



**Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ**

**Centro de Ciências da Saúde – CCS**

**Instituto de Ciências Biomédicas – ICB**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal**

**PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 E DAS CÉLULAS T  
REGULADORAS EM LESÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

**Janaina de Barros Figueiredo**

Rio de Janeiro

2013



**Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ**

**Centro de Ciências da Saúde – CCS**

**Instituto de Ciências Biomédicas – ICB**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química medicinal**

**PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 E DAS CÉLULAS T  
REGULADORAS EM LESÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Janaina de Barros Figueiredo

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Claudia Farias Benjamim

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2013

Ficha catalográfica:

Figueiredo, Janaina de Barros.

Papel do Receptor de Quimiocina CCR4 e das Células T Reguladoras em Lesão Cutânea de Camundongos Diabéticos/ Janaina de Barros Figueiredo. – Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2012.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Cláudia Farias Benjamim

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2012.

Referências bibliográficas:

1. Lesão cutânea. 2. Cicatrização. 3. Diabetes. 4. Receptor de quimiocina CCR4. 5. Células T reguladoras. 6. Reparo tecidual. I. Figueiredo, Janaina de Barros. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Papel do Receptor de Quimiocina CCR4 e das Células T Reguladoras em Lesão Cutânea de Camundongos Diabéticos.

**PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 E DAS CÉLULAS T  
REGULADORAS EM LESÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Janaina de Barros Figueiredo

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Claudia Farias Benjamim

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2013

**PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 E DAS CÉLULAS T  
REGULADORAS EM LESÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Janaina de Barros Figueiredo

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Claudia Farias Benjamim

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada por:

---

Prof. Célio Geraldo Freire de Lima – IBCCF/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Christianne Bandeira de Melo – IBCCF/UFRJ

---

Prof. Heitor Affonso de Paula Neto – IMPG/UFRJ

---

Prof. Jorge Luiz Mendonça Tributino – ICB/UFRJ

---

Prof. Paulo de Assis Melo – PPGFQM/UFRJ

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, á Deus por cumprir a sua promessa e permitir que o meu sonho se realizasse, e por guiar o meu caminho;

Aos meus pais, Leila e Silvio, por todo amor, amizade, carinho, apoio, paciência e compreensão, que tiveram comigo;

Ao meu irmão Raul que diversas vezes me ajudou a aliviar a tensão distraíndo minha cabeça ao me fazer companhia assistindo um filme ou jogando algum jogo;

A professora Dr<sup>a</sup> Cláudia Farias Benjamim por me receber em seu laboratório oferecendo a oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de profissionalismo, organização e sinceridade em seus atos, mostrando caminhos e dando apoio em vários momentos;

A minha “Eterna chefinha” a doutoranda Ariane Rennó Brogliato pela oportunidade de entrar no mundo da lesão. Orientou-me durante a iniciação científica e durante todo o meu mestrado, mesmo estando uma parte longe se preocupou comigo.

Ao “Grupo da lesão”: Janaina Lima (minha chara), Ariane e Thaís que sempre estavam presentes para tirar dúvidas e auxiliar na bancada não importando a hora.

A Cyntia que se tornou uma verdadeira chefe cópia fiel da Cláudia Benjamim. Uma verdadeira orientadora, minha “chefinha das Tregs”. Teve muita paciência durante meus experimentos e correções dos meus terríveis erros de português e falta de acento. Obrigadão.

A Prof<sup>a</sup> Josiane que teve uma participação fundamental no fim do meu mestrado e no meu ingresso para o doutorado, muito obrigada pela ajuda.

Aos Técnicos do lab, Carol e Alan que diversas vezes prepararam os materiais e soluções necessárias para os experimentos. Obrigada, uma verdadeira “mão na roda”.

A todos os alunos do laboratório de Imunofarmacologia: Amanda, Ariane, Cyntia, Janaina Lima, Leandro, Rafael, Bruno, Letícia, Thaís, Carol e Alan pelos bons momentos que tivemos juntos, pelas risadas, pela troca de conhecimentos e pela convivência enriquecedora.

Aos amigos do LabCom: Manuella, Renata, Valdirene, Samuel, Rodrigo e Josiane que foram meus companheiros de laboratório por um tempo e pelos bons momentos que passamos durante esses anos.

Aos meus amigos Anderson, Vinicius e Daniele pelo incentivo, pela amizade e pelos momentos de muita alegria.

Ao apoio financeiro do CNPq, FAPERJ, Capes e da empresa LM Farma que subsidiaram o desenvolvimento deste trabalho.

