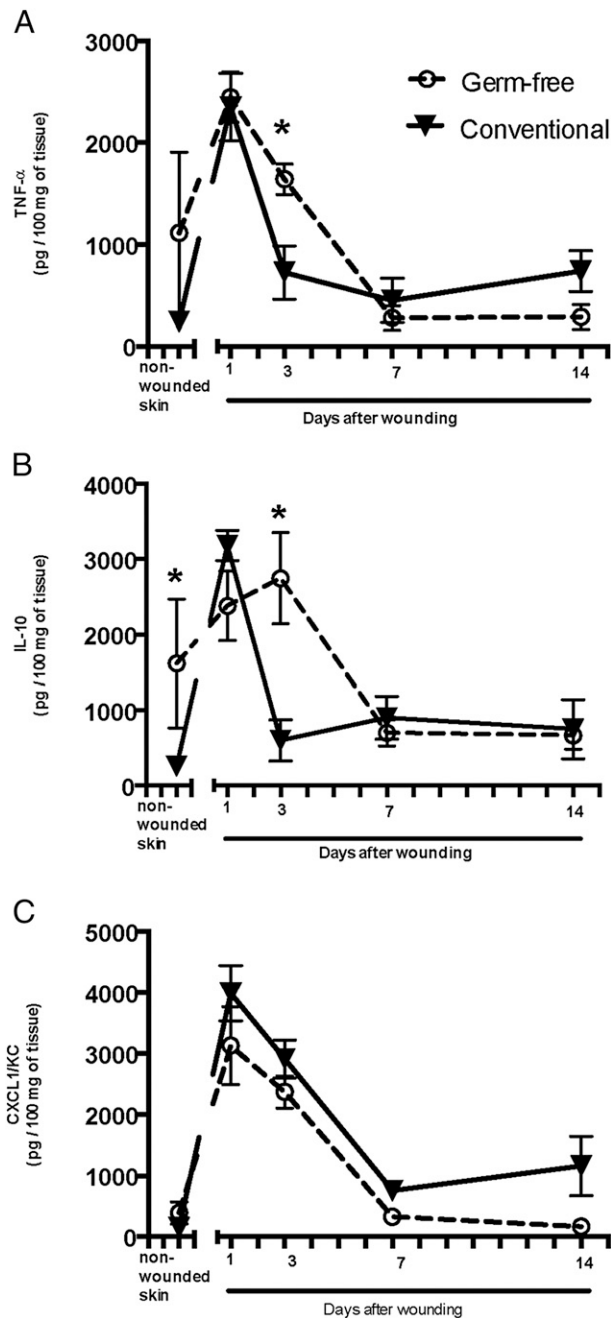


FIGURE 2. Kinetics of local cytokine release during skin wound healing in GF and CV mice. TNF- α (A), IL-10 (B), and CXCL1/KC (C) time-course production profile into wounds of GF and CV mice. Levels of cytokines were measured by sandwich ELISA. Data represent the mean \pm SEM, $n = 7-9$ for each time point and group. * $p < 0.05$.

Neutrophils are one of the earliest immune cells recruited to the site of injury. The major function of these cells is to protect the host from infection by combating invading microorganisms and clearing cellular debris. However, activated neutrophils secrete a battery of bioactive substances, such as proteases and reactive oxygen intermediates, which in excess, can lead to tissue damage (8). In fact, Dovi et al. (11) demonstrated that neutropenia induced by an antineutrophil serum accelerated the rate of wound epithelial closure without altering the overall quality of the dermal healing process in mice. In this study, besides accelerated epithelial closure, we found reduced neutrophil content in 24-h wounds of GF mice, although CXCL1 levels were produced to the same extent as in CV mice in response to injury. Therefore, our data are con-

