



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Adriana Paulino do Nascimento


Efeitos de uma dieta hiperlipídica e de uma droga anti-inflamatória não-esteróide inibidora seletiva da ciclooxygenase-2 sobre a cicatrização cutânea de ratos Wistar propensos e resistentes a obesidade

Rio de Janeiro

2011

Adriana Paulino do Nascimento

**Efeitos de uma dieta hiperlipídica e de uma droga anti-inflamatória não-esteróide
inibidora seletiva da ciclooxygenase-2 sobre a cicatrização cutânea de ratos Wistar
propensos e resistentes a obesidade**



Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Humana e
Experimental, da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro.

Orientadora : Prof^ª. Dra. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2011

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

N244 Nascimento, Adriana Paulino.

Efeitos de uma dieta hiperlipídica e de uma droga anti-inflamatória não-esteróide inibidora seletiva da ciclooxigenase-2 sobre a cicatrização cutânea de ratos Wistar propensos e resistentes a obesidade / Adriana Paulino do Nascimento. - 2011.

67 f.:il.

Orientadora: Andréa Monte Alto Costa

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Cicatrização de feridas - Teses. 2. Gorduras na dieta - Teses. 3. Agentes anti-inflamatórios – Teses. 4. Ratos Wistar – Teses. I. Costa, Andréa Monte Alto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.5-003.92

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

Assinatura

Data

Adriana Paulino do Nascimento

Efeitos de uma dieta hiperlipídica e de uma droga anti-inflamatória não-esteróide inibidora seletiva da ciclooxigenase-2 sobre a cicatrização cutânea de ratos Wistar propensos e resistentes a obesidade

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2011.

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Andréa Monte Alto Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

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

Prof^ª. Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Bruna Romana de Souza
Instituto de Biologia - UFRRJ

Prof^ª. Dra. Cláudia Farias Benjamim
Instituto de Ciências Biológicas - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu chegar até esta etapa, sempre me abrindo portas e me socorrendo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora, Andréa Monte Alto Costa, pela orientação, confiança e amizade, e principalmente por tudo que me ensinou e que me permitiu aprender nestes muitos anos juntas, o meu muito obrigada!

Aos meus amados Alexandre e Kelly pela dedicação, preocupação e companheirismo, além da confiança e credibilidade que eles sempre me deram.

A minha amada sobrinha, Thaís, pelas alegrias que só ela sabe me dar, e também pela sua compreensão nas minhas ausências.

A minha família pelo incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu namorado, Magno, pelo amor, companheirismo e orgulho, além de todos bons momentos de alegria.

As minhas queridas amigas, Jeanine e Marcela, pela amizade sincera, pela ajuda fundamental e principalmente por estarem sempre ao meu lado.

A minha amiga, Bruna, por sempre tirar as minhas dúvidas e ser um exemplo para mim.

As minhas amigas, Mariane e Lidiane, pela maravilhosa experiência de termos trabalhado juntas e pela amizade sincera.

A todos os meus amigos, que cada um a sua maneira me incentivou na realização deste trabalho. Muito Obrigada!

A todos do Laboratório de Reparo Tecidual e do Departamento de Histologia e Embriologia e a todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Muito obrigada a todos!

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

NASCIMENTO, Adriana Paulino. *Efeitos de uma dieta rica em gordura e de uma droga antiinflamatória não-esteróide sobre a cicatrização cutânea de ratos Wistar propensos e resistentes a obesidade*. 2011. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O sobrepeso induzido por uma dieta rica em gordura atrasa a cicatrização através do prolongamento da fase inflamatória, entretanto, quando recebem uma dieta obesogênica, alguns ratos são suscetíveis a desenvolver sobrepeso, enquanto outros são resistentes. Drogas anti-inflamatórias não-esteróides são frequentemente utilizadas para reduzir a inflamação. Este estudo investigou a cicatrização cutânea em ratos propensos a obesidade induzida por dieta (DIO) e em ratos resistentes a dieta (DR) e avaliou a participação da administração do celecoxibe na cicatrização cutânea destes animais. Ratos machos foram alimentados com uma dieta padrão (Controle, C) ou com uma dieta rica em gordura saturada (30%). Após 19 semanas, o grupo experimental foi subdividido nos grupos DIO e DR. Uma lesão excisional foi feita e os animais foram mortos 7 ou 14 dias depois. Os grupos tratados receberam uma dose diária de 5 ou 10 mg/kg/dia de celecoxibe a partir de dois dias antes da lesão até 7 dias após a lesão, quando foram mortos. O peso corporal foi maior no grupo DIO comparado aos grupos C e DR. A gordura retroperitoneal foi maior no grupo DIO do que nos grupos C e DR e foi maior no grupo DR do que no grupo C. O tratamento com o celecoxibe não alterou o maior peso corporal apresentado pelo grupo DIO ou a maior porcentagem de gordura retroperitoneal apresentada pelos grupos DIO e DR. Todos os grupos tratados com celecoxibe 10 mg apresentaram atraso na cicatrização e não foram mais analisados. O grupo DIO apresentou intolerância a glicose, e ambos os grupos DIO e DR apresentaram atraso na contração e na reepitelização da lesão. O tratamento com celecoxibe 5 mg reverteu a intolerância a glicose no grupo DIO e a contração atrasada nos grupos DIO e DR. Comparado ao grupo DR, o grupo DIO apresentou maior quantidade de células inflamatórias, assim como maiores níveis de peroxidação lipídica. O tratamento com celecoxib (5 mg) não reduziu o número de PMN, mas reduziu o número de mastócitos no grupo DIO, o número de macrófagos e a peroxidação lipídica em ambos os grupos. A diferenciação miofibroblástica e o remodelamento dos vasos foram atrasados em ambos os grupos DIO e DR. O tratamento com celecoxibe 5 mg aumentou a diferenciação miofibroblástica, mas não alterou os vasos sanguíneos. A quantidade de hidroxiprolina foi semelhante nos grupos DIO e DR. O tratamento com celecoxibe 5 mg aumentou a quantidade de hidroxiprolina em todos os grupos. A quantidade de nitrito foi menor no grupo do que no grupo DR. A expressão de TNF- α foi aumentada no grupo DIO comparada ao grupo DR. Nossos resultados mostraram que os ratos DIO assim como os ratos DR apresentam retardo na cicatrização cutânea devido principalmente a intensa inflamação, e a baixa dose de celecoxibe acelerou o reparo cutâneo nestas condições.

Palavras-chave: Cicatrização cutânea. Dieta obesogênica. Propenso a obesidade. Resistente a obesidade. Celecoxibe.

ABSTRACT

Overweight induced by high-fat diet delays wound healing through elongation of inflammatory phase, however, when receiving an obesogenic diet, some rats are susceptible to developing the overweight phenotype, whereas others are resistant. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are frequently used to reduce the inflammation. This study investigated cutaneous wound healing in diet-induced obesity (DIO)-prone and diet-resistant (DR) rats and evaluated the contribution of celecoxib administration on cutaneous wound healing of these animals. Male rats were fed with a standard (Control, C) or high-saturated fat (30%) diet. After 19 weeks, experimental group was subdivided into DIO and DR groups. An excisional lesion was made and the animals were killed 7 or 14 days later. Treated groups received a daily dose of celecoxib 5 or 10 mg/kg/day from two days before wounding until 7 days after wounding when were killer. The body weight was higher in the DIO group compared to the C and DR groups. Retroperitoneal fat was higher in the DIO group than in the C and DR groups and was higher in the DR group than in the C group. Celecoxib-treatment did not alter the higher body weight presented by DIO group or higher retroperitoneal fat percentage displayed by DIO and DR groups. All groups treated with celecoxib 10 mg showed delayed wound healing, and weren't further analysed. The DIO group presented glucose intolerance, and both the DIO and DR groups presented delayed wound contraction and re-epithelialisation. The celecoxib 5 mg-treatment reversed the glucose intolerance in the DIO group and the delayed contraction in the DIO and DR groups. Compared to the DR group, the DIO group displayed higher amounts of inflammatory cells as well as higher levels of lipid peroxidation. Celecoxib-treatment (5 mg) did not reduce the number of PMN, but reduce mast cells number in DIO group and macrophages number and lipid peroxidation in both groups. Myofibroblastic differentiation and vessel remodeling were delayed in both the DIO and DR groups. The celecoxib 5 mg-treatment increased the myofibroblastic differentiation, but did not alter the blood vessels. Hydroxyproline levels were similar in the DIO and DR groups. The celecoxib 5 mg-treatment increased the hydroxyproline levels in all groups. Nitrite levels were lower in the DIO group than in the DR group. TNF- α expression was increased in the DIO group compared to the DR group. Our results showed that DIO as well as DR rats present delays in cutaneous wound healing due mainly to intense inflammation, and a lowdose of celecoxib accelerates cutaneous repair in these conditions.

Keywords: Cutaneous wound healing. Obesogenic diet. Obesity-prone. Obesity-resistant. Celecoxib.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	As três fases clássicas do reparo cutâneo	14
Figura 2	As vias de síntese dos prostanóides	17
Figura 3	Via de síntese dos prostanóides e local de atuação dos inibidores da COX-2	21
Figura 4	Distribuição do ganho de peso corporal de todos os animais ao final de 20 semanas de acesso livre a comida.....	24
Tabela 1	Peso corporal, ingestão de comida, depósito de gordura retroperitoneal, contração e reepitelização de lesão nos grupos C, DIO e DR.....	33
Figura 5	Glicemia de jejum e glicose sanguínea em resposta ao TTGO.....	34
Tabela 2	Análises microscópicas e bioquímicas da área da lesão em 7 e 14 dias após a lesão.....	36
Figura 6	Distribuição de mastócitos e macrófagos CD68-positivos 7 e 14 dias após a lesão.....	37
Figura 7	Quantidade de TNF- α na gordura retroperitoneal dos ratos DIO e DR.....	39
Tabela 3	Efeitos da administração do celecoxibe em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica.....	41
Figura 8	Contração da lesão 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe.....	42
Figura 9	Infiltrado inflamatório 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe.....	44
Figura 10	Células 4-HNE-positivas no tecido de granulação 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe.....	45
Figura 11	Densidade de volume dos miofibroblastos e dos vasos sanguíneos no tecido de granulação 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe.....	46
Figura 12	Hidroxirolina nas áreas das lesões 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Reparo tecidual cutâneo	12
1.2	Ratos propensos e resistentes a obesidade	15
1.3	Prostaglandinas	16
1.4	Ciclooxigenase	18
1.5	Ciclooxigenase e prostaglandinas na pele	19
1.6	Anti-inflamatórios não-esteróides	20
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea	23
3.1.1	<u>Animais Experimentais</u>	23
3.1.2	<u>Protocolo da Dieta</u>	23
3.1.3	<u>Modelo de Lesão e Análises Macroscópicas</u>	25
3.1.4	<u>Teste de Tolerância a Glicose Oral (TTGO)</u>	25
3.1.5	<u>Coleta do Tecido e Análises Microscópicas</u>	25
3.1.6	<u>Imunohistoquímica e Quantificações</u>	26
3.1.7	<u>Análises Bioquímicas</u>	27
3.1.8	<u>ELISA</u>	28
3.1.9	<u>Análises Estatísticas</u>	28
3.2	Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade	29
3.2.1	<u>Modelo Experimental</u>	29
3.2.2	<u>Tratamento com a Droga e Modelo da Lesão</u>	29
3.2.3	<u>Teste de Tolerância a Glicose Oral (TTGO)</u>	30
3.2.4	<u>Processamento do Tecido e Colorações</u>	30
3.2.5	<u>Imunohistoquímica e Quantificações</u>	30
3.2.6	<u>Ensaio para a Hidroxiprolina</u>	31
3.2.7	<u>Análises Estatísticas</u>	31
4	RESULTADOS	32

4.1	Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea	32
4.1.1	<u>Peso Corporal e Peso da Gordura Retroperitoneal</u>	32
4.1.2	<u>Glicemia de Jejum e TTGO</u>	32
4.1.3	<u>Análises Macroscópicas</u>	35
4.1.4	<u>Quantificação do Infiltrado Inflamatório</u>	35
4.1.5	<u>Peroxidação Lipídica</u>	35
4.1.6	<u>Desenvolvimento do Tecido de Granulação e Angiogênese</u>	38
4.1.7	<u>Deposição de Colágeno</u>	38
4.1.8	<u>Avaliação da Quantidade de Nitrito</u>	38
4.1.9	<u>Avaliação da liberação de TNF-α</u>	38
4.2	Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade	40
4.2.1	<u>Análises Biométricas</u>	40
4.2.2	<u>Glicemia e OGTT</u>	40
4.2.3	<u>Avaliação do Fechamento da Lesão</u>	40
4.2.4	<u>Quantificação do Infiltrado Inflamatório</u>	43
4.2.5	<u>Análise da Peroxidação Lipídica</u>	43
4.2.6	<u>Diferenciação Miofibroblástica e Angiogênese</u>	43
4.2.7	<u>Deposição de Colágeno</u>	47
5	DISCUSSÃO	49
5.1	Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea	49
5.2	Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade	54
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A — Comprovante de aceite do artigo Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing	64
	ANEXO B — Comprovante de submissão do artigo Low-dose of celecoxib accelerates cutaneous wound healing in obesity-prone and obesity-resistant rats	67

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo que reveste externamente o corpo, conferindo uma barreira natural contra o ambiente e exercendo diversas funções protetoras essenciais para o organismo. Quando a sua integridade é perdida, o processo de reparo tecidual é iniciado para recompor a área lesada e restabelecer a sua barreira funcional. Nesse processo há a participação de diversos mediadores, como citocinas e fatores de crescimento que são liberados durante a fase inflamatória e que interagem entre si promovendo a cicatrização.(Singer & Clark, 1999; Gurtner et al., 2008)

As etapas do reparo tecidual podem ser influenciadas por diversos fatores, e nos ratos que apresentam sobrepeso induzido por dieta o processo de cicatrização é retardado principalmente devido ao prolongamento da fase inflamatória.(Nascimento & Costa, 2006) Entretanto, alguns ratos são resistentes a obesidade induzida por dieta.(Lauterio et al., 1994; Perez-Echarri et al., 2008)

As drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINEs) são frequentemente utilizadas para reduzir a inflamação. Essas drogas inibem a via da ciclooxigenase que produz mediadores lipídicos chamados de eicosanóides.(Muller-Decker et al., 2002) Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi investigar a cicatrização cutânea em ratos propensos a obesidade induzida por dieta e em ratos resistentes a dieta e avaliar os efeitos da administração do celecoxibe (inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2)) na cicatrização cutânea destes animais.