**Lembrarei sempre de vocês com muito carinho!!!**

## RESUMO

### **O PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 E DAS CÉLULAS T REGULADORAS EM LESÃO CUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Janaina de Barros Figueiredo

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Claudia Farias Benjamim

Resumo da Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

As feridas de difícil cicatrização afetam 1-2% da população nos países desenvolvidos. Apesar de sua relevância clínica, no Brasil ainda não há dados estatísticos. Os processos envolvidos no reparo de lesões cutâneas crônicas ainda não são conhecidos, mas é claro na literatura que é um processo multimediado, com a participação de vários tipos celulares e de mediadores inflamatórios, dentre eles as quimiocinas. Nosso grupo tem interesse especial no receptor CCR4 e seus ligantes CCL17 e CCL22, visto que este receptor está presente na superfície das células T reguladoras (Tregs) e é responsável por mediar o recrutamento dessas células para a pele inflamada. As células Tregs são encontradas na pele de humanos e camundongos, no entanto o papel das células Tregs no processo de cicatrização ainda não foi descrito. Visto que as células Treg modulam o sistema imunológico, acreditamos que tais células possam desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas crônicas na pele. Nosso objetivo foi descrever o papel do receptor de quimiocina CCR4 e das células T reguladoras na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. Neste estudo foi possível observar que os animais CCR4<sup>-/-</sup> e os animais C57BL/6 que receberam anti-CCL17/22 apresentaram um perfil de cicatrização semelhante, mostrando-se acelerado quando comparados aos animais C57BL/6 e aos animais que receberam AAV-IL2 para aumentar o número de células Tregs. Através da análise histológica, constatou-se que os animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> possuem tecido com características semelhantes, no entanto a

regeneração epidérmica, é maior nos animais CCR4<sup>-/-</sup> em relação aos animais C57BL/6. No 14º dia o depósito de colágeno era maior nos animais CCR4<sup>-/-</sup> mostrando que o novo tecido formado nesses animais possui uma resistência maior, caracterizando-o como mais maduro quando comparado aos animais C57BL/6. As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-12p70 foram quantificados mostrando uma menor quantidade dessas citocinas nos animais CCR4<sup>-/-</sup> comparados com os animais C57BL/6 no 2º dia de lesão. O infiltrado celular foi avaliado onde se observou que os animais CCR4<sup>-/-</sup> têm um aumento no número de neutrófilos e uma diminuição no número de Tregs em comparação com os animais C57BL/6. Assim foi possível observar que os animais CCR4<sup>-/-</sup> possuem um processo de cicatrização mais acelerado, o que sugere o envolvimento do receptor CCR4 e suas quimiocinas no recrutamento de Tregs para o local da lesão, indicando que este receptor pode afetar negativamente a cicatrização cutânea em camundongos diabéticos.

**Palavras-Chave:** Lesão cutânea, cicatrização, receptor de quimiocina CCR4, células T reguladoras, reparo tecidual, diabetes.

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2013

## ABSTRACT

### THE ROLE OF CHEMOKINE RECEPTOR CCR4 AND REGULATORY T CELLS ON SKIN WOUND HEALING ON DIABETIC MICE

Janaina de Barros Figueiredo

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Claudia Farias Benjamim

*Abstract* da Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários á obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Wounds of difficult healing affect 1-2% of population in developed countries. Despite of its clinical relevance, in Brazil there are not statistical data yet. Studies in literature are replete with papers describing a new subtype of T cells, these cells are called regulatory T cells (Tregs) and its main function is to modulate the immune system. Tregs cells are found in the skin of humans and mice however the role of regulatory T cells in the healing process has not been described yet. Assuming that Treg cells modulate the immune system and that is fundamental to the healing process, we believe that such cells play an important role in the healing of skin lesions. This work aims to describe the role of the chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells in cutaneous wound healing in diabetic mice. In this study, we observed that CCR4<sup>-/-</sup> mice and C57BL/6 mice that receiving anti-CCL17/22 presented a similar healing profile, able to accelerate the wound healing when compared to C57BL/6 mice and to mice that received IL2 to increasing the number of Treg cells. Through histological analysis, it was found that the C57BL/6 and CCR4<sup>-/-</sup> mice presented a similar healing profile, however epidermal regeneration is higher in CCR4<sup>-/-</sup> mice compared to C57BL/6. In 14<sup>th</sup> days the collagen deposition was greater in CCR4<sup>-/-</sup> mice showed that the new tissue formed in these animals has a higher resistance, characterizing it as more mature compared to C57BL/6. The cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  and IL-12p70 were quantified showing a less amount of

these cytokines in CCR4<sup>-/-</sup> mice compared to C57BL/6 on second day of lesion. The cellular infiltrate was evaluated, it was observed that the CCR4<sup>-/-</sup> mice have an increased number of neutrophils and a decrease in the number of Tregs compared with C57BL/6. Thus, it was observed that CCR4<sup>-/-</sup> mice have a faster healing process, suggesting the involvement of CCL17/22 chemokines and their receptor CCR4 in Tregs recruitment to the injury site, indicating that this receptor can negatively affect the skin heals in diabetic mice.