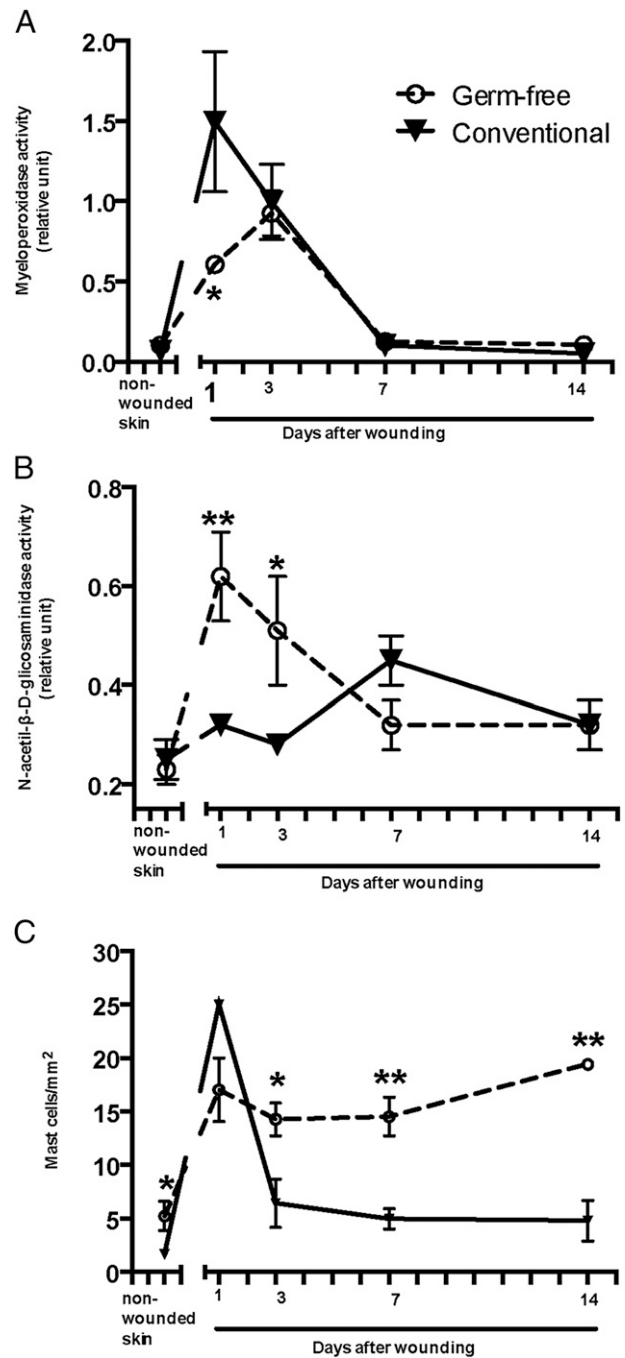


FIGURE 3. Kinetics of leukocyte accumulation into excisional skin wounds in GF and CV mice. Neutrophils (A) and macrophages (B) accumulation into wounds were evaluated by measuring the activity of MPO and NAG, respectively. (C) Mast cells were quantified by blinding counting of toluidine blue-stained tissue sections. Data represent the mean \pm SEM; $n = 7-9$ for each time point and group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

sistent with the idea that reduced neutrophil infiltration into wound site correlates with accelerated wound closure. Mechanistically, our results suggest that the delayed infiltration of neutrophils after injury in GF mice is, at least partially, due to the neutropenia in these animals before injury and not due to reduced local production of neutrophil-related chemoattractants. Indeed, levels of CXCL1 were unaltered in GF mice as compared with their CV controls. However, we cannot exclude the possibility that neutrophils from GF mice were hyporesponsive to chemoattractants (18).

Table I. Peripheral blood leukocyte counting

Postoperative Day	Total Leukocytes (No. of Cells per mm ³ of Blood)		Monocytes (No. of Cells per mm ³ of Blood)		Neutrophils (No. of Cells per mm ³ of Blood)	
	CV	GF	CV	GF	CV	GF
Nonwounded skin	160 ± 15	74 ± 9***	12 ± 1	5 ± 1***	53 ± 8	8 ± 2***
1 d	50 ± 10	72 ± 5	1 ± 0.1	7 ± 1***	6 ± 1	11 ± 2
3 d	228 ± 14	95 ± 11***	18 ± 2	9 ± 1*	64 ± 7	18 ± 3 ***
7 d	162 ± 20	136 ± 20	11 ± 2	10 ± 2	43 ± 6	35 ± 7
14 d	114 ± 14	70 ± 6*	7 ± 2	5 ± 0.1	54 ± 15	12 ± 3*

Analyses of total number of leukocytes (number of cells per cubic millimeter of blood), monocytes, and neutrophils were performed before and after injury. Data represent the mean ± SEM, $n = 5-7$ for each time point and group.

*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

Alongside with the influx of neutrophils, circulating monocytes enter the wound in response to damage or microbes and differentiate into mature macrophages. The key regulatory role of macrophages in driving a successful tissue repair has been a matter of discussion. There is evidence to suggest that the inflammatory response might serve the function of preventing infection in detriment of a fibrotic repair with scar formation. This has been

observed in embryos and PU.1 null mice that heal without excessive inflammation and scarring (12, 31, 32). Nevertheless, proper activation of wound macrophages appears central to skin repair as depletion of these cells results in severe disturbance of the healing process, for instance, by impairing angiogenesis and collagen deposition (33–35). In this study, in contrast to reduced neutrophil infiltration, we observed a significant increase in macrophage in-