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

1.1 Reparo tecidual cutâneo

Como a parte mais externa do corpo, a pele promove uma barreira natural contra o ambiente e exerce várias funções protetoras. Por isso, o processo de reparo tecidual é acionado logo após a ocorrência de uma lesão. Após a perda da integridade da pele, tanto por uma lesão aguda quanto por uma lesão crônica, um processo com várias etapas é iniciado, levando pelo menos a reconstrução parcial do tecido lesado e restabelecendo a barreira funcional da pele.(Singer & Clark, 1999; Gurtner et al., 2008)

O reparo cutâneo representa um processo biológico dinâmico e organizado que necessita da atividade coordenada de vários tipos celulares, citocinas, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular. Em todos os órgãos, a resposta normal dos mamíferos a uma lesão ocorre em três fases distintas, mas que se sobrepõem: inflamação, formação do tecido de granulação e remodelamento. Para que a cicatrização ocorra normalmente, é importante que a sequência temporal desses eventos seja mantida.(Singer & Clark, 1999; Gurtner et al., 2008)

O primeiro estágio do reparo de lesões, a fase inflamatória, ocorre imediatamente após o dano tecidual com a ativação da cascata de coagulação que tem como objetivo restabelecer a homeostase, condições internas estáveis, e promover uma matriz provisória para a migração celular de neutrófilos, monócitos, fibroblastos, entre outras células, até a área lesada. No local da lesão, as células liberam citocinas/quimiocinas que promovem a formação do tecido de granulação. O coágulo formado é constituído de plaquetas, trombina, colágeno, fibronectina e uma série de fatores liberados, como citocinas e fatores de crescimento que iniciam a resposta inflamatória.(Broughton et al., 2006) No processo de reparo de lesões cutâneas, a fase inflamatória é uma etapa altamente dinâmica, complexa e estritamente regulada, sendo uma fase determinante no mecanismo de reparo, estabelecendo um frágil limiar entre as lesões agudas e crônicas, caso essa etapa não evolua normalmente. A resposta inflamatória pode ser subdividida em resposta celular e resposta vascular. No início do processo inflamatório, na resposta vascular, ocorre vasodilatação local, com extravasamento de sangue e líquido no espaço extravascular, caracterizando a formação de um exudado, além do bloqueio da drenagem linfática que pode levar a produção de sinais cardinais, como vermelhidão, inchaço, aquecimento e ativação de fibras neurosensoriais de dor.(Broughton et al., 2006) Essa resposta inflamatória aguda geralmente dura de 24-48 horas e pode persistir por até 2 semanas em alguns casos. Nessa etapa do reparo, na resposta celular, as plaquetas desempenham importante papel na adesão, agregação e ativação de mediadores, que auxiliam na formação

do coágulo, que é fundamental para o restabelecimento da homeostase. Uma função secundária, mas não menos importante das plaquetas, é a liberação de quimioatrativos e fatores de crescimento. Associada a essa resposta, o tráfego de células para o local da inflamação é aumentado pela expressão de moléculas de adesão nas células inflamatórias e nas células endoteliais. Essas células inflamatórias que chegam até o local da lesão, são principalmente, leucócitos polimorfonucleares, que eliminam e fagocitam as bactérias e os componentes danificados da matriz. Essas células são mais atuantes nos estágios iniciais da inflamação. As células mononucleares, como os monócitos, que se transformam em macrófagos no local da lesão, são mais atuantes na resolução da inflamação. Os macrófagos estão entre as células reguladoras mais importantes da inflamação, fagocitando, digerindo e eliminando organismos patogênicos, além de remover os restos teciduais e destruir os neutrófilos remanescentes. Essa migração das células inflamatórias se deve, principalmente, pela liberação de fatores quimioatrativos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), liberados na restauração da homeostase e mediadores secretados pelos mastócitos.(Singer & Clark, 1999; Li et al., 2007)

O segundo estágio do reparo de lesões, a fase de formação do tecido de granulação, ocorre 2-10 dias após a lesão e é caracterizado pela proliferação e pela migração de diferentes tipos celulares. O primeiro evento é a migração de queratinócitos sobre a derme lesada. Os queratinócitos então proliferam e se diferenciam, restaurando finalmente a função de barreira do epitélio. Então novos vasos sanguíneos são formados, e os brotos dos capilares associados aos fibroblastos e aos macrófagos substituem a matriz de fibrina pelo tecido de granulação, que forma o novo substrato para a migração dos queratinócitos nos estágios posteriores do processo de reparo.(Gurtner et al., 2008) Na parte final deste estágio, os fibroblastos, que são atraídos das margens da lesão são estimulados pelos macrófagos, e alguns se diferenciam em miofibroblastos. Os miofibroblastos são células contráteis que ao longo do tempo aproximam as bordas da lesão.(Gabbiani, 2003; Desmouliere et al., 2005) Os fibroblastos e os miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que forma a maior parte da cicatriz.(Werner et al., 2007)

O terceiro estágio do reparo de lesões, a fase de remodelamento, começa 2-3 semanas após a lesão e dura um ano ou mais. Durante este estágio, todos os processos ativados após a lesão desaceleram e param. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose, deixando uma massa que contém poucas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular.(Gurtner et al., 2008) Além disso, durante 6-12 meses, a matriz extracelular é ativamente remodelada de colágeno do tipo III

para colágeno do tipo I.(Lovvorn et al., 1999) Este processo é realizado pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) que são secretadas pelos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e fortalece o tecido reparado. Entretanto, o tecido nunca recupera as propriedades da pele não lesada.(Gurtner et al., 2008) A Figura 1 esquematiza as fases do processo de reparo tecidual.

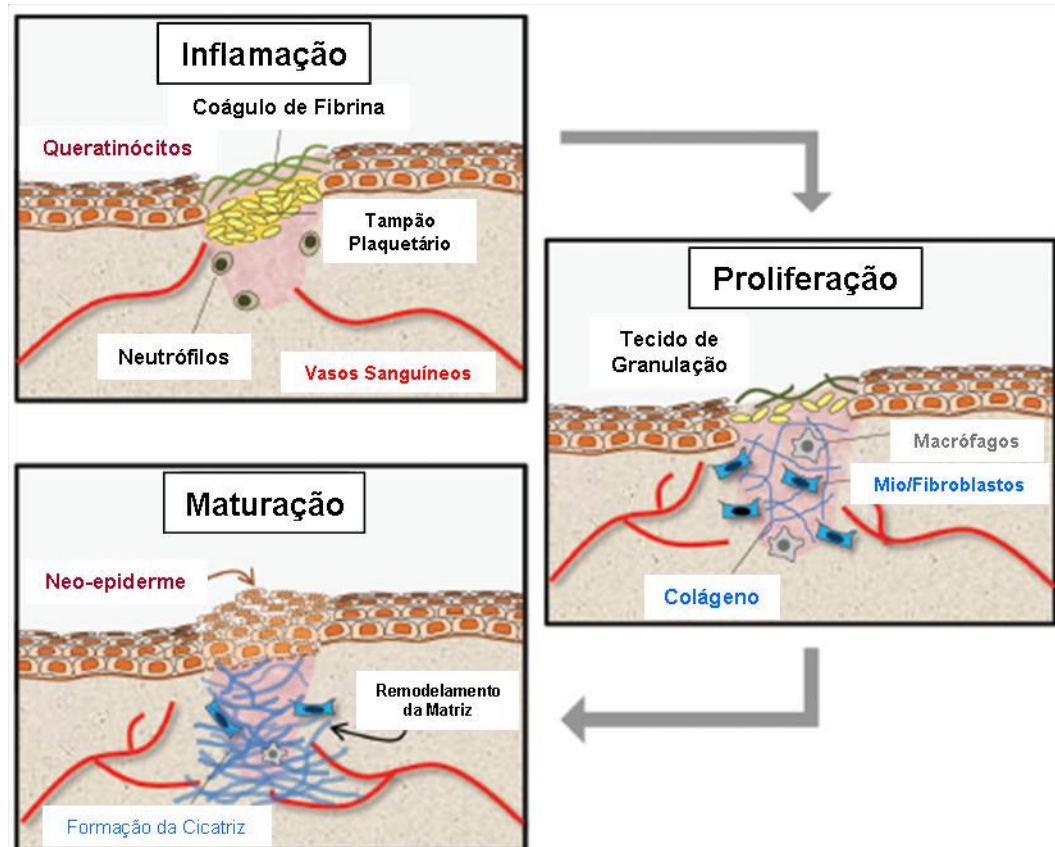


Figura 1. As três fases clássicas do reparo cutâneo. A fase de inflamação ocorre imediatamente após o dano tecidual com a ativação da cascata de coagulação que tem como objetivo a formação de um coágulo e de uma matriz provisória para a migração celular. A fase de proliferação é caracterizada pela proliferação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

A síntese e a liberação de citocinas são necessárias para a cicatrização de lesões, porém quantidades excessivas de citocinas inflamatórias estão presentes em lesões que não cicatrizam como as úlceras e/ou doenças inflamatórias.(Cooney et al., 1997; Trengove et al.,

2000) Experimentos com animais têm mostrado diferentes papéis para as citocinas, dependendo da sua concentração. Estes trabalhos mostram que enquanto na cicatrização normal é necessário algum envolvimento de citocinas inflamatórias, as cicatrizações anormais podem resultar de um aumento na quantidade desses mediadores.(Fajardo et al., 1992; Iocono et al., 2000) As citocinas inflamatórias, em especial o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), regulam a ativação de MMPs na pele humana. A ativação de MMPs pelo TNF- α pode explicar o papel do TNF- α durante o remodelamento tecidual. Entretanto, como grandes quantidades de TNF- α são encontradas em lesões crônicas, a ativação de pro-MMPs mediada pelo TNF- α sugere um mecanismo para o papel destrutivo da inflamação excessiva no tecido.(Han et al., 2001) Nas condições de sobrepeso, ocorre o aumento da massa de tecido adiposo, que é diretamente proporcional ao aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias,(Mohamed-Ali et al., 1998; Sethi & Hotamisligil, 1999) que podem atuar estendendo a fase inflamatória e com isso podem retardar o processo de reparo tecidual cutâneo.

1.2 Ratos propensos e resistentes a obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial que é influenciada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais e pode levar a diversas complicações,(Haslam & James, 2005) entre elas o atraso na cicatrização cutânea.(Nascimento & Costa, 2006) Para o estudo da obesidade, o melhor modelo é aquele que mimetiza as características observadas em seres humanos. Os modelos de obesidade genética podem ou não desenvolver alterações, e consequentemente podem ou não mimetizar as mudanças observadas em seres humanos. Ao contrário, os modelos experimentais de indução de obesidade por dieta parecem ser os mais relevantes com relação à obesidade.(Dobrian et al., 2000) Semelhante aos seres humanos, os ratos também variam em sua propensão de tornarem-se obesos quando alimentos com uma dieta hiperlipídica; entretanto, os fatores que tornam alguns ratos suscetíveis (ratos DIO, *diet-induced obesity*) e outros resistentes (ratos DR, *diet-resistant*) a obesidade induzida por dieta ainda não estão claros.

Os ratos DIO são usados como um modelo animal alternativo para o estudo de importantes interações do *background* genético com o ambiente. A obesidade induzida por

dieta somente se desenvolve quando os ratos são expostos a uma dieta que é moderadamente rica em gordura e em energia. Desta forma, ela é análoga a muitos tipos de obesidade humana.(Levin & Routh, 1996) Além disso, existem poucos estudos relatados em pacientes em que a mutação no gene da leptina ou no gene do receptor da leptina pode explicar a obesidade, portanto o modelo DIO reproduz melhor a obesidade humana do que os modelos genéticos de obesidade.(Moraes et al., 2003)

Vários estudos em roedores têm mostrado diferentes respostas a dietas hiperlipídicas.(Lauterio et al., 1994; Perez-Echarri et al., 2008) Aproximadamente metade dos ratos ganha peso rapidamente e desenvolve a obesidade induzida por dieta, enquanto que a outra metade ganha peso de forma semelhante ou menor do que os ratos alimentados com dieta padrão e são caracterizados como resistentes a obesidade. Embora seja conhecido que o sobrepeso induzido por dieta hiperlipídica atrasa a cicatrização cutânea através do prolongamento da fase inflamatória,(Nascimento & Costa, 2006) o padrão de cicatrização de indivíduos que se alimentam de dieta obesogênica, mas são resistentes ao desenvolvimento da obesidade, ainda não é conhecido.

1.3 Prostaglandinas

Diversos mediadores são produzidos na fase inflamatória do processo de reparo tecidual, entre eles, as prostaglandinas que são mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos com 20 carbonos pela ação da enzima ciclooxigenase (COX). As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, incluindo a regulação do tônus vascular, fertilidade, função plaquetária, biologia tumoral e inflamação.(Diez-Dacal & Perez-Sala, 2010) As prostaglandinas estão entre os mediadores liberados logo no início da reação inflamatória,(Colville-Nash & Gilroy, 2001) atuando na vasodilatação, febre e na regulação do fluxo sanguíneo. Os ácidos graxos que servem de substrato para a ação da COX são liberados dos fosfolípidos da membrana pelas fosfolipases. A COX é uma enzima bifuncional que produz sequencialmente a prostaglandina G₂ (PGG₂) e a prostaglandina H₂ (PGH₂) através de uma reação de duas etapas que envolve a ciclooxigenação e a peroxidação dos ácidos graxos, que é principalmente o ácido araquidônico. A PGH₂, por sua vez, é transformada por várias sintases em prostaglandinas e tromboxanas. A tromboxana A₂ (TXA₂) é o principal produto da via da COX nas plaquetas, a prostaglandina E₂ (PGE₂) é

sintetizada em diversos tipos celulares. A prostaglandina I_2 (PGI_2), também chamada de prostaciclina, é sintetizada principalmente nas células endoteliais e a prostaglandina D_2 (PGD_2) é o principal produto da via da COX em vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos ativados.(Funk, 2001; Gonzalez-Periz & Claria, 2007)

As prostaglandinas possuem um papel crítico na inflamação e por muitos anos, a COX e os seus produtos foram considerados principalmente agentes pró-inflamatórios. A utilização de drogas anti-inflamatórias e de modelos animais geneticamente modificados, deficientes em certas PG sintases ou em receptores de PG, têm evidenciado papéis positivos das prostaglandinas na resposta inflamatória, funcionando na verdade como moduladoras da inflamação.(Narumiya, 2009) Portanto, a COX e as PG sintases são alvos-chave para a ação dos compostos anti-inflamatórios e grandes esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de inibidores. Das enzimas desta família, a COX-2 é considerada a principal forma envolvida na patogênese da inflamação, devido ao fato de que ela não é detectada em grandes quantidades na maioria dos tecidos, mas a sua expressão é fortemente induzida por estímulos pro-inflamatórios.(Perez-Sala & Lamas, 2001) Este fato, junto com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais dos AINEs que agem a partir da inibição da COX-1, estimulou a busca de inibidores específicos da COX-2.(Diez-Dacal & Perez-Sala, 2010) A Figura 2 demonstra a síntese das prostaglandinas.

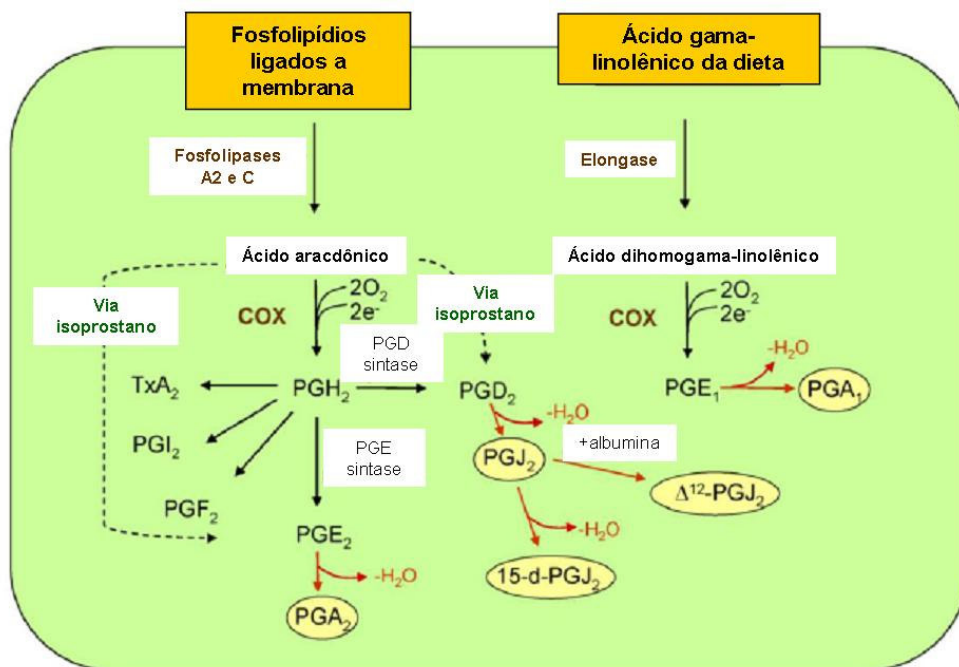


Figura 2. As vias de síntese dos prostanóides. Os prostanóides são mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico. Através da ação das

fosfolipases sobre os fosfolipídios da membrana, o ácido araquidônico é liberado para servir de substrato para a COX. A COX produz sequencialmente a PGG₂ e a PGH₂, sendo esta última transformada por várias sintases em prostaglandinas e tromboxanas. Modificado de Díez-Dacal e Pérez-Sala, 2010.(Diez-Dacal & Perez-Sala, 2010)

1.4 Ciclooxygenase

A COX-1 e a COX-2 regulam pontos-chave na síntese de prostaglandinas. A COX-2 é a isoforma induzível e foi descoberta no início dos anos 1990.(O'banion et al., 1991; Hla & Neilson, 1992) Mais recentemente, uma terceira isoforma, chamada de COX-3, foi identificada como um *splice* variante da COX-1.(Shaftel et al., 2003)

A COX-1 é uma proteína transmembrana, que reside na membrana do retículo endoplasmático e apresenta um longo canal hidrofóbico como sítio ativo.(Botting, 2006) A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e tem um papel importante na produção de prostaglandinas que controlam os processos fisiológicos normais. Além disso, a COX-1 é responsável pela manutenção da síntese de prostaglandinas.(Merlie et al., 1988)

A COX-2, assim como a COX-1, é uma proteína transmembrana localizada na membrana do retículo endoplasmático, assim como, na membrana nuclear.(Vane et al., 1998) Apesar da diferença genética entre as isoformas da COX-1 e COX-2, elas apresentam uma homologia de 60% em relação aos aminoácidos, além de apresentarem massa molecular semelhante de 70 kD e comprimento idêntico. Estudos da estrutura terciária da COX-1 e COX-2 demonstraram que os resíduos que formam o canal de ligação para o substrato, o sítio catalítico e os resíduos imediatamente adjacentes são idênticos, exceto por duas pequenas variações em que ocorre uma troca da isoleucina na COX-1 pela valina na COX-2 nas posições 434 e 523.(Warner & Mitchell, 2004) Essa substituição resulta em um sítio de ligação para o substrato maior e mais flexível na COX-2 (25% maior) em relação a COX-1, sugerindo que a COX-2 pode competir melhor do que a COX-1 pelo ácido araquidônico. Ao contrário da COX-1, a COX-2 não é detectada em grande quantidade na maioria dos tecidos normais, mas é induzida por vários estímulos inflamatórios e mitogênicos, participando assim em processos inflamatórios e no controle do crescimento celular.(Vane et al., 1998)