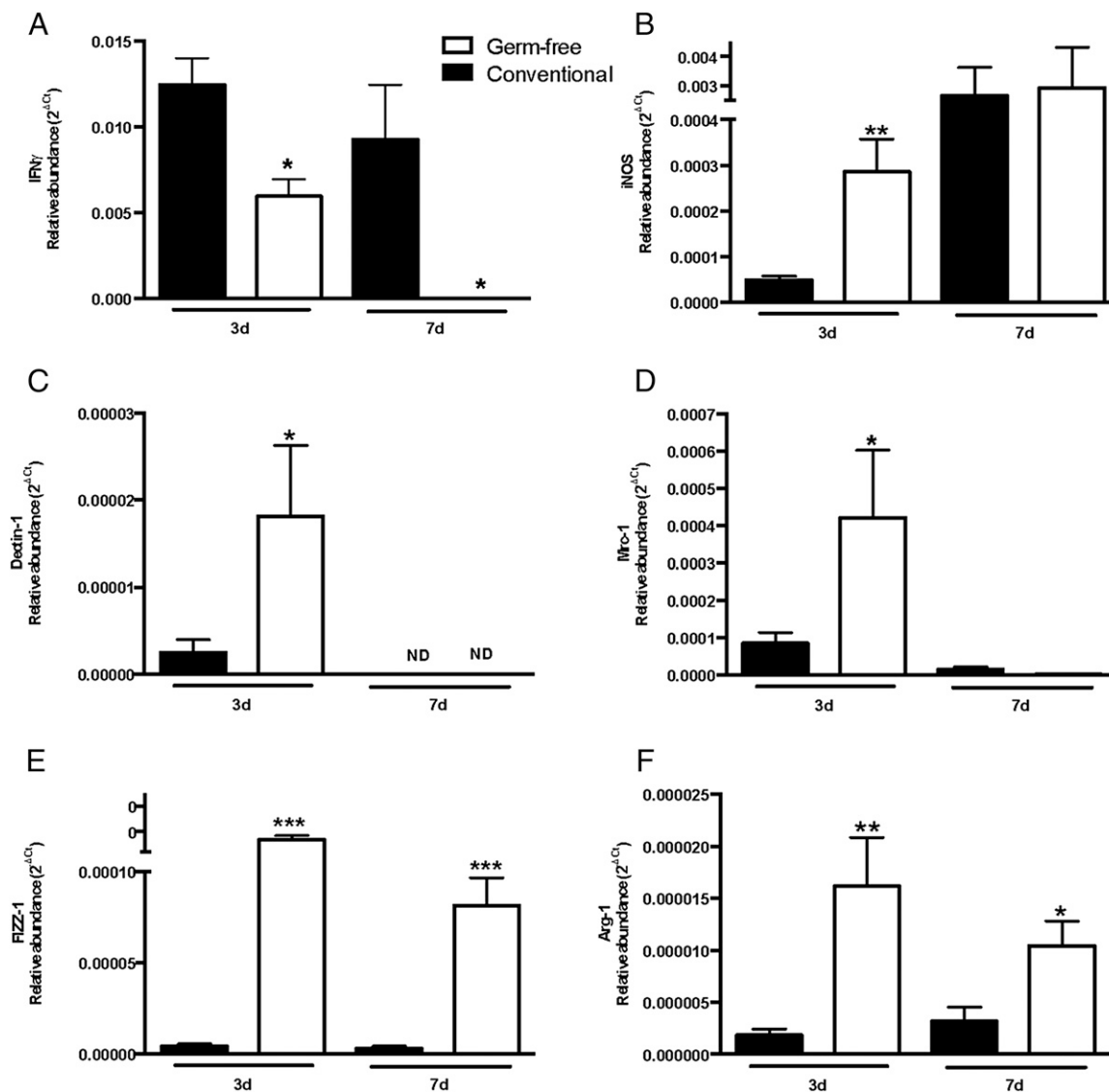


FIGURE 4. Alternatively activated macrophage-related genes are highly expressed in skin wounds of GF mice. IFN- γ (A), inducible NO synthase (iNOS) (B), Dectin-1 (C), Mrc-1 (D), Fizz-1 (E), and Arginase-1 (F) mRNA expression in wounds of GF and CV mice was assessed by quantitative PCR. Data represent the mean ± SEM; $n = 4-5$ for each time point and group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