A COX-3 foi recentemente descoberta em tecidos de humanos e de caninos, com maior incidência no cérebro e no coração.(Chandrasekharan et al., 2002) A COX-3 é

considerada um *splice* variante do gene da COX-1.(Shaftel et al., 2003) Essa isoforma é transcrita pelo mesmo gene da COX-1 e apresenta diferença somente na retenção do íntron 1 no seu RNA mensageiro. Com relação a proteína, a COX-3 difere da COX-1 pela inserção de 30 a 34 aminoácidos, presentes no peptídeo sinal hidrofóbico, que não é clivado nessa isoforma. Sugere-se que a COX-3 tem um papel importante no mecanismo central da dor e da febre, por ser seletivamente inibida por drogas analgésicas/antipiréticas.(Chandrasekharan et al., 2002)

1.5 Ciclooxigenase e prostaglandinas na pele

Na pele a COX-1 encontra-se presente por toda a epiderme,(Lee et al., 2003) principalmente, nos queratinócitos basais e suprabasais e nos folículos pilosos.(Scholz et al., 1995) A COX-2 está presente constitutivamente, principalmente, nos queratinócitos basais.(Leong et al., 1996) Uma lesão incisional na pele de rato, induz a expressão de COX-2 dentro de 12 horas, que pode persistir por até 3 dias após a lesão. Nesse caso, a expressão da COX-2 é observada nos queratinócitos basais, nas células periféricas da bainha externa do folículo piloso, nas células semelhantes a fibroblastos e nos capilares próximos a margem da lesão.(Lee et al., 2003) Em lesões excisionais cutâneas de camundongos, observou-se uma expressão bifasicamente regulada e oposta entre a COX-1 e a COX-2. Assim como visto em ratos, a expressão protéica da COX-1 diminui rapidamente após a lesão, enquanto que a expressão protéica da COX-2 é expressivamente induzida nessa etapa. A expressão protéica da COX-2 é observada em neutrófilos, logo após a lesão, e uma intensa expressão é observada em macrófagos e vasos sanguíneos localizados no tecido de granulação, além de ser observada nos queratinócitos das margens da lesão. Cinco dias após a lesão, a expressão protéica da COX-1 é detectada nas margens da lesão, em células fibroblásticas do tecido de granulação.(Kampfer et al., 2003)

Na pele lesada, as prostaglandinas produzidas via COX-1 e COX-2 desempenham uma série de funções fisiológicas e fisiopatológicas. A PGD_2 auxilia na recuperação da barreira da pele,(Honma et al., 2005) além de promover a diferenciação dos queratinócitos(Evans et al., 1993) e o ciclo do crescimento folicular.(Neufang et al., 2001) PGI_2 é um potente vasodilatador e é o primeiro eicosanóide a ser produzido pelo endotélio vascular e pelas células musculares lisas. As PGD_2 e PGE_2 estão relacionadas como as principais prostaglandinas responsáveis pela inflamação, uma vez que elas são encontradas em

abundância nos tecidos e em exudados, e apresentam atividades pró-inflamatórias *in vivo*.(Sugimoto et al., 2006) Além disso, as PGE₂ e PGD₂ desempenham funções importantes na formação do edema(Chan et al., 1999) e na dor relatada na inflamação.(Gupta et al., 2002) A COX-2 também tem recebido atenção por estar envolvida em doenças em que as condições inflamatórias estão alteradas, como na artrite reumatóide, osteoartrite,(Hochberg, 2002) doenças cardiovasculares e em processos carcinogênicos.(Fosslien, 2000) Nessas condições a COX-2 é rapidamente induzida em resposta a um estímulo inflamatório, produzindo prostaglandinas que vão controlar vários aspectos da inflamação, como o tônus vascular, a infiltração e a ativação das células inflamatórias.(Wilgus et al., 2000)

1.6 Anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs)

Para reduzir os efeitos das reações inflamatórias como dor, febre, inchaço, entre outros sintomas, a utilização de drogas AINEs tem alcançado proporções cada vez maiores, sendo considerada um dos fármacos mais amplamente utilizados no mundo.(Muller-Decker et al., 2002) Essas drogas apresentam um efeito analgésico, antipirético e anti-inflamatório, entretanto, sua potência terapêutica pode variar amplamente.(Mattia & Coluzzi, 2005) Todos os AINEs clássicos são capazes de inibir COX-1 e COX-2, afetando predominantemente a COX-1, enquanto que os inibidores da COX-2 se ligam seletivamente a COX-2. Todos os inibidores da COX-2 provocam uma inibição tempo dependente da COX-2, mas não inibem a COX-1.(Smith et al., 2000) Sabe-se que aproximadamente 1% dos usuários crônicos de AINEs, como os pacientes com artrite ou outras doenças inflamatórias crônicas, desenvolvem úlceras gástricas ou complicações gastrointestinais. Estes efeitos colaterais podem ser explicados pela inibição da COX-1 e representa um importante problema de saúde pública. Ao contrário, os inibidores da COX-2 não têm efeito sobre a COX-1, mas como inibidores da enzima responsável pela produção da maior parte das prostaglandinas inflamatórias, eles são fármacos muito eficazes.(Simon et al., 1999) A Figura 3 demonstra a via de síntese dos prostanóides e onde os inibidores da COX-2 atuam.

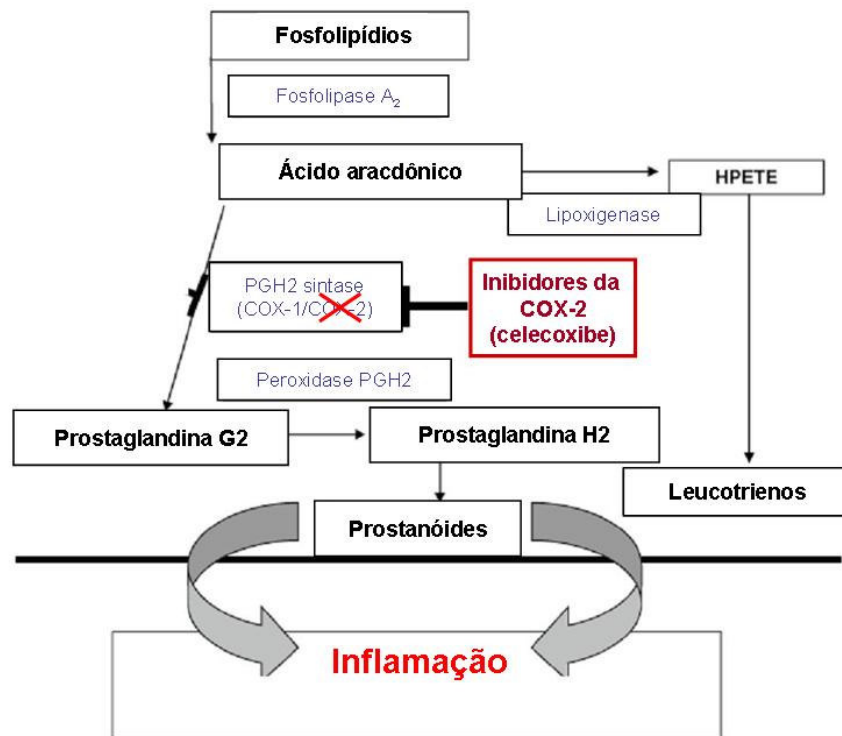


Figura 3. Via de síntese dos prostanóides e local de atuação dos inibidores da COX-2. Os inibidores seletivos da COX-2 impedem a ligação da COX-2 a PGH₂, bloqueando a formação dos prostanóides por esta enzima. Modificado de Anwar et al, 2010.(Anwar et al., 2010)

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as alterações macro e microscópicas provocadas pela dieta hiperlipídica no processo de cicatrização cutânea de ratos Wistar propensos e resistentes a obesidade. E a participação do tratamento com o celecoxibe (droga anti-inflamatória não-esteróide, inibidor seletivo da enzima ciclooxygenase 2) na cicatrização cutâneas destes animais.

Objetivo Específico

- Comparar a retração da lesão e a formação da neo-epiderme;
- Avaliar o infiltrado inflamatório;
- Avaliar a mobilização de mastócitos;
- Avaliar o dano oxidativo;
- Avaliar a diferenciação miofibroblástica;
- Avaliar o remodelamento dos vasos sanguíneos;
- Avaliar a deposição de colágeno;
- Analisar marcadores inflamatórios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea

3.1.1 Animais Experimentais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA/160/2006). Após o desmame (21 dias), ratos Wistar machos pesando entre 30-60 g começaram o protocolo da dieta com livre acesso a comida e a água durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22°C) sob um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro. Três grupos com pelo menos 7 animais cada foram estudados em 2 tempos diferentes (57 ratos começaram o experimento; 50 ratos foram incluídos no estudo; 7 ratos foram excluídos do estudo como explicado a seguir).

3.1.2 Protocolo da Dieta

Os ratos foram aleatoriamente divididos nos grupos controle (C, n=17) e dieta (n=40). O grupo controle foi alimentado com ração comercial (23% de proteína, 71% de carboidrato, 6% de gordura, [porcentagem do peso da dieta], 18 kJ/g) (Nuvital; Nuvilab[®], Colombo, PR, Brasil), e o grupo dieta foi alimentado com uma dieta rica em gordura saturada, conhecida por induzir obesidade em animais suscetíveis (15% de proteína, 55% de carboidrato, 30% de gordura, [porcentagem do peso da dieta], 23 kJ/g, aproximadamente 45% da energia ingerida na forma de gordura). (Aoyama et al., 2000; Nascimento & Costa, 2006) A fonte de gordura foi a gordura hidrogenada vegetal, uma gordura semi-sólida constituída de óleo de soja hidrogenado que contém 30% de ácidos graxos trans (Primor[®], Florianópolis, SC, Brasil). O consumo de comida foi medido diariamente, e o peso corporal foi registrado semanalmente. Os ratos em dieta obesogênica foram separados com base no ganho de peso corporal no final da 20ª semana; os ratos com maior ganho de peso foram classificados como ratos DIO (n=17, ganho de peso corporal ≥ 350 g) e os ratos com menor ganho de peso foram classificados como ratos DR (n=16, ganho de peso corporal ≤ 300 g). Os ratos restantes (n=7) foram excluídos do estudo porque eles estavam entre os dois limites de ganho de peso (Fig. 4). Os ratos DIO e DR permaneceram com a dieta obesogênica até o final do experimento.

Figura 4

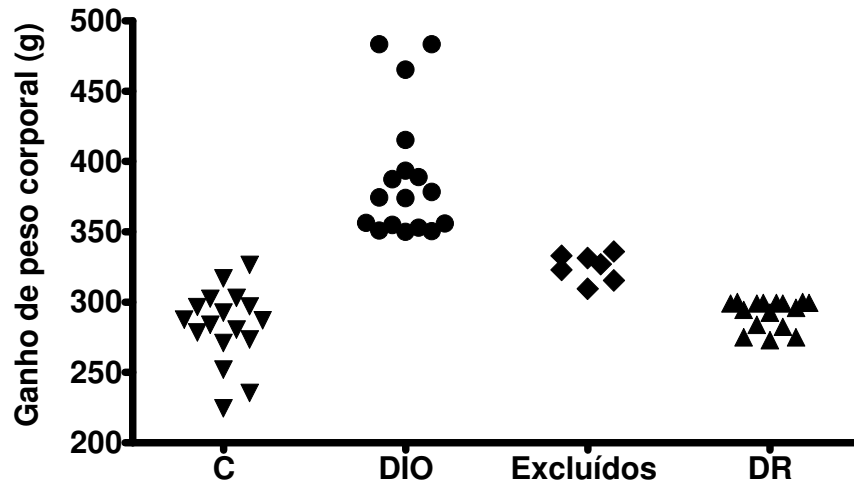


Fig. 4. Distribuição do ganho de peso corporal de todos os animais ao final de 20 semanas de acesso livre a comida. O grupo controle (C) era composto por 17 animais, o grupo obeso induzido por dieta (DIO) era composto por 17 animais, o grupo resistente a dieta (DR) era composto por 16 animais e 7 animais foram excluídos do experimento.

3.1.3 Modelo de Lesão e Análises Macroscópicas

Após 20 semanas de dieta (dia 0), os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (5 mg/kg) e xilazina (2 mg/kg). Após a depilação do dorso, uma lesão excisional total (1 cm²) foi feita no nível do panículo carnoso. As lesões não foram suturadas ou cobertas e cicatrizaram por segunda intenção. O desconforto induzido por este protocolo de lesão foi mínimo, por isso não foram necessários analgésicos. Para avaliar a contração e a reepitelização da lesão, uma folha plástica transparente foi colocada sobre cada lesão, e as suas margens foram desenhadas.(Nascimento & Costa, 2006; Amadeu et al., 2008) A área lesada foi medida e fotografada logo após a lesão, e semanalmente até a eutanásia, sem a remoção da crosta. A reepitelização foi medida 7 e 14 dias após a lesão. Após serem escaneadas, as áreas das lesões foram medidas utilizando o software de imagem KS400 (Zeiss-Vision; Oberkochen, Alemanha). Os dados são expressos como porcentagem da área inicial lesada e como porcentagem de área lesada reepitelizada.

3.1.4 Teste de Tolerância a Glicose Oral (TTGO)

No final de 20 semanas de dieta, após 12-14 h de jejum, mas antes da lesão, a concentração de glicose foi determinada no sangue da ponta da cauda (tempo 0) em 6 animais selecionados aleatoriamente em cada grupo, e em seguida cada rato recebeu glicose (2 g/kg) através de gavagem. As amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda em 15, 30, 60 e 120 min após o desafio com a glicose.(Anwer et al., 2008) A glicemia foi avaliada usando uma fita reagente (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os resultados do TTGO são expressos como áreas integradas sob a curva para a glicose durante 120 min (AUGg), calculada utilizando a regra do trapézio: $AUC = (C1 + C2) (2)^{-1} \times (t2 - t1)$.(Bhatt & Makwana, 2008)

3.1.5 Coleta do Tecido e Análises Microscópicas

Os ratos foram mortos pela exposição ao CO₂ 7 (C = 7, DIO = 8, DR = 7) ou 14 (C = 10, DIO = 9, DR = 9) dias após a lesão. Um fragmento de lesão e pele normal adjacente foi fixado em formol e incluído em parafina, e outro fragmento da lesão foi congelado (-70°C). O tecido adiposo branco do depósito retroperitoneal foi cuidadosamente removido, pesado e congelado (-70°C).

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para quantificar o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no tecido de granulação; 10 campos aleatórios (0,02 mm²) por animal foram analisados utilizando uma objetiva de 100x (Zeiss Primo Star;

Zeiss Vision; Oberkochen, Alemanha). Os cortes também foram corados com azul de toluidina para avaliar o número de mastócitos; entre 6 e 10 campos aleatórios por animal ($0,15 \text{ mm}^2$) foram analisados na região profunda do tecido de granulação, utilizando uma objetiva de 40x (Zeiss Primo Star). Os resultados são expressos como células/ mm^2 , e as quantificações foram realizadas às cegas e repetidas sem diferença significativa entre elas.

Além disso, os cortes foram corados com vermelho de picro Sirius e observados sob polarização para avaliar a organização das fibras colágenas. Fibras colágenas espessas, características de tecidos com alta densidade de colágeno, aparecem fortemente birrefringentes e amarelo-avermelhadas, enquanto que as fibras colágenas finas, indicativas de tecidos com baixa densidade de fibras colágenas, são fracamente birrefringentes e esverdeadas.

3.1.6 Imunohistoquímica e Quantificações

Para a quantificação de macrófagos CD68-positivos, células 4-hidroxinonenal-positivas (4-HNE), miofibroblastos e vasos sanguíneos, os cortes foram incubados respectivamente com anti-CD68 de camundongo (Serotec Inc.; Raleigh, NC; 1:500), anti-4-HNE de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Califórnia, EUA; 1:4000) ou anti-alfa actina de músculo liso de camundongo (DAKO; Carpinteria, CA; 1:1000). Para a recuperação antigênica, os cortes foram digeridos com 0,1% de tripsina (Difco Laboratories; Detroit, MI) antes da marcação. Em seguida, os cortes foram incubados com 3% de H_2O_2 em metanol para inibir a atividade da peroxidase endógena e então foram incubados com os anticorpos primários. Após lavagens, os anticorpos primários anti-CD68 e anti-alfa actina de músculo liso foram detectados utilizando o sistema EnVision[®] (DAKO), o anticorpo anti-4-HNE foi detectado utilizando um anticorpo de burro biotilado anti-IGg de cabra (Santa Cruz Biotechnology) e estreptavidina HRP (DAKO). A diaminobenzidina foi usada como cromógeno. Os cortes foram contrastados com hematoxilina. Os cortes dos controles negativos, onde os anticorpos primários foram omitidos, não apresentaram marcação.

Para quantificar os macrófagos CD68-positivos, 15 campos aleatórios ($3636 \mu\text{m}^2$) por animal foram analisados no tecido de granulação usando uma objetiva de 40x. Para isto, um sistema de vídeomicroscópio (microscópio AxioStar Plus Zeiss, videocâmera Pixelink e monitor Intelbras) foi utilizado. Os dados são expressos como a média de macrófagos CD68-positivos/ mm^2 . Para quantificar o número de células 4-HNE-positivas, visto que o 4-HNE é um produto principal da peroxidação lipídica endógena, (Esterbauer et al., 1991) 15 campos

aleatórios ($0,02 \text{ mm}^2$) por animal foram analisados usando uma objetiva de 100x (Zeiss Primo Star; Zeiss Vision; Oberkochen, Alemanha). Os resultados são expressos como células/ mm^2 .

Como os métodos estereológicos são ferramentas precisas que permitam a aquisição de informações sobre estruturas tridimensionais baseadas em observações feitas em cortes bidimensionais,(Baddeley et al., 1986; Gundersen et al., 1988) a distribuição quantitativa de miofibroblastos e vasos sanguíneos (expressando alfa-actina de músculo liso) foi avaliada utilizando este método (contagem de pontos).(Nascimento & Costa, 2006) Os vasos foram identificados pela presença de hemácias dentro da sua luz ou pela marcação positiva para alfa-actina de músculo liso na sua parede (para confirmar a presença de células musculares lisas ou pericitos).(Nascimento & Costa, 2006) Para esta quantificação, 8 campos aleatórios por animal foram analisados utilizando uma objetiva de 40x para os miofibroblastos, e 5 campos aleatórios por animal foram analisados na região superficial e profunda do tecido de granulação utilizando uma objetiva de 20x para os vasos sanguíneos. Para as análises, um sistema de vídeomicroscópio (microscópio Axiostar Plus Zeiss, videocâmera Pixelink e monitor Intelbras) foi utilizado. Os dados são expressos como densidade de volume de miofibroblastos ($V_v[\text{miofibroblastos}\%]$) e de vasos sanguíneos ($V_v[\text{vasos sanguíneos}\%]$) nas regiões superficial e profunda.

Todas as quantificações foram realizadas às cegas e foram reproduzidas sem diferença significativa.

3.1.7 Análises Bioquímicas

A deposição de colágeno foi quantificada pelo ensaio para a hidroxiprolina nas lesões.(Souza et al., 2006) O tecido seco e sem os lipídios (3,3–11,0 mg) foi hidrolisado em HCl 6 M por 18 h a 118°C . O hidrolisado foi então diluído com água destilada, neutralizado com NaOH 6 M e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. A quantidade de hidroxiprolina foi medida neste hidrolisado como descrito previamente.(Woessner, 1961) Resumidamente, alíquotas do hidrolisado (80 μl) foram misturadas com 40 μl de cloramina-T (0,05 M) (Merck & Co., Inc.; Whitehouse Station, NJ) e incubados por 20 min a 25°C . Em seguida, 40 μl de ácido perclórico (3,17 M) (Vetec; Rio de Janeiro, Brasil) e 40 μl de 4-dimetilamino benzaldeído (Merck & Co) foram adicionados e incubados 20 min a 60°C . O desenvolvimento da cor foi lido em espectrofotômetro em 550 nm. As concentrações de hidroxiprolina foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de L-4 hidroxiprolina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Os dados são expressos como ng de hidroxiprolina por mg de tecido.

A quantidade de nitrito no lisado da lesão foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado na reação de Griess.(Green et al., 1982) A detecção limite para o nitrito utilizando este método é 1,0–5,0 μM . Uma alíquota de cada amostra (100 μl) foi misturada e incubada com 100 μl de reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico e 0,1% dihidroclorato de naftilenodiamida em água) em temperatura ambiente por 10 min. O desenvolvimento da cor foi então lido em espectrofotômetro em 550 nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de nitrito de sódio (0,1 a 100 μM). Os dados são expressos como μmol de nitrito por μg de proteína total.

Todas as análises foram feitas em triplicata e reproduziram sem diferença significativa.

3.1.8 ELISA

Fragmentos de tecido adiposo retroperitoneal congelados (0,5 g) foram homogeneizados em 1 ml de PBS contendo 0,5% de Tween 20 e inibidores de proteases. As amostras de gordura retroperitoneal foram submetidas à análise do ELISA para TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O kit do ELISA para TNF- α contém os componentes chave necessários para a avaliação quantitativa de TNF- α dentro de um intervalo de 32–2000 pg/ml. As amostras foram quantificadas usando uma curva padrão (0 a 2 ng/ml). Os dados são expressos como pg de TNF- α por g de tecido adiposo retroperitoneal.

3.1.9 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (massa corporal, gordura retroperitoneal, contração da lesão, reepitelização, glicemia), o teste t não-pareado (quantidade de hidroxiprolina e de nitrito, e ELISA) ou o teste Mann-Whitney para os dados que não apresentam uma distribuição normal (quantificação das células inflamatórias e das células 4-HNE-positivas e as análises estereológicas) utilizando o software GraphPad InStat versão 3.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são mostrados como médias com o erro padrão (EPM).

3.2 Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade

3.2.1 Modelo Experimental

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA/160/2006). Após o desmame (21 dias), ratos Wistar machos pesando entre 30-60 g foram divididos nos grupos controle (C, n=19) e dieta (n=39). O grupo controle foi alimentado com ração comercial (23% de proteína, 71% de carboidrato, 6% de gordura, 18 kJ/g) (Nuvital; Nuvilab[®], Colombo, PR, Brasil), e o grupo dieta foi alimentado com uma dieta rica em gordura saturada, conhecida por induzir obesidade em animais suscetíveis (15% de proteína, 55% de carboidrato, 30% de gordura, 23 kJ/g). (Nascimento & Costa, 2006) O peso corporal foi registrado semanalmente e no final da 19ª semana o grupo dieta foi dividido com base no ganho de peso corporal, os ratos com maior ganho de peso foram classificados como ratos DIO (n=20) e os ratos com menor ganho de peso foram classificados como ratos DR (n=19). Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22°C) sob um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro com livre acesso a comida e a água.

3.2.2 Tratamento com a Droga e Modelo da Lesão

Os grupos tratados receberam celecoxibe (Celebra, Pfizer Ltda, São Paulo, Brasil) 5 ou 10 mg/kg/dia dissolvido em água através de gavagem. (Muscara et al., 2000; Kampfer et al., 2003) O tratamento começou dois dias antes da lesão e continuou diariamente até sete dias após a lesão, quando os animais foram mortos pela exposição ao CO₂. Os grupos não tratados somente receberam o veículo. Na 20ª semana, os ratos foram anestesiados, o dorso foi depilado e uma lesão excisional total (1 cm²) foi feita. Para avaliar a contração da lesão, uma folha plástica transparente foi colocada sobre cada lesão, e as suas margens foram desenhadas. (Nascimento & Costa, 2006) A área lesada foi medida e fotografada logo após a lesão e 7 dias após a lesão. A área reepitelizada não foi avaliada porque não foi observada neste período. Após serem escaneadas, as áreas das lesões foram medidas utilizando o software de imagem KS400 (Zeiss-Vision; Oberkochen, Alemanha). Os dados são expressos como porcentagem da área inicial lesada.

3.2.3 Teste de Tolerância a Glicose Oral (TTGO)

No dia da eutanásia, após 12-14 h de jejum, a concentração de glicose foi determinada e em seguida cada rato recebeu glicose (2 g/kg) através de gavagem. Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda em 15, 30, 60 e 120 min após o desafio com a glicose. (Anwer et al., 2008) A glicose foi avaliada usando uma fita reagente (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os resultados do TTGO são expressos como áreas integradas sob a curva (AUGg).

3.2.4 Processamento do Tecido e Colorações

Os fragmentos das lesões foram fixados em formol e incluídos em parafina, e outro fragmento foi congelado (-70°C). O tecido adiposo branco do depósito retroperitoneal foi cuidadosamente removido e pesado. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para quantificar o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no tecido de granulação; 10 campos aleatórios ($0,02\text{ mm}^2$) por animal foram analisados utilizando uma objetiva de 100x (Zeiss Primo Star; Zeiss Vision; Oberkochen, Alemanha). Os cortes também foram corados com azul de toluidina para avaliar o número de mastócitos; 10 campos aleatórios por animal ($0,15\text{ mm}^2$) foram analisados na região profunda do tecido de granulação, utilizando uma objetiva de 40x (Zeiss Primo Star). Os resultados são expressos como células/ mm^2 .

3.2.5 Imunohistoquímica e Quantificações

Para a avaliação de macrófagos CD68-positivos, células 4-hidroxinonenal-positivas (4-HNE), miofibroblastos e vasos sanguíneos, os cortes foram incubados respectivamente com anti-CD68 de camundongo (Serotec Inc.; Raleigh, NC; 1:500), anti-4-HNE de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Califórnia, EUA; 1:1000) ou anti-alfa actina de músculo liso de camundongo (DAKO; Carpinteria, CA; 1:100). Para a recuperação antigênica, os cortes foram digeridos com 0,1% de tripsina (Difco Laboratories; Detroit, MI) antes da marcação. Em seguida, os cortes foram incubados com 3% de H_2O_2 em metanol para inibir a atividade da peroxidase endógena e então foram incubados com os anticorpos primários. Após lavagens, os anticorpos primários anti-CD68 e anti-alfa actina de músculo liso foram detectados utilizando o sistema EnVision[®] (DAKO), o anticorpo anti-4-HNE foi detectado utilizando o anticorpo de galinha anti-cabra IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology). A diaminobenzidina foi usada como cromógeno. Os cortes foram contrastados com hematoxilina. Os controles negativos, nos cortes onde os anticorpos primários foram omitidos, não apresentaram marcação.

Para quantificar os macrófagos CD68-positivos, 15 campos aleatórios ($3636 \mu\text{m}^2$) por animal foram analisados no tecido de granulação usando uma objetiva de 40x. Para isto, um sistema de vídeomicroscópio (microscópio Axiostar Plus Zeiss, videocâmera Pixelink e monitor Intelbras) foi utilizado. Para quantificar o número de células 4-HNE-positivas, visto que o 4-HNE é um produto principal da peroxidação lipídica endógena, (Esterbauer et al., 1991) 15 campos aleatórios ($0,02 \text{ mm}^2$) por animal foram analisados usando uma objetiva de 100x (Zeiss Primo Star; Zeiss Vision; Oberkochen, Alemanha). Os resultados são expressos como células/ mm^2 .

A densidade de volume dos miofibroblastos e dos vasos sanguíneos (expressando alfa-actina de músculo liso) foi avaliada utilizando um método estereológico de contagem de pontos. (Romana-Souza et al., 2008) Para esta quantificação, 10 campos aleatórios por animal foram analisados utilizando uma objetiva de 40x para os miofibroblastos, e uma objetiva de 20x para os vasos sanguíneos. Para as análises, um sistema de vídeomicroscópio (microscópio Axiostar Plus Zeiss, videocâmera Pixelink e monitor Intelbras) foi utilizado. Os dados são expressos como densidade de volume de miofibroblastos ($Vv[\text{miofibroblastos}]\%$) e de vasos sanguíneos ($Vv[\text{vasos sanguíneos}]\%$).

3.2.6 Ensaio para a Hidroxiprolina

A deposição de colágeno foi quantificada pelo ensaio para a hidroxiprolina nas lesões congeladas. (Souza et al., 2006) O tecido seco e sem os lipídios (2,0–13,5 mg) foi hidrolisado em HCl 6 M por 18 h a 118°C . O hidrolisado foi então diluído com água destilada, neutralizado com NaOH 6 M e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. A quantidade de hidroxiprolina foi medida neste hidrolisado como descrito previamente. (Woessner, 1961) Os dados são expressos como ng de hidroxiprolina por mg de tecido.

3.2.7 Análises Estatísticas

Os dados (média \pm EPM) foram analisados utilizando o one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para os dados sem distribuição normal, utilizando o software GraphPad InStat versão 3.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea

4.1.1 Peso Corporal e Peso da Gordura Retroperitoneal

A média inicial do peso corporal dos grupos C, DIO e DR não foram diferentes (Tabela 1). Na semana 6, o grupo DIO ($219,4 \pm 6,3$ g) apresentou maior média de peso corporal do que o grupo DR ($188,5 \pm 6,6$ g; $P < 0,01$, dados não mostrados), e o peso corporal permaneceu maior durante todo o período experimental (Tabela 1). Na semana 11, o peso corporal do grupo DIO ($347,5 \pm 14,7$ g) foi maior do que o grupo C ($306,5 \pm 3,7$ g; $P < 0,01$, dados não mostrados) e permaneceu maior até o final do experimento (Tabela 1). No dia em que a lesão foi realizada (semana 20, d0); o peso corporal foi respectivamente 28,8% e 24,6% maior no grupo DIO comparado aos grupos C e DR. O grupo DIO consumiu mais alimento do que o grupo DR; entretanto, não houve diferença no consumo de alimento entre os grupos C e dieta obesogênica (DIO e DR) (Tabela 1). Além disso, o grupo DIO consumiu significativamente mais energia por dia do que os grupos C e DR durante o estudo (Tabela 1), e o grupo DR consumiu significativamente mais energia por dia do que o grupo C (Tabela 1).

Como mostrado, na Tabela 1, a massa de gordura retroperitoneal foi maior no grupo DIO do que nos grupos C e DR (+518,2% e +91,5%, respectivamente, $P < 0,05$). A massa de gordura retroperitoneal do grupo DR foi maior do que no grupo C (+222,7%, $P < 0,05$). A porcentagem de gordura retroperitoneal apresentou o mesmo padrão de resultado (Tabela 1).

4.1.2 Glicemia de Jejum e TTGO

Não houve diferença entre a média de glicemia de jejum dos grupos (Fig. 5A). Quinze minutos após o TTGO, o nível de glicemia do grupo DR foi menor do que os níveis de glicemia dos grupos C e DIO ($P < 0,05$; Fig. 5A). Após o desafio da glicose, os níveis glicêmicos após um período de 120 min foram maiores no grupo DIO do que nos grupos C e DR. A AUCglicose foi significativamente maior no grupo DIO comparado aos grupos C e DR ($P < 0,05$; Fig. 5B).

Tabela 1. Peso corporal, ingestão diário de comida, depósito de gordura retroperitoneal, contração e reepitelização de lesão nos grupos C, DIO e DR

(Média ± EPM de pelo menos 7 animais por grupo)

Grupos	C	DIO	DR
Parâmetros	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM
Peso corporal inicial (g)	47,5 ± 2,3	45,5 ± 1,3	38,7 ± 2,6
Peso corporal final (g)	323,4 ± 8,7 ^a	414,4 ± 16,7 ^b	332,3 ± 7,5 ^a
Consumo de comida (g/d)	18,8 ± 0,6 ^{a,b}	19,7 ± 1,1 ^a	17,1 ± 0,9 ^b
Consumo de comida (kJ/d)	339,1 ± 11,4 ^a	453,6 ± 25,1 ^b	393,4 ± 19,8 ^c
Gordura retroperitoneal (g)	2,2 ± 0,5 ^a	13,6 ± 1,4 ^b	7,1 ± 0,5 ^c
Gordura retroperitoneal (% do peso corporal final)	0,7 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,2 ^b	2,1 ± 0,1 ^c
Área da lesão em d7 (% da área inicial)	57,3 ± 1,6 ^a	88,8 ± 1,8 ^b	86,3 ± 2,7 ^b
Área da lesão em d14 (% da área inicial)	26,0 ± 1,0	28,7 ± 1,1	26,7 ± 0,8
Área da lesão reepitelizada em d7 (%)	3,6 ± 1,9	0,0 ± 0,0	1,4 ± 1,0
Área da lesão reepitelizada em d14 (%)	70,0 ± 2,7 ^a	57,4 ± 3,7 ^b	55,8 ± 3,6 ^b

C, grupo controle; DIO, grupo obeso induzido por dieta; DR, grupo resistente a dieta.

^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni; $P < 0,05$).

Peso corporal, ingestão diária de comida, depósito de gordura retroperitoneal C = 17, DIO = 17, DR = 16; contração e reepitelização da lesão em d7 C = 7, DIO = 8, DR = 7; contração e reepitelização da lesão em d14 C = 10, DIO = 9, DR = 9.