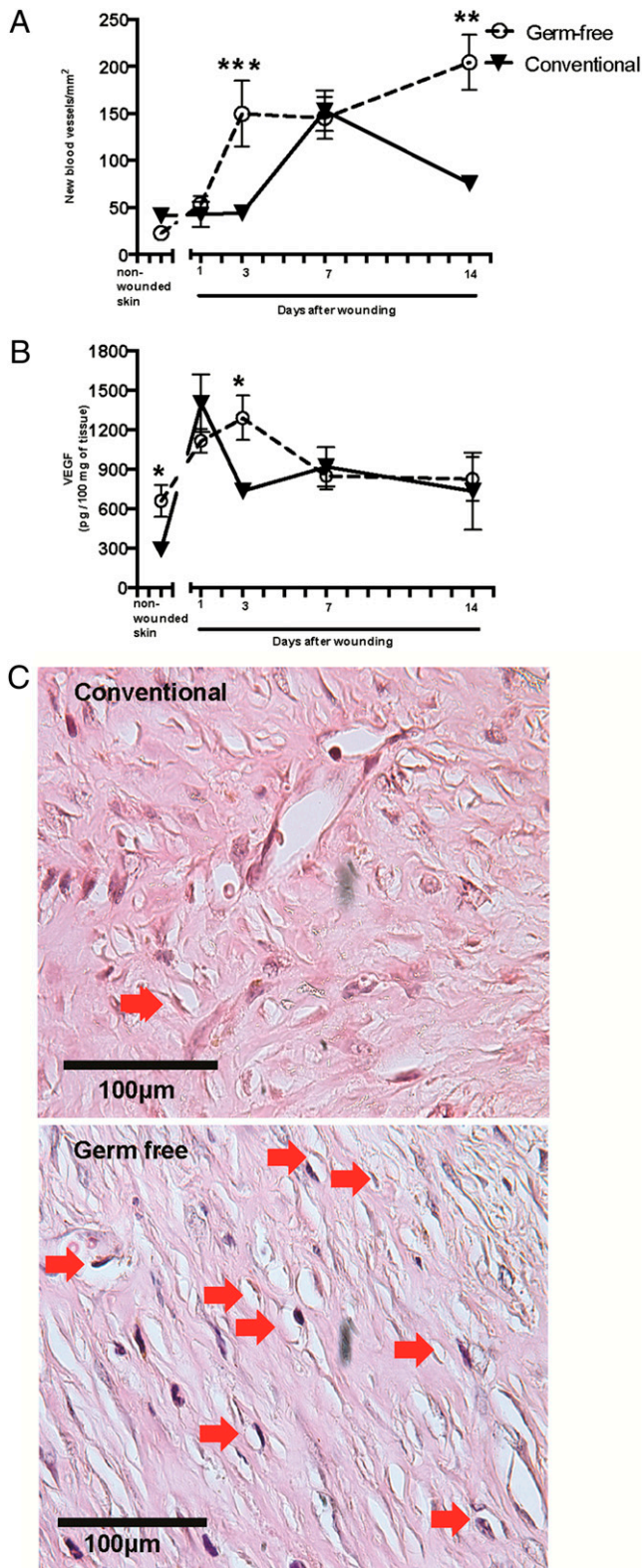


FIGURE 5. Wound angiogenesis is increased in GF mice. Density of blood vessels (**A**) and VEGF levels in wounds (**B**) of GF and CV mice. (**C**) Representative photomicrographs of H&E-stained 3 d postinjury skin sections evidencing blood vessels (arrows). The density of blood vessels was evaluated by blinding counting in H&E-staining sections and is represented as number of vessels per square millimeter of granulation tissue. Levels of VEGF were measured by sandwich ELISA. Data represent the mean \pm SEM; $n = 7$ for each time point and group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

filtration into wounds of GF when compared with CV mice, supporting a beneficial role of wound macrophages for skin repair.

One of the hallmarks of macrophages is their ability to become activated in response to exogenous and endogenous “danger” signals with the potential of enhancing inflammation. With the eventual elimination of the insult, macrophages contribute to the resolution of the inflammatory response (36). In fact, macrophages are a diverse and dynamic population of cells that can perform a wide range of critical functions in wounding healing. Activated macrophages make up a spectrum of activation status varying from a classical inflammatory phenotype (M1) to a nonclassical or alternative phenotype (M2), also referred to as “repair macrophages,” that promote wound healing and angiogenesis (14, 37, 38). Interestingly, alternatively activated macrophage-related genes were highly expressed in wound tissue of GF mice, suggesting the predominant presence of this macrophage phenotype in the absence of microbiota. In fact, the most important point when considering the role of monocytes/macrophages in skin wound healing in GF mice is possibly the predominance of cells with the M2 phenotype in the wounds of those animals. These cells are known to contribute to the resolution of the inflammatory process and to stimulate angiogenesis as well as the production of type III collagen by fibroblasts. As a consequence, we observed an increase in the kinetics of the healing process and better quality of dermis remodeling, favoring a regenerative instead of a fibrotic repair process.

Corroborating this idea, we found high levels of IL-10 in wounds of GF animals. IL-10 is a regulatory cytokine with pivotal functions in the control of inflammation and immune-mediated tissue damage. IL-10 may not only decrease the inflammatory response to injury but also create an environment favorable to differentiation of regulatory M2 macrophages and regenerative wound healing (39). In fact, IL-10 may be responsible for the scarless repair observed in fetal skin (40). Globally, this could additionally explain the accelerated wound healing without scarring and the predominant expression of genes related to M2 macrophages phenotype in the wounds of GF mice. Although IL-10 levels were increased and IL-10 can actually decrease inflammation, there were high levels of the proinflammatory cytokine TNF- α and much inflammation as seen by the increase of macrophages and mast cells in the wound bed. These data suggest a controlled inflammatory process in GF animals that favored successful wound healing.

Mast cells are able to release a variety of soluble mediators, but their function is less understood when compared with other inflammatory cells. Although traditionally viewed as effector cells of allergic reaction and parasitic diseases, an important role for mast cells in tissue homeostasis and wound healing is now increasingly recognized (41–43). Of note, in this study, we found a high and sustained infiltration of mast cells into wounds of GF animals during the whole experimental period in contrast to a transient peak of mast cell infiltration 24 h after wounding in CV mice. On one hand, this inflammatory cell type seems to play an important role in the proliferation phase where angiogenesis is essential for provision of oxygen and nutrients to the nascent tissue. Similarly to M2 macrophages, mast cells release angiogenic growth factors, including VEGF and metalloproteinases that prepare surrounding tissue for angiogenesis during skin repair (44). In fact, the rich content of M2 macrophages and mast cells strongly suggests a connection with the high levels of VEGF and high number of capillaries in the wounds of GF animals. On the other hand, mast cells can limit inflammatory skin reaction by producing IL-10 (45) that, in turn, can downregulate mast cell Fc ϵ RI IgE receptor expression supporting protection against skin allergy sensitization (46).

In addition to inflammation and angiogenesis, both macrophages and mast cells are also able to regulate fibroplasia at wound sites,

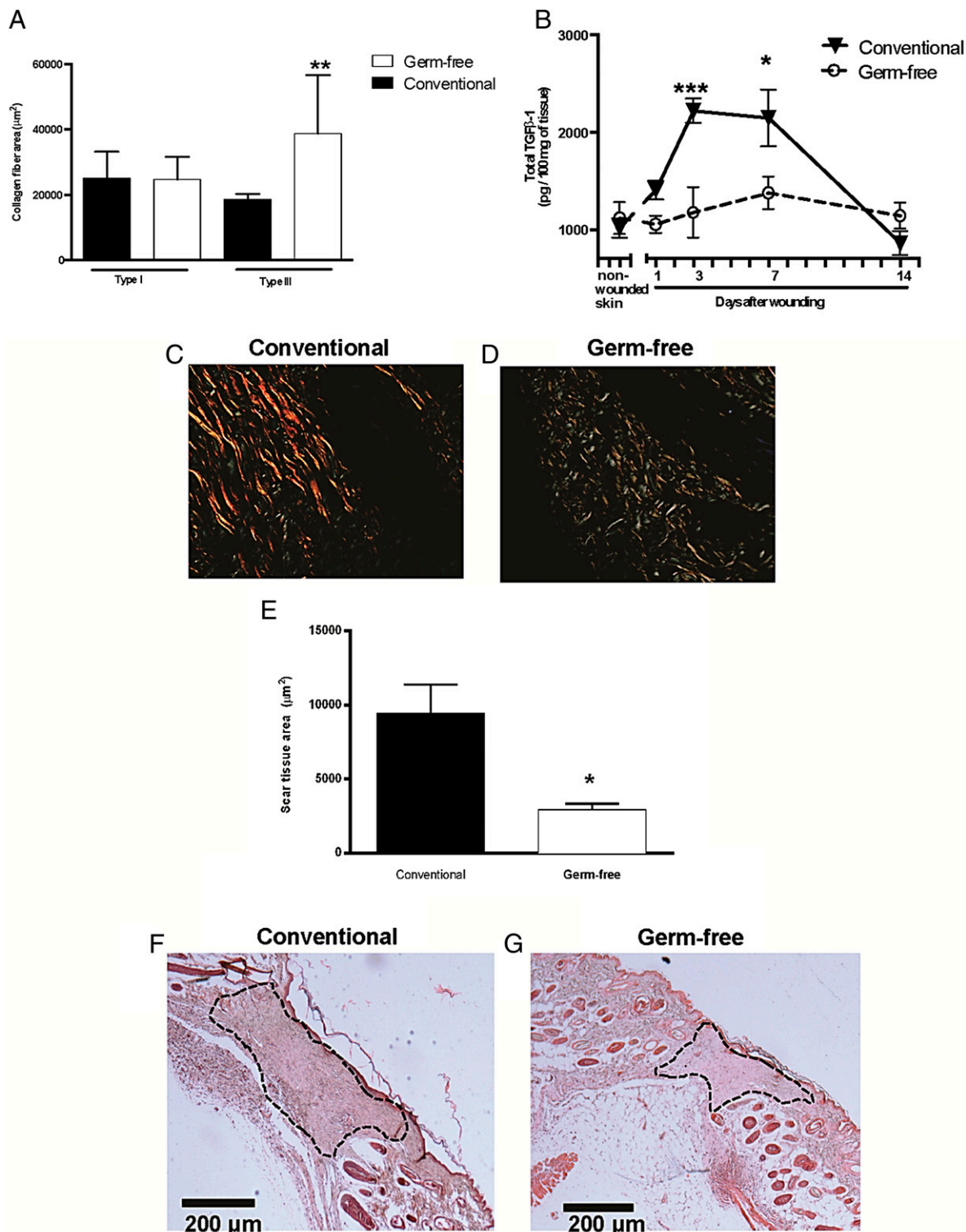
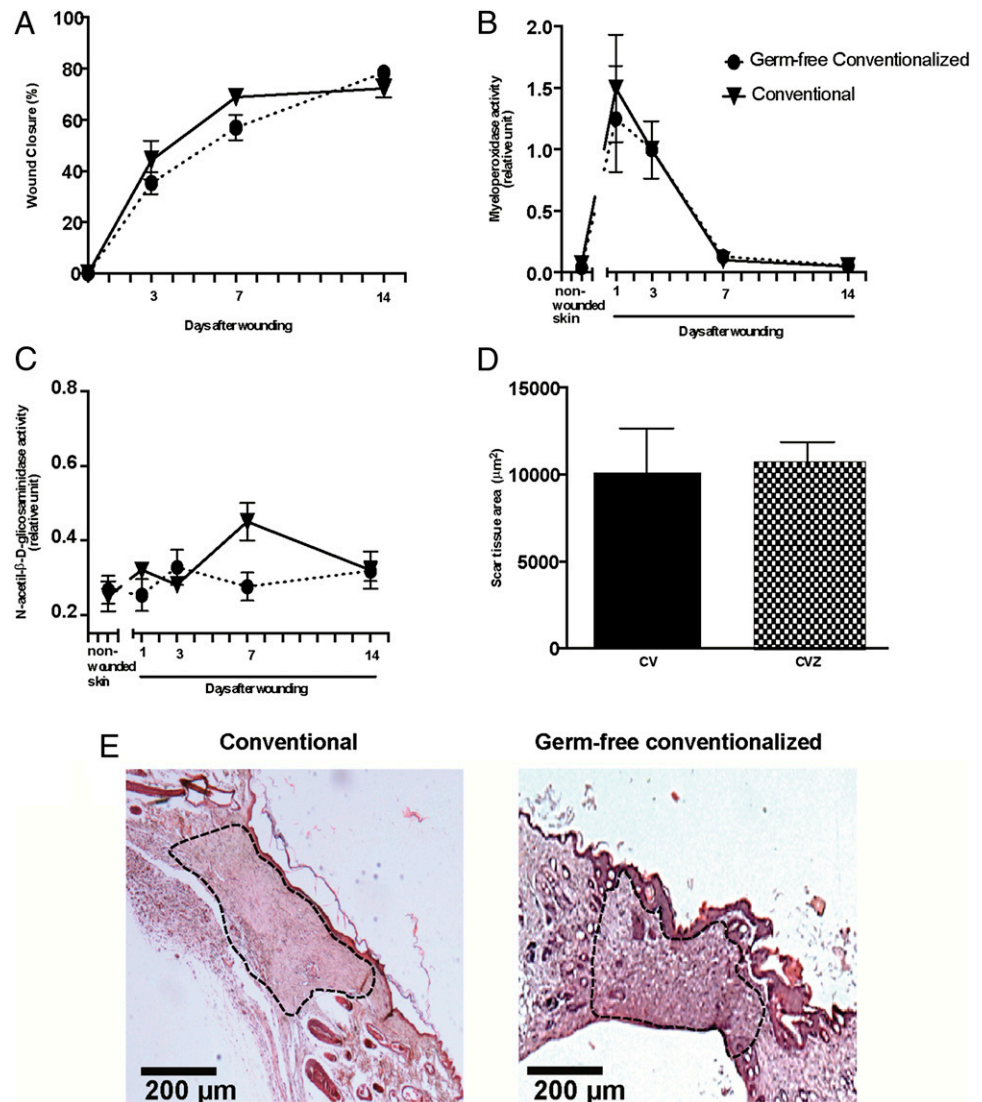