Figura 5

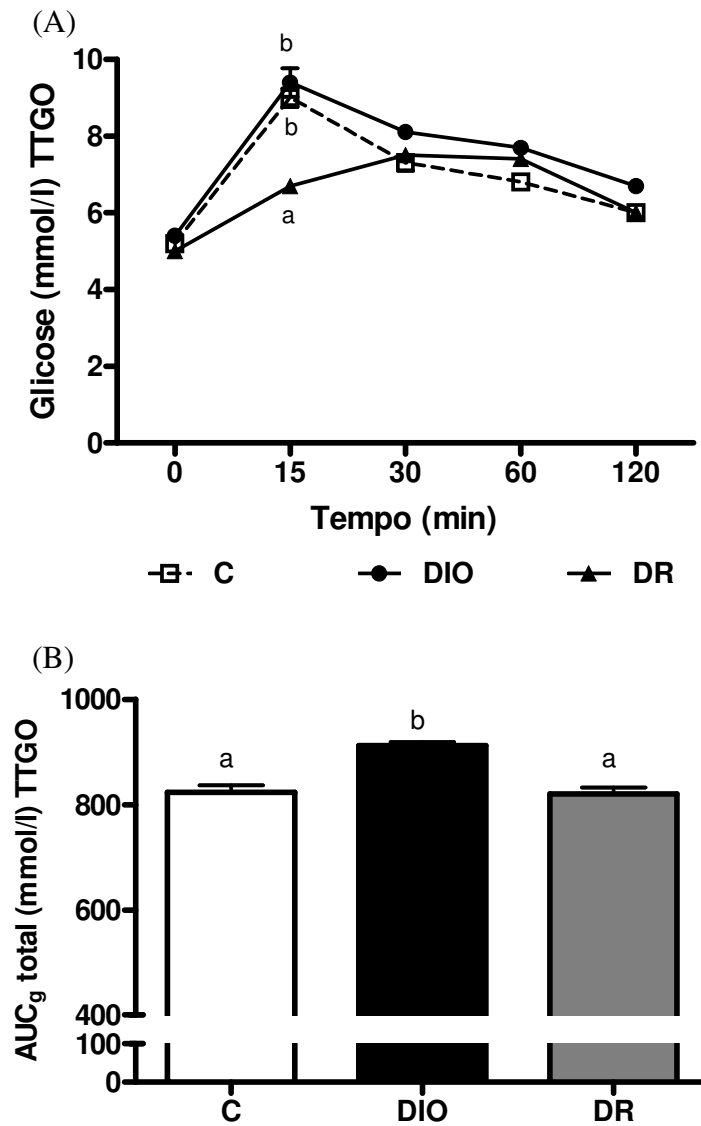


Fig. 5. Glicemia de jejum e glicose sanguínea em resposta ao TTGO (A) e AUC_{glucose} total para o TTGO (B) após 20 semanas de dieta nos ratos controle (C), obesos induzidos por dieta (DIO) e resistentes a dieta (DR). Os valores são médias \pm EPM de 6 animais aleatoriamente selecionados por grupo. TTGO, teste de tolerância a glicose oral. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni; $P < 0,05$).

4.1.3 Análises Macroscópicas

Sete dias após a lesão, a área da lesão estava maior nos grupos DIO (+55,0%, $P<0,05$) e DR (+50,6%, $P<0,05$) do que no grupo C (Tabela 1). Entretanto, não houve diferença entre os grupos 14 dias após a lesão (Tabela 1).

Sete dias após a lesão, o grupo DIO não apresentava nenhum sinal de reepitelização, enquanto que os grupos C e DR apresentaram uma pequena taxa de reepitelização. Quatorze dias após a lesão, a porcentagem de área lesada reepitelizada foi menor nos grupos DIO (-18,0%, $P<0,05$) e DR (-20,3%, $P<0,05$) comparado ao grupo C (Tabela 1)

4.1.4 Quantificação do Infiltrado Inflamatório

O infiltrado inflamatório estava intenso nos grupos DIO e DR sete dias após a lesão. O número de leucócitos PMN foi maior no grupo DIO (+33,4%, $P<0,05$) do que no grupo DR (Tabela 2). Em ambos os grupos, os mastócitos estavam localizados na região profunda, mas eles estavam especialmente abundantes no grupo DIO, onde os mastócitos estavam próximos aos adipócitos (Fig. 6A). O número de mastócitos foi maior no grupo DIO (+59,3%, $P<0,05$) do que no grupo DR (Tabela 2, Fig. 6A,B). O número de macrófagos CD68-positivos foi semelhante em ambos os grupos (Tabela 2).

Quatorze dias após a lesão, o grupo DIO ainda apresentava um grande infiltrado inflamatório. O número de leucócitos PMN diminuiu em ambos os grupos, sem diferença entre eles (Tabela 2). O número de mastócitos permaneceu maior no grupo DIO do que no grupo DR (+41,2%, $P<0,05$) (Tabela 2). Além disso, o número de macrófagos CD68-positivos apresentou uma ligeira diminuição no grupo DR, mas permaneceu elevado no grupo DIO. No grupo DIO, os macrófagos CD68-positivos estavam localizados ao redor dos adipócitos, em íntima associação com eles (Fig. 6C, inserção). O número de macrófagos CD68-positivos foi maior no grupo DIO do que no grupo DR (+13,7%, $P<0,05$; Tabela 2, Fig. 6C,D).

4.1.5 Peroxidação Lipídica

Para avaliar o dano tecidual devido à resposta inflamatória nos ratos DIO e DR, nós avaliamos a quantidade de 4-HNE nos cortes das lesões. O 4-HNE é formado durante a peroxidação lipídica e está presente em altos níveis durante o estresse oxidativo. (Esterbauer et al., 1991) Sete dias após a lesão, o número de células 4-HNE-positivas foi maior no grupo DIO do que no grupo DR (+27,2%, $P<0,05$) (Tabela 2). Quatorze dias após a lesão, não houve diferença entre os grupos DIO e DR.

Tabela 2. Análises microscópicas e bioquímicas da área da lesão em 7 e 14 dias após a lesão (Média \pm EPM de pelo menos 7 animais por grupo para as análises microscópicas e de 6 animais por grupo aleatoriamente selecionados para as análises bioquímicas)

Grupos	C	DIO	DR
Avaliações	Média \pm EPM	Média \pm EPM	Média \pm EPM
Leucócitos PMN/mm ² (d7)	225 \pm 0,5	531 \pm 0,9 ^a	398 \pm 1,0 ^b
Leucócitos PMN/mm ² (d14)	116 \pm 0,3	161 \pm 0,4	167 \pm 0,5
Mastócitos/mm ² (d7)	25 \pm 0,4	43 \pm 0,6 ^a	27 \pm 0,5 ^b
Mastócitos/mm ² (d14)	15 \pm 0,3	24 \pm 0,5 ^a	17 \pm 0,5 ^b
Macrófagos CD68-positivos/mm ² (d7)	2750 \pm 122	2478 \pm 115	2627 \pm 111
Macrófagos CD68-positivos/mm ² (d14)	1653 \pm 63	2542 \pm 105 ^a	2235 \pm 121 ^b
Células 4-HNE-positivas/mm ² (d7)	162 \pm 0,3	234 \pm 0,4 ^a	184 \pm 0,3 ^b
Células 4-HNE-positivas /mm ² (d14)	144 \pm 0,2	284 \pm 0,4	270 \pm 0,4
Vv [miofibroblastos] % (d7)	11,8 \pm 1,1	6,5 \pm 0,8	4,8 \pm 0,7
Vv [miofibroblastos] % (d14)	7,3 \pm 0,9	17,4 \pm 1,2 ^a	10,8 \pm 1,0 ^b
Vv [vasos sanguíneos] % (d7)	7,3 \pm 0,7	8,3 \pm 0,8	7,6 \pm 0,7
Vv [vasos sanguíneos] % (d14)	5,7 \pm 0,8	8,1 \pm 0,9	8,3 \pm 0,9
Hidroxi prolina (ng/mg tecido) (d7)	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,06	0,4 \pm 0,02
Hidroxi prolina (ng/mg tecido) (d14)	0,5 \pm 0,07	0,5 \pm 0,04	0,6 \pm 0,05
Nitrito (μ mol/ μ g proteína) (d7)	6,6 \pm 0,6	34,1 \pm 6,8	34,0 \pm 9,1
Nitrito (μ mol/ μ g proteína) (d14)	10,1 \pm 2,1	2,0 \pm 0,3 ^a	8,8 \pm 2,5 ^b

DIO, grupo obeso induzido por dieta; DR, grupo resistente a dieta; PMN, polimorfonuclear; Vv, densidade de volume.

^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos DIO e DR (teste Mann-Whitney para as análises microscópicas e teste t não-pareado para as análises bioquímicas; $P < 0,05$).

Análises microscópicas em d7 DIO = 8, DR = 7; Análises microscópicas em d14 DIO = 9, DR = 9; análises bioquímicas em d7 e d14 DIO = 6, DR = 6.

Figura 6

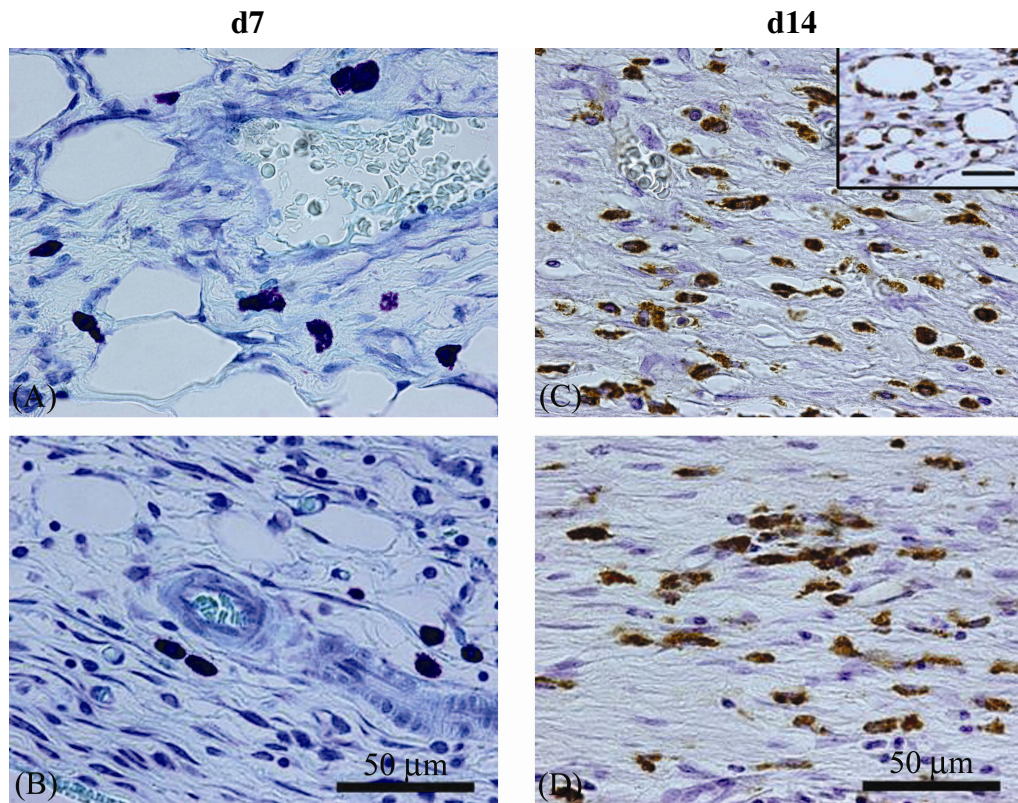


Fig. 6. Distribuição de mastócitos (A, B) e macrófagos CD68-positivos (C, D), 7 e 14 dias após a lesão. São mostrados os grupos obeso induzido por dieta (DIO; A, C) e resistente a dieta (DR; B, D). Os mastócitos foram analisados em cortes corados com azul de toluidina e os macrófagos foram identificados em cortes marcados pela imunohistoquímica contra CD68. Para avaliar o número de mastócitos, entre 6 e 10 campos aleatórios foram analisados por animal (pelo menos 7 por grupo). Para quantificar os macrófagos CD68-positivos, 15 campos aleatórios por animal foram analisados (pelo menos 7 por grupo). Todas as quantificações foram realizadas as cega e repetidas. Barra de escala = 50 μm. A mobilização de mastócitos foi maior no grupo DIO (A) do que no grupo DR (B). A quantidade de macrófagos CD68-positivos foi maior no grupo DIO (C) do que no grupo DR (D). No detalhe (C), nós podemos observar os macrófagos CD68-positivos ao redor dos adipócitos no grupo DIO. Análises microscópicas em d7 DIO = 8, DR = 7; análises microscópicas em d14 DIO = 9, DR = 9.

4.1.6 Desenvolvimento do Tecido de Granulação e Angiogênese

Sete dias após a lesão, os miofibroblastos estavam igualmente raros nos grupos DIO e DR (Tabela 2). Entretanto, 14 dias após a lesão, este padrão foi revertido, com miofibroblastos sendo encontrados em todo o tecido de granulação dos grupos DIO e DR. A densidade de volume dos miofibroblastos foi maior no grupo DIO do que no grupo DR (61,1%, $P < 0,05$, Tabela 2).

Não houve diferença entre os grupos no volume ocupado pelos vasos sanguíneos nas regiões superficial e profunda da lesão durante todo o experimento. Além disso, quatorze dias após a lesão, a densidade de volume dos vasos sanguíneos permaneceu alta nos grupos DIO e DR comparada à densidade de volume de sete dias após a lesão (Tabela 2).

4.1.7 Deposição de Colágeno

Sete dias após a lesão, em ambos os grupos, a maioria das fibras colágenas estavam amarelo-esverdeadas e havia poucas fibras amarelo-avermelhadas, as fibras amarelo-avermelhadas estavam curtas e com uma organização aleatória. Entretanto, 14 dias após a lesão, a maioria das fibras colágenas estava amarelo-avermelhadas, alongadas e organizadas paralelamente a superfície. Para confirmar estas observações histológicas, a quantidade de hidroxiprolina foi avaliada. Nos grupos DIO e DR, a quantidade de hidroxiprolina estava maior 7 dias após a lesão e apresentaram um ligeiro aumento 14 dias após a lesão (Tabela 2). Não houve diferença na quantidade de hidroxiprolina entre os grupos.

4.1.8 Avaliação da Quantidade de Nitrito

Como o nitrito é uma molécula estável e corresponde por mais de 90% do nitrito e do nitrato total avaliados, (Schaffer et al., 1997) a dosagem de nitrito foi utilizada como um índice da síntese do óxido nítrico. Sete dias após a lesão, não houve diferença entre os grupos; entretanto, 14 dias após a lesão, a quantidade de nitrito foi menor no grupo DIO (-340%) do que no grupo DR (Tabela 2, $P < 0,05$).

4.1.9 Avaliação da liberação de TNF- α

Dentro do mesmo grupo, não foram observadas diferenças na produção de TNF- α entre os animais sacrificados 7 ou 14 dias após a lesão (dados não mostrados). Como mostrado na Fig. 7, a quantidade de TNF- α na gordura retroperitoneal foi maior no grupo DIO do que no grupo DR (130%, $P < 0,05$) tanto em 7 quanto em 14 dias após a lesão.

Figura 7

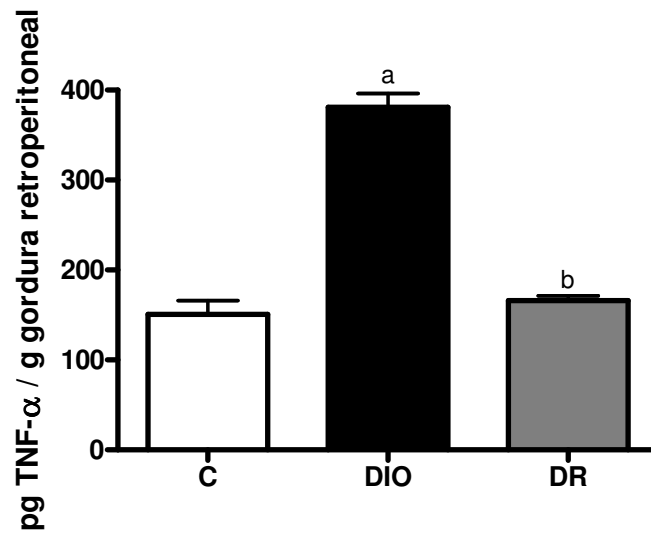


Fig. 7. Quantidade de TNF- α na gordura retroperitoneal dos ratos obesos induzidos por dieta (DIO) e resistentes a dieta (DR). Os valores são médias \pm EPM de 6 animais aleatoriamente selecionados por grupo. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos DIO e DR (teste t não-pareado; $P < 0,05$).

4.2 Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade

4.2.1 Análises Biométricas

O peso corporal final foi respectivamente 24% e 27% maior no grupo DIO comparado aos grupos C e DR (Tabela 3). O ganho de peso mostrou o mesmo padrão de resultados (Tabela 3). Não houve diferença entre os grupos C e DR. O tratamento com celecoxibe não alterou o peso nem o ganho de peso em nenhum grupo.

A gordura retroperitoneal foi respectivamente 313% e 74% maior no grupo DIO do que nos grupos C e DR. A gordura retroperitoneal no grupo DR foi 138% maior do que no grupo C (Tabela 3). O tratamento com celecoxibe não alterou os depósitos de gordura.