FIGURE 6. Skin wound collagen deposition and scarring in GF and CV mice. **(A)** Collagen type I and type III occupied area into wounds. **(B)** Levels of total TGF-β1 evaluated by sandwich ELISA. **(C and D)** Representative photomicrographies of granulation tissue of 7 d postinjury skin stained by Picrosirius and observed under polarized light (original magnification $\times 40$). **(E)** Scar tissue occupied area in tissue sections of 14 d postinjury skin. **(F and G)** Representative photomicrographies of H&E-stained 14 d postinjury skin sections evidencing the scar tissue (dashed lined area). Morphometric data were obtained by blinding analysis using the ImageProPlus 7.0 software. Data represent the mean \pm SEM; $n = 5-7$ for each time point and group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

for instance, by releasing TGF-β1, an important profibrogenic growth factor (47). Interestingly, GF mice showed lower levels of TGF-β1 at wound sites that directly correlated with scar formation in injured skin of these animals when compared with CV mice. It has been shown that collagen subtype deposition may predict

future scar formation. In fact, the fetal skin, the best model for scarless healing, is known to contain a greater proportion of type III collagen in comparison with type I collagen and this differential collagen deposition during fetal skin healing is thought to contribute to scarless wound healing (48). In this study, we observed

FIGURE 7. GF-colonized mice restore wound healing to CV mouse level. **(A)** Time course of wound closure in CV and CVZ mice. Neutrophils **(B)** and macrophages **(C)** accumulation into wounds were evaluated by measuring the activity of MPO and NAG, respectively. **(D)** Scar tissue occupied area in tissue sections of 14 d postinjury skin. **(E)** Representative photomicrographs of H&E-stained 14 d postinjury skin sections evidencing the scar tissue (dashed lined area). Morphometric data were obtained by blinding analysis using the ImageProPlus 7.0 software. Reposition of microbiota 21 d prior to injury in GF, referred to as conventionalization (CVZ). Results of wound closure rate were expressed as percentage closure relative to original size. Data represent the mean \pm SEM; $n = 5-7$ mice/group.



that GF wounds have a higher proportion of type III collagen as well as a minimum area of scar tissue.