4.2.2 Glicemia e OGTT

Não houve diferença na glicemia de jejum entre os grupos (Tabela 3). Entretanto, após o desafio da glicose, a AUC da glicose após um período de 120 min foi maior no grupo DIO comparado aos grupos C e DR. Após o tratamento com celecoxibe, não houve diferença entre os grupos C e DIO 5 mg, porém o grupo DIO 10 mg permaneceu maior. Os grupos C e DR não sofreram alteração com o tratamento com o celecoxibe (Tabela 3)

4.2.3 Avaliação do Fechamento da Lesão

Sete dias após a lesão, a área da lesão foi maior nos grupos DIO (43%) e DR (41%) do que no grupo C. Após o tratamento com o celecoxibe, o grupo C 5 mg não apresentou mudança, entretanto, a área da lesão nos grupos DIO 5 mg e DR 5 mg foram respectivamente 33% e 17% menores comparado aos grupos DIO e DR, sem diferença como grupo C. Todos os grupos tratados com celecoxibe 10 mg apresentaram retardo na cicatrização comparado ao grupo C (Fig. 8, *superior*). A Figura 8 (*inferior*) demonstra a avaliação macroscópica das lesões. Baseado nestes resultados, todas as análises seguintes foram feitas somente nos grupo tratados com celecoxibe 5 mg, que foi a melhor dose para a cicatrização.

Tabela 3. Efeitos da administração do celecoxibe em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica

	C (n=7)	C 5 mg (n=6)	C 10 mg (n=6)	DIO (n=8)	DIO 5 mg (n=6)	DIO 10 mg (n=6)	DR (n=7)	DR 5 mg (n=6)	DR 10 mg (n=6)
Peso final (g)	343,9 ± 5,4 ^a	325,4 ± 8,6	354,4 ± 7,9	427,2 ± 10,7 ^b	393,4 ± 5,7 ^b	398,7 ± 10,4 ^b	337,7 ± 5,3 ^a	303,6 ± 10,3 ^a	302,4 ± 10,9 ^a
Ganho de peso (g)	293,9 ± 5,6 ^a	290,9 ± 8,4	309,0 ± 7,2	386,1 ± 4,1 ^b	357,0 ± 5,1 ^b	354,0 ± 2,5 ^b	289,8 ± 4,8 ^a	264,4 ± 9,3 ^a	267,3 ± 10,4 ^a
Gordura retroperitoneal (% do peso)	0,8 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	3,3 ± 0,3 ^b	4,0 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,3 ^b	1,9 ± 0,2 ^c	1,9 ± 0,2 ^c	1,9 ± 0,2 ^c
Glicemia de jejum (mmol/l)	5,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,0 ± 0,3	5,7 ± 0,6	5,0 ± 0,2	4,3 ± 0,2	5,5 ± 0,5
AUCg total (mmol/l) para TTGO	823,2 ± 19,7 ^a	813,7 ± 13,8	871,0 ± 14,5	912,3 ± 10,9 ^b	905,7 ± 11,3 ^a	941,0 ± 44,5 ^b	820,8 ± 19,1 ^a	841,3 ± 17,2 ^a	759,3 ± 14,9 ^a

C, grupo controle; DIO, grupo obeso induzido por dieta; DR, grupo resistente a dieta; OGTT, teste de tolerância a glicose oral

Média ± EPM. ^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni; $P < 0,05$).

Figura 8

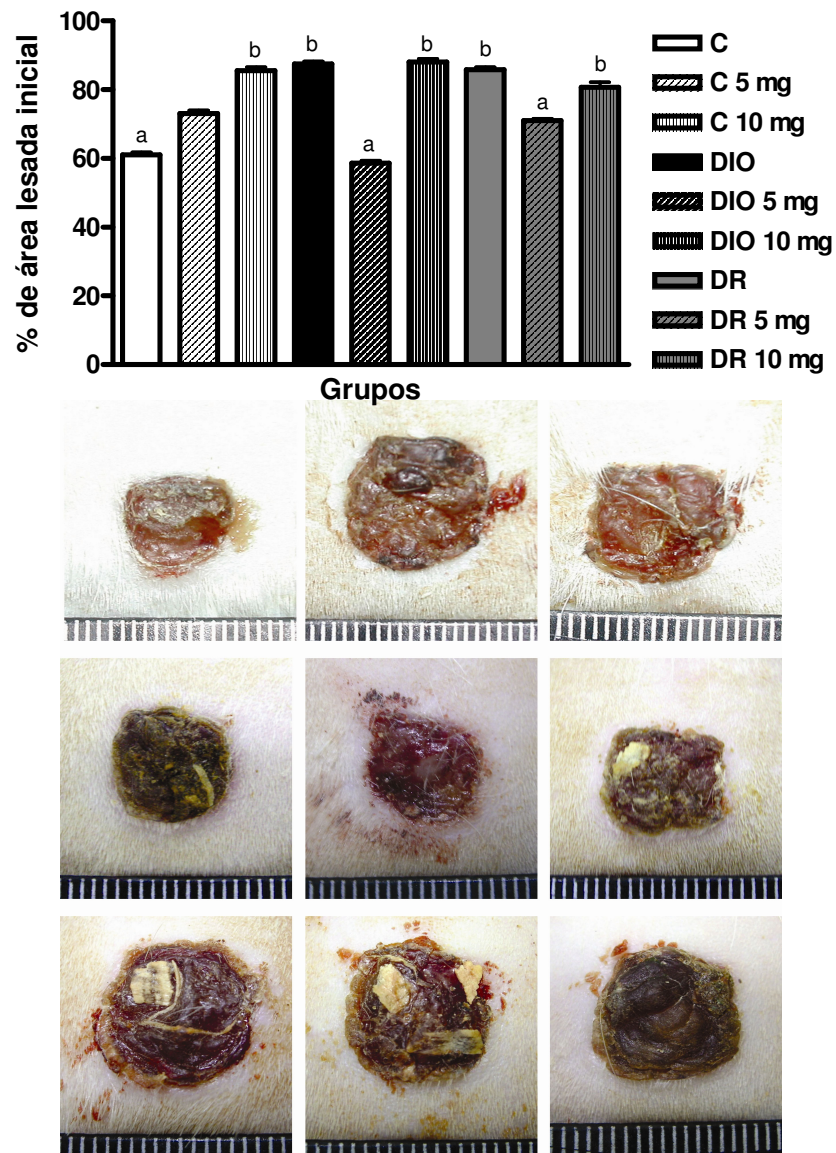


Fig. 8. Avaliação da contração da lesão 7 dias após a lesão (*superior*) em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe. Média \pm EPM. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni; $P < 0,05$). Avaliação macroscópica (*inferior*) da área da lesão nos grupos C (*painéis à esquerda*), nos grupos DIO (*painéis no meio*) e nos grupos DR (*painéis à direita*) tratados com veículo (*painéis superiores*), com celecoxibe 5 mg/kg (*painéis centrais*) e com celecoxibe 10 mg/kg (*painéis inferiores*) 7 dias após a lesão.

4.2.4 Quantificação do Infiltrado Inflamatório

Sete dias após a lesão, as células inflamatórias ainda estavam abundantes em todos os grupos, especialmente no grupo DIO. O número de leucócitos PMN foi respectivamente 136% e 33% maior no grupo DIO do que nos grupos C e DR. Além disso, o número de leucócitos PMN foi 77% maior no grupo DIO do que no grupo C. Após o tratamento com celecoxibe, o número de leucócitos PMN aumentou no grupo DIO 5 mg comparado aos grupos C e DR. O tratamento com celecoxibe não alterou o número de leucócitos PMN nos grupos C e DR, entretanto, não houve diferença entre os grupos C e DR 5 mg (Fig. 9, *superior*). O número de mastócitos foi respectivamente 72% e 59% maior no grupo DIO do que nos grupos C e DR. Após o tratamento com celecoxibe, o número de mastócitos diminuiu no grupo DIO 5 mg, sem diferença com o grupo C (Fig. 9, *centro*). Surpreendentemente, o número de macrófagos CD68-positivos foi semelhante em todos os grupos não tratados. Após o tratamento com celecoxibe, o número de macrófagos diminuiu em todos os grupos, incluindo o grupo C (Fig. 9, *inferior*).

4.2.5 Análise da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através das células 4-HNE-positivas na lesão. Sete dias após a lesão, o número de células 4-HNE-positivas foi 44% maior no grupo DIO do que no grupo C. Não houve diferença entre os grupos C e DR. Após o tratamento com celecoxibe, o número de células 4-HNE-positivas diminuiu nos grupos DIO 5 mg e DR 5 mg, atingindo o nível do grupo C (Fig.10).

4.2.6 Diferenciação Miofibroblástica e Angiogênese

Sete dias após a lesão, uma grande quantidade de miofibroblastos foi observada no tecido de granulação do grupo C, enquanto que estas células eram raras nos grupos DIO e DR. A densidade de volume dos miofibroblastos nos grupos DIO e DR foi respectivamente 82% e 146% menor do que no grupo C. Após o tratamento com celecoxibe, a diferenciação miofibroblástica aumentou nos grupos DIO 5 mg e DR 5 mg, sem diferença com o grupo C (Fig. 11, *superior*).

Os vasos sanguíneos estavam homoganeamente distribuídos no tecido de granulação. O volume ocupado pelos vasos sanguíneos foi semelhante em todos os grupos (Fig. 11, *inferior*).

Figura 9

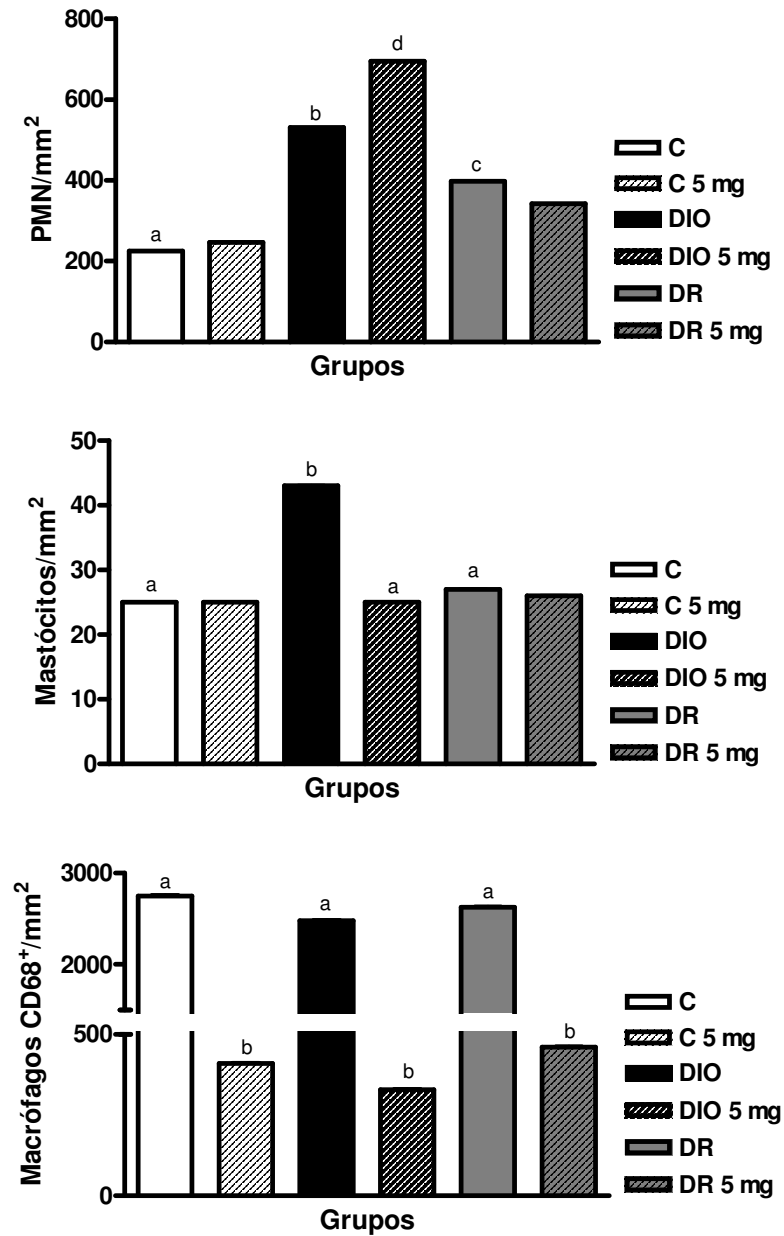


Fig. 9. Quantificação do infiltrado inflamatório 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe. O número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (*gráfico superior*), mastócitos (*gráfico central*) e macrófagos CD68-positivos (*gráfico inferior*), foram contados no tecido de granulação. Média \pm EPM. ^{a,b,c,d} Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; $P < 0,05$).

Figura 10

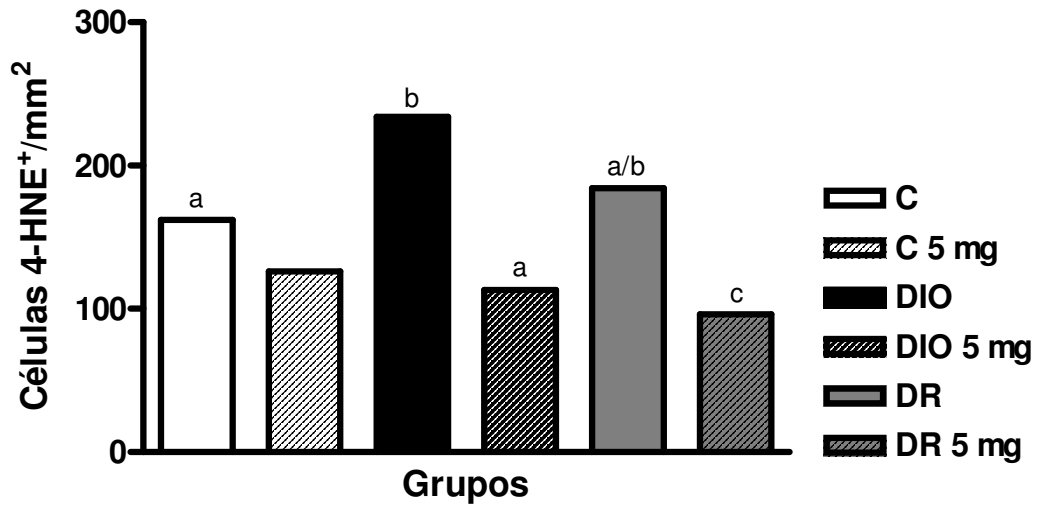


Fig. 10. Quantificação das células 4-HNE-positivas, um produto principal da peroxidação lipídica endógena, no tecido de granulação 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe. Média \pm EPM. ^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; $P < 0,05$).

Figura 11

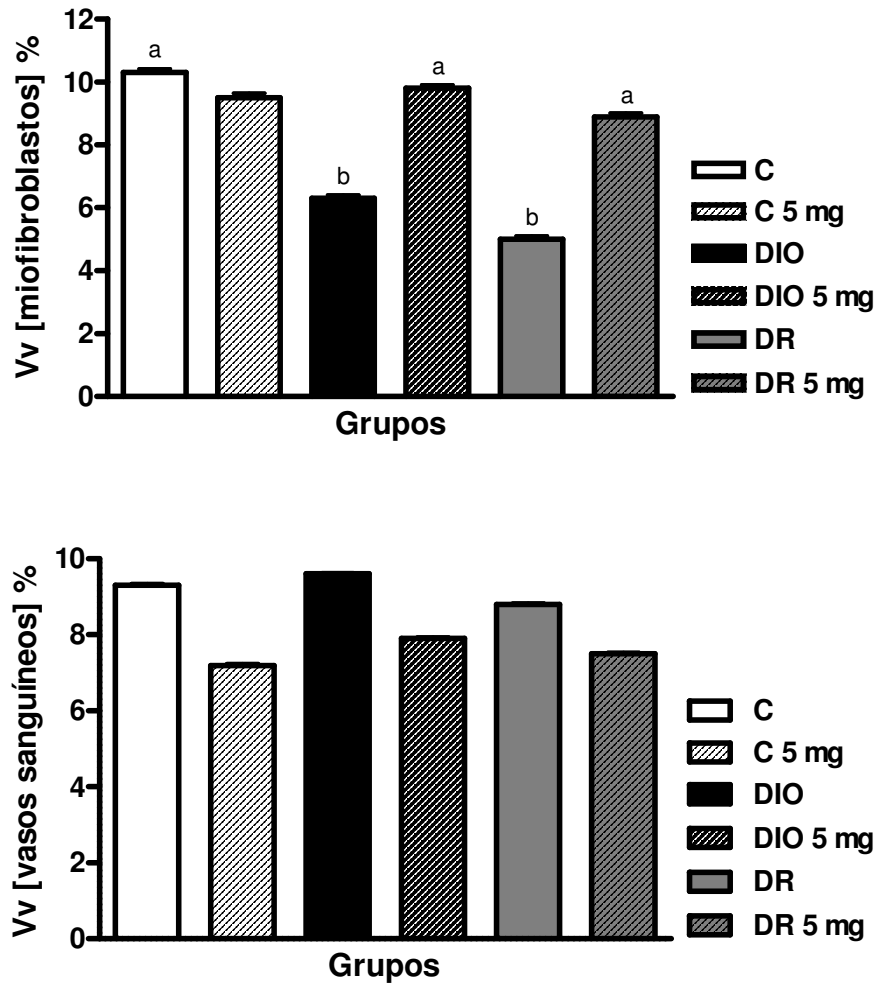


Fig 11. Análise estereológica mostrando a densidade de volume dos miofibroblastos (Vv[miofibroblastos]%) (*superior*) e dos vasos sanguíneos (Vv[vasos sanguíneos]%) (*inferior*) no tecido de granulação 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe. Média \pm EPM. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; $P < 0,05$).

4.2.7 Deposição de Colágeno

Sete dias após a lesão, havia pouca deposição de colágeno no tecido de granulação; por isso, o colágeno foi avaliado pela quantidade de hidroxiprolina. Nos grupos não tratados, a quantidade de hidroxiprolina foi semelhante. Após o tratamento com celecoxibe, a quantidade de hidroxiprolina aumentou em todos os grupos, sem diferença entre eles (Fig. 12).

Figura 12

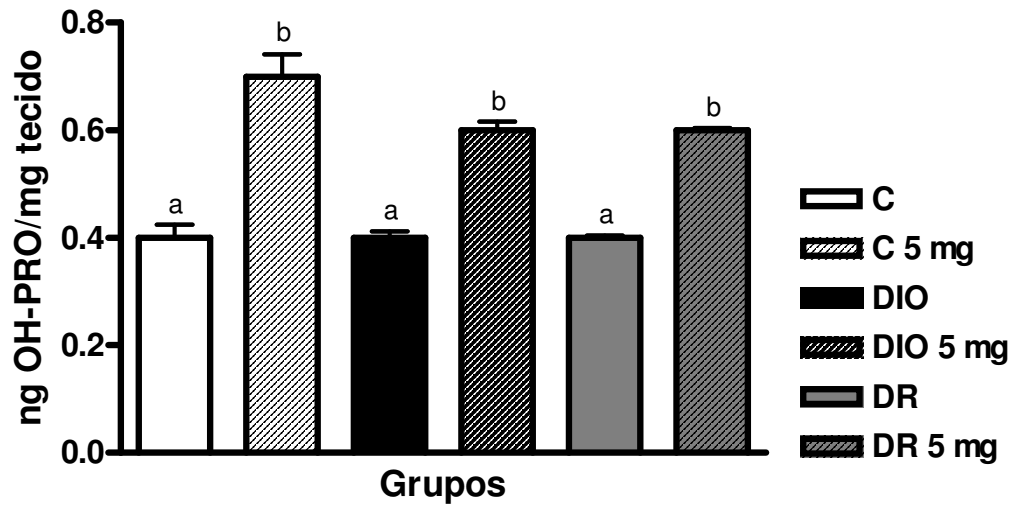


Fig. 12. Quantidade de hidroxiprolina nas áreas das lesões 7 dias após a lesão em ratos alimentados com dieta padrão ou dieta obesogênica tratados com celecoxibe. Média \pm EPM. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni; $P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Ratos propensos e resistentes a obesidade apresentam retardo na cicatrização cutânea

O sobrepeso induzido por uma dieta rica em gordura atrasa a cicatrização cutânea em ratos propensos a obesidade através da extensão da fase inflamatória.(Nascimento & Costa, 2006) Porém, o padrão de cicatrização de indivíduos que são resistentes ao aumento do peso corporal quando alimentados com uma dieta obesogênica é desconhecido. Neste estudo, ratos DIO e DR apresentaram cicatrização atrasada; entretanto, os ratos DIO tiveram uma fase inflamatória mais intensa e com mais dano oxidativo.

O sobrepeso e a obesidade são problemas de proporções epidêmicas e estão associados com o aumento da incidência de muitas condições crônicas, como as lesões crônicas.(Wilson & Clark, 2004) Em roedores, uma dieta obesogênica induz obesidade através de hiperfagia;(Oscai et al., 1984) estes achados foram confirmados pelos resultados deste estudo. O grupo DIO ingeriu mais alimento e apresentou maior peso corporal do que os grupos C e DR, embora o grupo DR também tenha comido a mesma dieta. Um dado importante, é que a obesidade induzida por dieta ocorre somente em alguns ratos.(Lauterio et al., 1994) Neste estudo, o peso da massa de gordura retroperitoneal foi maior no grupo DIO, menor no grupo C e intermediária no grupo DR, indicando que não é somente a hiperfagia, mas também o conteúdo de gordura da dieta, que tem um papel importante no aumento do tecido adiposo. Estes achados foram confirmados pelo fato de que os grupos C e DR consumiram quantidades equivalentes de alimento, mas mesmo assim o grupo DR apresentou maior quantidade de gordura retroperitoneal do que o grupo C. De acordo com a literatura, vários produtos do tecido adiposo branco são especificamente associados com a inflamação,(Tilg & Moschen, 2006) e a fase inflamatória é alterada durante a cicatrização cutânea de ratos propensos a obesidade.(Nascimento & Costa, 2006) Entretanto, a cicatrização (e duração da fase inflamatória) nunca foram estudados em ratos resistentes a obesidade.

Embora a inflamação crônica induzida pela obesidade seja relacionada à resistência a insulina e ao desenvolvimento de diabetes tipo 2,(Kahn et al., 2006) não foram observadas diferenças na glicemia de jejum em nosso estudo. Estudos anteriores com ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura não mostraram hiperglicemia significativa.(Borst & Conover, 2005) Uma moderada hiperglicemia de jejum foi observada com a alimentação de longo prazo com dieta rica em gordura (~10 meses),(Chalkley et al., 2002) entretanto, nosso

protocolo de dieta durou somente 20 semanas. Embora a dieta obesogênica não tenha provocado uma elevação na glicemia de jejum, o grupo DIO apresentou um pequeno grau de intolerância a glicose; o nível da AUC da glicose foi significativamente elevado no grupo DIO comparado aos grupos C e DR, indicando um possível início de resistência a insulina. Borst & Conover (Borst & Conover, 2005) relataram que a indução do estado de resistência a insulina pela alimentação rica em gordura é acompanhada pelo aumento da adiposidade e da expressão tecidual da proteína do TNF- α , suportando um possível papel autócrino/parácrino para o TNF- α na resistência a insulina induzida por dieta obesogênica. Importante é que a intolerância a glicose somente foi observada no grupo DIO, que teve um representativo aumento na gordura retroperitoneal (6x) e um aumento na proteína do TNF- α no tecido adiposo. Entretanto, a concentração glicêmica não relata todas as informações sobre o metabolismo da glicose, e por isso mais estudos avaliando a concentração de insulina são necessários.

A resolução da resposta inflamatória é um fator limitante para um reparo bem sucedido após uma lesão tecidual. A maior parte das lesões que não cicatrizam falha em progredir através das fases normais do reparo, permanecendo em um estado de inflamação crônica. (Cooney et al., 1997; Trengove et al., 2000) A resposta inflamatória é necessária porque ela induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de macrófagos e estimula a proliferação de células residentes e a angiogênese. (Eming et al., 2007) Neste estudo, o grupo DIO apresentou um maior número de células inflamatórias e mastócitos do que o grupo DR. O tecido adiposo branco de animais obesos contém mais mastócitos do que o tecido adiposo branco dos animais magros, e estas células promovem a obesidade induzida por dieta e a intolerância a glicose. (Liu et al., 2009) Este resultado indica uma fase inflamatória mais proeminente no grupo DIO. Várias evidências sugerem a presença de uma inflamação sistêmica de baixo grau na obesidade, com os níveis alterados de vários fatores circulantes, como um aumento nos níveis plasmáticos de proteína C reativa, TNF- α , IL-6 e outros marcadores biológicos de inflamação. (Das, 2002; Mosca, 2002; Engstrom et al., 2003) Esta associação é significativa e vários modelos animais sugerem que estes processos inflamatórios têm uma relação causal com a obesidade e as suas comorbidades. Desta forma, o aumento de TNF- α no tecido adiposo dos ratos DIO pode explicar o grande número de células inflamatórias neste grupo. Além disso, existe uma forte correlação positiva entre o grau de adiposidade e as doenças associadas à obesidade. (Janssen et al., 2002) Esta associação foi observada em nosso estudo, uma vez que o grupo DR apresentou somente um

aumento intermediário na massa de gordura retroperitoneal, mas não desenvolveu obesidade, não aumentou a quantidade de TNF- α e apresentou um menor número de células inflamatórias do que o grupo DIO. Embora o grupo DR não tenha desenvolvido obesidade, ele mostrou atraso na cicatrização. Um estudo prévio mostrou uma regulação diferenciada de alguns genes relacionados à inflamação no tecido adiposo de ratos DIO e DR. Os ratos DIO apresentaram um aumento dos níveis de RNAm do TNF- α , IL-6 e haptoglobina, enquanto que os ratos DR somente apresentaram um aumento nos níveis de RNAm da IL-6,(Perez-Echarri et al., 2008) sugerindo uma regulação diferente da fase inflamatória da cicatrização. Independente destas diferenças, o resultado é deletério para o reparo de lesões. Entretanto, mais estudos são necessários para definir o estado inflamatório dos ratos DIO e DR durante a cicatrização.

As ROS são produzidas em resposta as lesões cutâneas(Gupta et al., 2002) e podem provocar o dano celular pela peroxidação dos lipídios das membranas, inativação das enzimas sulfidril, ligação cruzada de proteínas e quebra do DNA.(Russo et al., 2002) Em vários estudos, a quantidade de ROS no local da lesão é determinada indiretamente através de análises dos produtos da oxidação de lipídios, proteínas ou DNA.(Urso & Clarkson, 2003) O principal produto da peroxidação lipídica, o 4-HNE, pode ser detectado através de imunohistoquímica.(Ojha et al., 2008) Neste estudo, a quantidade de células 4-HNE-positivas foi maior no grupo DIO do que no grupo DR. O número de células inflamatórias também foi maior no grupo DIO e provavelmente foi o responsável pelo aumento da peroxidação lipídica.

A cicatrização envolve uma variedade de processos, como a inflamação aguda, a proliferação celular e a contração da lesão.(Singer & Clark, 1999) Estas fases se sobrepõem e cada uma delas depende de uma variedade de fatores como o tipo de tecido, o estado de saúde, o estado nutricional e a presença de infecções. Diversos tipos celulares são recrutados para o local da lesão para executar os processos de reparo. Em roedores, a contração da lesão é o principal mecanismo de fechamento da lesão,(Davidson, 1998) e os miofibroblastos são as principais células responsáveis pela contração da lesão.(Gabbiani, 2003; Desmouliere et al., 2005) Neste estudo, os grupos DIO e DR apresentaram retardo na contração da lesão 7 dias após a lesão. Este resultado pode ser explicado pelo atraso na diferenciação miofibroblástica observada nestes grupos neste tempo (7 dias). A ausência de neutrófilos apoptóticos no local da lesão priva os macrófagos de seu principal estímulo para secretar o TGF- β 1, um mediador chave envolvido na diferenciação dos fibroblastos para miofibroblastos.(Tomasek et al., 2002; Peters et al., 2005) TGF- β 1 derivado dos macrófagos também atua como um forte inibidor da

iNOS durante a cicatrização(Vodovotz et al., 1993) Esta associação foi confirmada pelos nossos resultados, onde com 7 dias após a lesão, o número de leucócitos PMN e a quantidade de nitrito estavam elevados nos grupos DIO e DR. Estes resultados indicam que o grande número de leucócitos PMN pode estar relacionado ao atraso na diferenciação miofibroblástica e ao aumento da síntese de NO nos grupos DIO e DR.

A reepitelização é o processo de restauração da epiderme e consiste de proliferação e migração dos queratinócitos.(Li et al., 2007) Neste estudo, os grupos DIO e DR apresentaram atraso na reepitelização. A proliferação e a migração dos queratinócitos ocorrem enquanto os níveis de células imunológicas e citocinas pró-inflamatórias diminuem,(Gurtner et al., 2008) e os nossos resultados mostraram que os grupos DIO e DR ainda apresentavam uma grande quantidade de macrófagos 14 dias após a lesão. Embora a proliferação seja aumentada nos ratos com sobrepeso,(Nascimento & Costa, 2006) a reepitelização ainda está atrasada, sugerindo que a considerável presença tardia dos macrófagos nas lesões dos grupos DIO e DR comprometeu a migração dos queratinócitos, conseqüentemente retardando o processo de reepitelização.

Enquanto os níveis de células imunológicas e citocinas pró-inflamatórias diminuem, fibroblastos e células endoteliais começam a migrar para a lesão e a proliferar para iniciar a segunda fase da cicatrização, a formação do tecido de granulação. Os fibroblastos são atraídos das margens da lesão, proliferam e são responsáveis pela síntese, deposição e remodelamento da matriz extracelular.(Singer & Clark, 1999) No tecido de granulação, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que são as células responsáveis pela contração da lesão e pela produção de matriz extracelular.(Gabbiani, 2003; Desmouliere et al., 2005) Embora nós tenhamos observado um retardo na diferenciação miofibroblástica e o desenvolvimento de inflamação nos grupos DIO e DR, não houve diferença na deposição e na organização das fibras colágenas. O atraso na diferenciação miofibroblástica pode ter sido neutralizado pelo aumento do NO (dosagem de nitrito) nos grupos DIO e DR 7 dias após a lesão. Estudos têm demonstrado que o NO é capaz de estimular a síntese e a deposição de matriz extracelular (principalmente colágeno), e a associação entre NO e deposição de colágeno foi descrita in vivo e in vitro.(Schwentker et al., 2002; Rizk et al., 2004) Outro estudo de nosso laboratório(Amadeu et al., 2008) mostrou um aumento da deposição de colágeno devido à aplicação tópica de um doador de NO na fase inflamatória e proliferativa da cicatrização.

Para sustentar o novo tecido com oxigênio e nutrientes, vasos sanguíneos brotam das bordas da lesão e o tecido de granulação é continuamente reabastecido pelos novos vasos. Quando a lesão é preenchida com o novo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos

vasos sanguíneos se desintegram como resultado da apoptose.(Singer & Clark, 1999) Neste estudo, não houve diferença no volume ocupado pelos vasos sanguíneos 7 e 14 dias após a lesão. Entretanto, 14 dias após a lesão, o volume ocupado pelos vasos sanguíneos permaneceu alto nos grupos DIO e DR. O grande volume ocupado foi provavelmente devido à alta celularidade, que ainda era observada no tecido de granulação 14 dias após a lesão, sugerindo que estes vasos não sofreram apoptose devido à grande necessidade nutricional que o tecido de granulação ainda apresentava.

Em conclusão, a dieta obesogênica induziu um aumento no peso corporal e na massa de gordura retroperitoneal nos ratos DIO, enquanto somente induziu um aumento intermediário na gordura retroperitoneal nos ratos DR. Mas embora a dieta obesogênica não tenha induzido o ganho de peso nos animais DR, ela comprometeu (atrasou) a cicatrização cutânea destes animais, destacando a importância da composição da dieta no processo de reparo tecidual. Entretanto, mais estudos utilizando dietas purificadas são necessários para distinguir os efeitos da quantidade de gordura dos efeitos do tipo de gordura e/ou os efeitos dos níveis protéicos dos efeitos da qualidade protéica na cicatrização de lesões cutâneas de ratos DIO e DR.

5.2 Baixa dose de celecoxibe acelera a cicatrização cutânea em ratos propensos e resistentes a obesidade

O sobrepeso induzido por uma dieta rica em gordura retarda a cicatrização pelo prolongamento da fase inflamatória (Nascimento & Costa, 2006) e, além disso, vários produtos do tecido adiposo branco estão associados especificamente com a inflamação. (Tilg & Moschen, 2006) Baseado nisso, nosso estudo avaliou os efeitos de duas doses (5 ou 10 mg/kg/dia) de celecoxibe (droga anti-inflamatória não-esteróide, inibidor seletivo da COX-2) na cicatrização cutânea de ratos obesos induzidos por dieta (DIO-propenso) e ratos resistentes a dieta (DR) pré-alimentados com dieta obesogênica. Neste estudo, tanto os ratos DIO quanto os ratos DR apresentaram retardo na cicatrização, entretanto, a baixa dose de celecoxibe acelerou a cicatrização cutânea nestes ratos. Por outro lado, a alta dose de celecoxibe não melhorou a cicatrização destes animais.