Finally, to prove that alterations observed in GF mice after excisional skin injury were indeed due to the absence of commensal microbiota, we conventionalized GF mice by transferring feces from CV mice into GF mice. The conventionalization process restored the phenotype of CV mice as observed by the similar rate of wound closure, inflammatory cell accumulation, cytokine release, and scar tissue formation. Our results suggest that, in the absence of microbiota, skin wound healing is scarless and basically dependent on a mosaic of intrinsic mechanisms of sensing and reacting to damage plus the activation of a non-microbial-primed “immature” immune system (2, 14, 16). In this sense, a parallel may be drawn with the fetal skin wound healing that occurs in sterile conditions in utero (i.e., in the absence of microbiota). Both GF and fetuses share unique properties, including reduced neutrophil content, high levels of IL-10 and VEGF, low levels of TGF- β 1 production, deposition of an extracellular matrix rich in type III collagen, and minimum scar formation after skin injury (49). This observation is suggestive of the recapitulation of aspects of the fetal regenerative phenotype in the postnatal skin of animals that never had any contact with commensal microbiota. From this point of view, one could speculate that the progressive and dynamic contact with microbiota is a key link underlining scarring

after wound healing in adults. Perhaps, the acquisition of the ability to deal with infection at the site of wound healing pays the price of greater scarring under usual nonsterile conditions. Further studies are required to better understand potential fibrotic and nonhealing mechanisms of microbiota in skin.

Taken together, our findings suggest that skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota because of a controlled inflammatory process characterized by low accumulation of neutrophils and high levels of alternatively activated macrophages as well as because of increased angiogenesis at wound sites. Molecularly, it was associated to elevated levels of IL-10 and VEGF and low levels of TGF- β 1 from the beginning of the healing process. Understanding how commensals regulate the healing process provides not only new directions in the pathophysiology of wounds but also could support strategies to treat wounds by manipulating microbiota.

Acknowledgments

We thank Marcelo Gomes and Valner Augusto Mussel for animal care and Ilma M. Souza for technical support.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Tlaskalová-Hogenová, H., R. Stepánková, T. Hudcovic, L. Tucková B. Cukrowska, R. Lodinová-Zádníková, H. Kozáková, P. Rossmann, J. Bártová, D. Sokol, et al. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93: 97–108.
2. Fagundes, C. T., F. A. Amaral, A. T. Vieira, A. C. Soares, V. Pinho, J. R. Nicoli, L. Q. Vieira, M. M. Teixeira, and D. G. Souza. 2012. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J. Immunol.* 188: 1411–1420.
3. Macia, L., A. N. Thorburn, L. C. Binge, E. Marino, K. E. Rogers, K. M. Maslowski, A. T. Vieira, J. Kranich, and C. R. Mackay. 2012. Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. *Immunol. Rev.* 245: 164–176.
4. Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, F. A. Carvalho, T. C. Cullender, S. Mwangi, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman, R. Knight, R. E. Ley, and A. T. Gewirtz. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328: 228–231.
5. Kelly, D., T. King, and R. Aminov. 2007. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.* 622: 58–69.
6. Smith, K., K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19: 59–69.
7. Shaw, T. J., and P. Martin. 2009. Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 3209–3213.
8. Wilgus, T. A. 2008. Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. *Pharmacol. Res.* 58: 112–116.
9. Eming, S. A., T. Krieg, and J. M. Davidson. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 127: 514–525.
10. Stramer, B. M., R. Mori, and P. Martin. 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1009–1017.
11. Dovi, J. V., L. K. He, and L. A. DiPietro. 2003. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J. Leukoc. Biol.* 73: 448–455.
12. Martin, P., D. D'Souza, J. Martin, R. Grose, L. Cooper, R. Maki, and S. R. McKercher. 2003. Wound healing in the PU.1 null mouse—tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr. Biol.* 13: 1122–1128.
13. Ploeger, D. T., N. A. Hosper, M. Schipper, J. A. Koerts, S. de Rond, and R. A. Bank. 2013. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun. Signal.* 11: 29.
14. Ferrante, C. J., and S. J. Leibovich. 2012. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Adv. Wound Care* 1: 10–16.
15. Amaral, F. A., D. Sachs, V. V. Costa, C. T. Fagundes, D. Cisalpino, T. M. Cunha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, T. A. Silva, J. R. Nicoli, et al. 2008. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2193–2197.
16. Souza, D. G., C. T. Fagundes, F. A. Amaral, D. Cisalpino, L. P. Sousa, A. T. Vieira, V. Pinho, J. R. Nicoli, L. Q. Vieira, I. M. Fierro, and M. M. Teixeira. 2007. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J. Immunol.* 179: 8533–8543.
17. Souza, D. G., A. T. Vieira, A. C. Soares, V. Pinho, J. R. Nicoli, L. Q. Vieira, and M. M. Teixeira. 2004. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J. Immunol.* 173: 4137–4146.
18. Maslowski, K. M., A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, D. Yu, H. C. Schilter, M. S. Rolph, F. Mackay, D. Artis, et al. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461: 1282–1286.
19. Gordon, H. A., and L. Pesti. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol. Rev.* 35: 390–429.
20. Donati, R. M., D. W. Frank, L. R. Stromberg, and M. M. McLaughlin. 1971. The effect of the germfree state on wound healing. *J. Surg. Res.* 11: 163–172.
21. Okada, M. 1994. The influence of intestinal flora on wound healing in mice. *Surg. Today* 24: 347–355.
22. Lai, Y., A. Di Nardo, T. Nakatsui, A. Leichter, Y. Yang, A. L. Cogen, Z. R. Wu, L. V. Hooper, R. R. Schmidt, S. von Aulock, et al. 2009. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat. Med.* 15: 1377–1382.
23. Pleasants, J. E. 1974. Letter: Legislation—the solution to a dilemma. *J. Oral Surg.* 32: 166.
24. Maeda, S., M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Hamaguchi, K. Takehara, and M. Hasegawa. 2011. Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skin wound healing via cytokine production. *Am. J. Pathol.* 179: 2360–2369.
25. Vieira, A. T., C. T. Fagundes, A. L. Alessandri, M. G. Castor, R. Guabiraba, V. O. Borges, K. D. Silveira, E. L. Vieira, J. L. Gonçalves, T. A. Silva, et al. 2009. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am. J. Pathol.* 175: 2382–2391.
26. Barcelos, L. S., A. Talvani, A. S. Teixeira, L. Q. Vieira, G. D. Cassali, S. P. Andrade, and M. M. Teixeira. 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J. Leukoc. Biol.* 78: 352–358.
27. Barcelos, L. S., A. Talvani, A. S. Teixeira, G. D. Cassali, S. P. Andrade, and M. M. Teixeira. 2004. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm. Res.* 53: 576–584.
28. Gallo, R. L., and L. V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 503–516.
29. Maslowski, K. M., and C. R. Mackay. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12: 5–9.
30. Muzio, M., N. Polentarutti, D. Bosisio, P. P. Manoj Kumar, and A. Mantovani. 2000. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 563–566.
31. Cowin, A. J., M. P. Brosnan, T. M. Holmes, and M. W. Ferguson. 1998. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dyn.* 212: 385–393.
32. Hopkinson-Woolley, J., D. Hughes, S. Gordon, and P. Martin. 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell Sci.* 107: 1159–1167.
33. Leibovich, S. J., and R. Ross. 1975. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* 78: 71–100.
34. DiPietro, L. A., M. Burdick, Q. E. Low, S. L. Kunkel, and R. M. Strieter. 1998. MIP-1 α as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J. Clin. Invest.* 101: 1693–1698.
35. Goren, I., N. Allmann, N. Yogev, C. Schürmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter, and S. Frank. 2009. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractile processes. *Am. J. Pathol.* 175: 132–147.
36. Zhang, X., and D. M. Mosser. 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214: 161–178.
37. Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958–969.
38. Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13: 453–461.
39. Peranteau, W. H., L. Zhang, N. Muvarak, A. T. Badillo, A. Radu, P. W. Zoltick, and K. W. Liechty. 2008. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1852–1860.
40. Liechty, K. W., H. B. Kim, N. S. Adzick, and T. M. Crombleholme. 2000. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *J. Pediatr. Surg.* 35: 866–872; discussion 872–863.
41. Weller, K., K. Foitzik, R. Paus, W. Syska, and M. Maurer. 2006. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* 20: 2366–2368.
42. Galli, S. J., and M. Tsai. 2008. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J. Dermatol. Sci.* 49: 7–19.
43. Oskertizian, C. A. 2012. Mast cells and wound healing. *Adv. Wound Care* 1: 23–28.
44. Ng, M. F. 2010. The role of mast cells in wound healing. *Int. Wound J.* 7: 55–61.
45. Grimbaldston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai, and S. J. Galli. 2007. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* 8: 1095–1104.
46. Kennedy Norton, S., B. Barnstein, J. Brenzovich, D. P. Bailey, M. Kashyap, K. Speiran, J. Ford, D. Conrad, S. Watowich, M. R. Moralle, et al. 2008. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 180: 2848–2854.
47. Braund, R., S. Hook, and N. J. Medlicott. 2007. The role of topical growth factors in chronic wounds. *Curr. Drug Deliv.* 4: 195–204.
48. Merkel, J. R., B. R. DiPaolo, G. G. Hallock, and D. C. Rice. 1988. Type I and type III collagen content of healing wounds in fetal and adult rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187: 493–497.
49. Lo, D. D., A. S. Zimmermann, A. Nauta, M. T. Longaker, and H. P. Lorenz. 2012. Scarless fetal skin wound healing update. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 96: 237–247.