Em roedores, uma dieta obesogênica promove à obesidade, entretanto, a obesidade induzida por dieta ocorre em algumas, mas não em todos os ratos. (Perez-Echarri et al., 2008) Neste estudo, o grupo DIO apresentou maior peso corporal do que os grupos C e DR. A porcentagem de gordura retroperitoneal foi maior no grupo DIO, menor no grupo C e intermediária no grupo DR, indicando que o conteúdo de gordura na dieta tem um papel importante no aumento do tecido adiposo. De acordo com achados da literatura, (Hsieh et al., 2010) o tratamento com celecoxibe não alterou o peso corporal e os depósitos de gordura. Embora a inflamação induzida pela obesidade seja relacionada à resistência a insulina e ao diabetes do tipo 2, (Kahn et al., 2006) em nosso estudo nenhuma diferença foi observada na glicemia de jejum. Estudos anteriores com ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura não apresentam significativa hiperglicemia, (Borst & Conover, 2005) a hiperglicemia somente foi observada com dieta por um longo período (~10 meses) (Chalkley et al., 2002) ou com uma dieta com maior porcentagem de gordura (45%). (Hsieh et al., 2010) Entretanto, o grupo DIO apresentou um pequeno grau de intolerância a glicose comparado aos grupos C e DR, indicando um possível estágio inicial de resistência a insulina. (Borst & Conover, 2005) O tratamento com celecoxibe 5 mg reduziu a intolerância a glicose no grupo DIO para os níveis do grupo C. Estudos anteriores sugerem que a ativação da COX-2 na inflamação da gordura visceral é importante no desenvolvimento da resistência a insulina em ratos DIO. (Hsieh et al., 2009)

A cicatrização é um processo dinâmico que consiste em três fases contínuas, mas que se sobrepõem e são precisamente reguladas. Os eventos de cada fase precisam acontecer de

maneira precisa e regulada. Interrupções, alterações ou prolongamento no processo podem levar a uma cicatrização atrasada ou a uma lesão crônica que não cicatriza.(Gurtner et al., 2008) O aumento no tecido adiposo é caracterizado por uma ampla resposta inflamatória e pela expressão de uma variedade de proteínas, incluindo a COX-2.(Hsieh et al., 2009) Além disso, o tecido adiposo de animais obesos possui mais mastócitos.(Liu et al., 2009) Neste estudo, os grupos DIO e DR apresentaram maior número de leucócitos PMN, e além disso, o grupo DIO apresentou mais mastócitos. O tratamento com celecoxibe 5 mg não reduziu o número de PMN, mas reduziu o número de mastócitos no grupo DIO e o número de macrófagos em todos os grupos. A redução das células inflamatórias nos grupos DIO e DR foi acompanhada pela diminuição da peroxidação lipídica. Grandes quantidades de ROS são produzidas no tecido lesado ou inflamado, principalmente pelas células inflamatórias.(Darr & Fridovich, 1994)

Em roedores, a contração da lesão é o principal mecanismo do fechamento da lesão.(Davidson, 1998) Neste estudo, os grupos DIO e DR apresentaram retardo na contração da lesão. Este resultado pode ser explicado pelo retardo na diferenciação miofibroblástica observado nestes grupos. Os miofibroblastos são as principais células responsáveis pela contração da lesão e se diferenciam a partir dos fibroblastos no estágio tardio da fase de formação do tecido de granulação.(Gabbiani, 2003) O tratamento com celecoxibe 5 mg reverteu o atraso na diferenciação miofibroblástica e conseqüentemente reverteu o atraso na contração da lesão nos grupos DIO e DR, sugerindo um avanço no processo de cicatrização nestas condições. Entretanto, todos os grupos tratados com celecoxibe 10 mg apresentaram retardo na cicatrização. A isoforma da COX-2 induzível é extremamente importante na inflamação, assim como na sua resolução.(Colville-Nash & Gilroy, 2001) Os animais tratados com a alta dose de celecoxibe apresentaram um retardo na cicatrização, provavelmente devido à ausência de prostaglandinas produzidas pela COX-2 que são reguladoras da resolução da inflamação. Entretanto, os efeitos benéficos provocados pela baixa dose de celecoxibe podem ser atribuídos ao fato de que não existe uma completa supressão da produção de prostaglandinas.(Muscara et al., 2000)

O segundo estágio do reparo de lesões, a formação do tecido de granulação, é caracterizado pela proliferação e migração de diferentes tipos de células. Os fibroblastos e as células endoteliais são os tipos celulares mais abundantes e favorecem o crescimento de capilares, a formação de colágeno e a formação do tecido de granulação no local da lesão.(Gurtner et al., 2008) Neste estudo, o volume ocupado pelos vasos sanguíneos foi semelhante em todos os grupos. O tratamento com celecoxibe 5 mg diminuiu o volume

ocupado pelos vasos, mas sem diferença significativa. A grande quantidade de vasos sanguíneos foi provavelmente devido à alta celularidade que ainda estava presente no tecido de granulação. Apesar do atraso na diferenciação miofibroblástica, não houve diferença na deposição de colágeno no tecido de granulação dos grupos não tratados. O tratamento com celecoxibe 5 mg aumentou a deposição de colágeno em todos os grupos. Embora a literatura mostre que o celecoxibe não afeta a deposição de colágeno, (Muscara et al., 2000) este resultado pode ser explicado pelo aumento na diferenciação miofibroblástica, uma vez que os miofibroblastos além de serem células contráteis, eles também produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno. (Gabbiani, 2003)

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que os ratos DIO assim como os ratos DR apresentam atraso na cicatrização cutânea, devido principalmente a intensa resposta inflamatória local, e que a administração de uma baixa dose de celecoxibe melhora o reparo cutâneo nestas condições, reduzindo o infiltrado de células inflamatórias e o dano celular pela peroxidação lipídica, melhorando a contração da lesão e aumentando a deposição de colágeno.

6 CONCLUSÕES

A dieta obesogênica induziu o aumento do peso corporal e da massa de gordura retroperitoneal nos ratos DIO, enquanto que nos ratos DR, somente induziu um aumento intermediário na massa de gordura retroperitoneal. Embora a dieta obesogênica não tenha aumentado o ganho de peso, ela comprometeu negativamente o processo de reparo cutâneo nos ratos DR, destacando a importância da composição da dieta no processo de reparo tecidual. Como já era esperado, os ratos DIO também apresentaram atraso na cicatrização cutânea. Tanto os ratos DIO quanto os ratos DR apresentaram uma resposta inflamatória mais acentuada durante o processo de reparo.

O tratamento com uma baixa dose de celecoxibe (5 mg/kg), uma droga anti-inflamatória não-esteróide inibidor seletivo da COX-2, foi capaz de reverter os efeitos deletérios provocados pela dieta obesogênica na cicatrização cutânea de ratos DIO e DR, através da redução do infiltrado inflamatório e do dano oxidativo e pela aceleração no fechamento da lesão e o aumento na deposição de colágeno. Entretanto, uma alta dose de celecoxibe (10 mg/kg) não apresentou efeitos positivos nos ratos DIO e DR, e ainda atrasou a cicatrização nos ratos normais (controle).

REFERÊNCIAS

1. Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Monte-Alto-Costa A. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *J Surg Res.* 2008;149:84-93.
2. Anwar K, Voloshyna I, Littlefield MJ et al. COX-2 Inhibition and Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 Increase CD36 Expression and Foam Cell Formation in THP-1 Cells. *Lipids.* 2010;
3. Anwer T, Sharma M, Pillai KK, Iqbal M. Effect of *Withania somnifera* on insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102:498-503.
4. Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition.* 2000;16:349-54.
5. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986;142 (Pt 3):259-76.
6. Bhatt PA, Makwana D. Comparative influence of propranolol and verapamil on glycemic control and histamine sensitivity associated with L-thyroxine-induced hyperthyroidism - an experimental study. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22:53-9.
7. Borst SE, Conover CF. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life Sci.* 2005;77:2156-65.
8. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl 5:113-24.
9. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:12S-34S.
10. Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E1231-8.
11. Chan CC, Boyce S, Brideau C et al. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290:551-60.
12. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13926-31.
13. Colville-Nash PR, Gilroy DW. Potential adverse effects of cyclooxygenase-2 inhibition: evidence from animal models of inflammation. *BioDrugs.* 2001;15:1-9.
14. Cooney R, Iocono J, Maish G, Smith JS, Ehrlich P. Tumor necrosis factor mediates impaired wound healing in chronic abdominal sepsis. *J Trauma.* 1997;42:415-20.
15. Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1994;102:671-5.

16. Das UN. Obesity, metabolic syndrome X, and inflammation. *Nutrition*. 2002;18:430-2.
17. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*. 1998;290 Suppl:S1-11.
18. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13:7-12.
19. Diez-Dacal B, Perez-Sala D. Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:655-75.
20. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35:1009-15.
21. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007;127:514-25.
22. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*. 2003;52:2097-101.
23. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11:81-128.
24. Evans CB, Pillai S, Goldyne ME. Endogenous prostaglandin E2 modulates calcium-induced differentiation in human skin keratinocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993;49:777-81.
25. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1992;140:539-44.
26. Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30:3-21.
27. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294:1871-5.
28. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003;200:500-3.
29. Gonzalez-Periz A, Claria J. New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem*. 2007;7:297-309.
30. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131-8.
31. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988;96:379-94.
32. Gupta SK, Bansal P, Bhardwaj RK, Jaiswal J, Velpandian T. Comparison of analgesic and anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: pharmacokinetic parameters after topical application. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15:105-11.
33. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314-21.

34. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001;114:131-9.
35. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005;366:1197-209.
36. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:7384-8.
37. Hochberg MC. Treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis with COX-2-selective inhibitors: a managed care perspective. *Am J Manag Care.* 2002;8:S502-17.
38. Honma Y, Arai I, Hashimoto Y et al. Prostaglandin D2 and prostaglandin E2 accelerate the recovery of cutaneous barrier disruption induced by mechanical scratching in mice. *Eur J Pharmacol.* 2005;518:56-62.
39. Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1150-7.
40. Hsieh PS, Lu KC, Chiang CF, Chen CH. Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *Eur J Clin Invest.* 2010;40:164-71.
41. Iocono JA, Colleran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich HP, Garner WL. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. *Wound Repair Regen.* 2000;8:216-25.
42. Janssen I, Heymsfield SB, Allison DB, Kotler DP, Ross R. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:683-8.
43. Kahn SE, Zinman B, Haffner SM et al. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:2357-64.
44. Kampfer H, Brautigam L, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S. Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *J Invest Dermatol.* 2003;120:880-90.
45. Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg.* 2011;127 Suppl 1:10S-20S.
46. Lauterio TJ, Bond JP, Ulman EA. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. *J Nutr.* 1994;124:2172-8.
47. Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;192:294-306.
48. Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N, Habib A, Maclouf J, Goldyne ME. Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res.* 1996;224:79-87.
49. Levin BE, Routh VH. Role of the brain in energy balance and obesity. *Am J Physiol.* 1996;271:R491-500.
50. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:9-18.

51. Liu J, Divoux A, Sun J et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med.* 2009;15:940-5.
52. Lovvorn HN, 3rd, Cheung DT, Nimni ME, Perelman N, Estes JM, Adzick NS. Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *J Pediatr Surg.* 1999;34:218-23.
53. Mattia C, Coluzzi F. COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71:461-70.
54. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem.* 1988;263:3550-3.
55. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998;22:1145-58.
56. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K et al. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology.* 2003;144:4773-82.
57. Mosca L. C-reactive protein--to screen or not to screen? *N Engl J Med.* 2002;347:1615-7.
58. Muller-Decker K, Hirschner W, Marks F, Furstenberger G. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 2002;119:1189-95.
59. Muscara MN, McKnight W, Asfaha S, Wallace JL. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol.* 2000;129:681-6.
60. Narumiya S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med.* 2009;87:1015-22.
61. Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr.* 2006;96:1069-77.
62. Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Muller-Decker K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:7629-34.
63. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem.* 1991;266:23261-7.
64. Ojha N, Roy S, He G et al. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:682-91.
65. Oscai LB, Brown MM, Miller WC. Effect of dietary fat on food intake, growth and body composition in rats. *Growth.* 1984;48:415-24.
66. Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B et al. Differential inflammatory status in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity: effects of EPA ethyl ester treatment. *Eur J Nutr.* 2008;47:380-6.
67. Perez-Sala D, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3:231-48.
68. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B et al. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *Embo J.* 2005;24:3400-10.

69. Rizk M, Witte MB, Barbul A. Nitric oxide and wound healing. *World J Surg.* 2004;28:301-6.
70. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1690-9.
71. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia.* 2002;73 Suppl 1:S21-9.
72. Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery.* 1997;121:513-9.
73. Scholz K, Furstenberger G, Muller-Decker K, Marks F. Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochem J.* 1995;309 (Pt 1):263-9.
74. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide.* 2002;7:1-10.
75. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:19-29.
76. Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;119:213-5.
77. Simon LS, Weaver AL, Graham DY et al. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Jama.* 1999;282:1921-8.
78. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738-46.
79. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-82.
80. Souza BR, Santos JS, Costa AM. Blockade of beta1- and beta2-adrenoceptors delays wound contraction and re-epithelialization in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33:421-30.
81. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006;75:1-8.
82. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772-83.
83. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-63.
84. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2000;8:13-25.
85. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189:41-54.
86. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.

87. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1993;178:605-13.
88. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J.* 2004;18:790-804.
89. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127:998-1008.
90. Wilgus TA, Ross MS, Parrett ML, Oberyszyn TM. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000;62:367-84.
91. Wilson JA, Clark JJ. Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2004;17:426-32.
92. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961;93:440-7.

ANEXO A — Comprovante de aceite do artigo Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing



[MANUSCRIPT HOME](#) | [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) | [REFeree INSTRUCTIONS](#) | [CONTACT BJN](#) | [TIPS](#) | [LOGOUT](#) | [JOURNAL HOME](#)

To ensure proper functionality of this site, both [JavaScript](#) and [Cookies](#) must be enabled.

Detailed Status Information

Manuscript #	BJN-2010-015227RR
Current Revision #	2
Other Versions	BJN-2010-015227 BJN-2010-015227R
Submission Date	20th Dec 10
Current Stage	Accepted
Title	BOTH OBESITY-PRONE AND OBESITY-RESISTANT RATS PRESENT DELAYED CUTANEOUS WOUND HEALING
Running Title	Wound healing in DIO and DR rats
Manuscript Type	Research Article
Special Section	N/A
Category	Behaviour, Appetite, and Obesity
Corresponding Author	Andréa Monte-Alto-Costa (amacosta@uerj.br) (State University of Rio de Janeiro)
Contributing Author	Adriana Nascimento
Sources of Funding	This study was partially supported by FAPERJ. A. P. N. holds a postgraduate fellowship from FAPERJ. None of the authors has conflicts of interest with respect to this work. Contributions to this work were as follows: A. P. N. designed and conducted the experiment and wrote the manuscript. A. M. A. C. designed the experiment, critically analyzed the results and participated in critical revision of the manuscript. The authors thank Dr. Claudia Benjamim and Ariane Brogliato by help in performs the ELISA.
Abstract	Diet-induced overweight rats exhibit delayed cutaneous healing; however, when receiving an obesogenic diet, some rats are susceptible to developing the overweight phenotype, whereas others are resistant. We investigated cutaneous healing in diet-induced obesity (DIO)-prone and diet-resistant (DR) rats. Male rats were fed with a standard (Control, C) or high-saturated fat (30% fat, w/w) diet for 20 weeks. Then, the experimental group was subdivided into DIO (n=17) and DR

	<p>(n=16) groups. An excisional lesion was made and the animals were killed 7 or 14 days later. The average body weight was 29% and 25% higher in the DIO group compared to the C and DR groups. Retroperitoneal fat was higher in the DIO group than in the C and DR groups (518% and 92%) and was higher in the DR group than in the C group (223%). The DIO group presented glucose intolerance, and both the DIO and DR groups presented delayed wound contraction (50%) and re-epithelialisation (20%). Compared to the DR group, the DIO group displayed higher amounts of inflammatory cells as well as higher levels of lipid peroxidation ($p < 0.05$). Myofibroblastic differentiation and vessel remodeling were delayed in both the DIO and DR groups. Nitrite levels were lower in the DIO group (340% less) than in the DR group. TNF-α expression was increased in the DIO group (130%) compared to the DR group. Our results showed that DIO as well as DR rats present delays in cutaneous wound healing, even though the DR group does not have an overweight phenotype.</p>
Key Words	Cutaneous wound healing, Obesity resistant, Obesity prone, High energy density diet
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Word Count	7533

Stage	Start Date
Accepted	21st Jan 11
Decision Sent to Author	20th Jan 11
Accepted	20th Jan 11
Decision Made	20th Jan 11
Under Review	4th Jan 11
Under Consideration	20th Dec 10
Author Approved Converted Files	20th Dec 10
Waiting for Author Approval of Converted Files	20th Dec 10
File Conversion Complete	20th Dec 10
Waiting for File Conversion	20th Dec 10
Waiting for Files to be Sorted	20th Dec 10
Manuscript Submitted	20th Dec 10
Manuscript Files Submitted	20th Dec 10
Preliminary Manuscript Data Submitted	20th Dec 10

ANEXO B — Comprovante de Submissão do artigo Low-dose of celecoxib accelerates cutaneous wound healing in obesity-prone and obesity-resistant rats



Submissions Being Processed for Author **Andrea Monte-Alto-Costa, PhD**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		LOW-DOSE OF CELECOXIB ACCELERATES CUTANEOUS WOUND HEALING IN OBESITY-PRONE AND OBESITY-RESISTANT RATS	01-26-2011	01-26-2011	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.