**Key-words:** Cutaneous wound, healing, chemokine receptor CCR4, regulatory T cells, wound repair, diabetic.

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2013

## SUMÁRIO

<b>Índice de figuras</b> .....	xii
<b>Índice de tabelas</b> .....	xiii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xiv
<b>1. Introdução</b> .....	17
1.1. Estrutura e fisiologia da pele.....	18
1.2. Feridas Cutâneas.....	21
1.3. Fases clássicas da cicatrização de feridas.....	22
1.4. Fase Inflamatória.....	23
1.5. Fase Proliferativa.....	24
1.6. Fase de Remodelamento.....	25
1.7. Diabetes.....	27
1.8. Feridas em indivíduos diabéticos.....	28
1.9. Indução de diabetes.....	30
1.10. Resposta imunológica no reparo tecidual.....	31
1.10.1. Receptor de quimiocina CCR4.....	31
1.10.2. Células T reguladoras – Tregs.....	33
<b>2. Objetivos</b> .....	42
Objetivo Geral.....	42
Objetivos Específicos.....	42
<b>3. Métodos</b> .....	43
3.1. Animais.....	43
3.2. Indução de diabetes.....	43
3.3. Dosagem de glicemia.....	43
3.4. Administração de IL-2, PC61 (anti-CD25) e anti-CCL17/22.....	43
3.5. Anestesia e lesão.....	44
3.6. Avaliação Morfométrica.....	44
3.7. Análise Histológica.....	45
3.8. Quantificação do colágeno total.....	45
3.9. Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	46
3.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	46
3.10.1. Cytometric Bead Array (CBA).....	46
3.10.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	47
3.11. Isolamento das células das feridas.....	47
3.12. Citometria de Fluxo – Facs.....	48
3.13. Análise estatística.....	49
<b>4. Resultados</b>	
4.1. Contração da área da lesão de camundongos diabéticos e não diabéticos	
4.2. Contração da área da lesão de camundongos C57BL/6 e CCR4 <sup>-/-</sup> diabéticos	
4.3. Contração da área da lesão de camundongos diabéticos CCR4 <sup>-/-</sup> , C57BL/6 e C57BL/6 que receberam IL-2, PC61 (anti-CD25) e anti-CCL17/22	
4.4. Caracterização do perfil histológico da lesão dos camundongos diabéticos	
4.5. Análise do depósito de colágeno total nas lesões	
4.6. Quantificação de citocinas e quimiocinas no homogeneizado de lesões	
4.7. Análise do recrutamento de neutrófilos através da dosagem de MPO	
4.8. Quantificação e diferenciação do infiltrado celular na lesão	
<b>5. Discussão</b>	
<b>6. Conclusões</b>	

## **7. Referências Bibliográficas**

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Diagrama da pele humana demonstrando as duas principais camadas da pele: epiderme e derme.....	18
<b>Figura 2:</b> Diagrama da epiderme humana mostrando suas quatro camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal.....	20
<b>Figura 3:</b> Fases clássicas da cicatrização de feridas e padrão de infiltrado inflamatório em feridas da derme.....	23
<b>Figura 4:</b> Fases clássicas do reparo de feridas. Há três estágios clássicos no reparo de feridas: (A) inflamação, (B) proliferação e (C) remodelação.....	26
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de ação das Tregs.....	34
<b>Figura 6:</b> Marcadores das Tregs.....	36
<b>Figura 7:</b> Receptores expressos pelas Tregs que direcionam a migração para diferentes tecidos e microambientes.....	38
<b>Figura 8:</b> Recirculação das células Tregs durante uma resposta imune.....	40
<b>Figura 9:</b> Os animais C57BL/6 diabéticos possuem um retardo no processo de cicatrização em relação aos animais C57BL/6 não diabéticos.....	
<b>Figura 10:</b> Os animais CCR4 <sup>-/-</sup> diabéticos possuem um acelerado processo de cicatrização quando comparado aos animais C57BL/6 diabéticos.....	
<b>Figura 11:</b> Contração da área da lesão de camundongos diabéticos CCR4 <sup>-/-</sup> , C57BL/6 e C57BL/6 que receberam IL-2, luciferase, PC61 e CCL17/22.....	
<b>Figura 12:</b> Análises histológicas.....	
<b>Figura 13:</b> Análises histológicas.....	
<b>Figura 14:</b> Análise do depósito de colágeno total.....	
<b>Figura 15:</b> Os animais CCR4 <sup>-/-</sup> diabéticos possuem um maior depósito de fibras de colágeno.	
<b>Figura 16:</b> Análise do perfil de citocinas e quimiocinas liberadas no leito da lesão.....	
<b>Figura 17:</b> Os animais CCR4 <sup>-/-</sup> diabéticos tendem a aumentar o recrutamento de neutrófilos para a lesão.....	
<b>Figura 18:</b> Os animais CCR4 <sup>-/-</sup> diabéticos aumentam o recrutamento de neutrófilos para a lesão.....	
<b>Figura 19:</b> Análise da migração de macrófagos para a lesão.....	
<b>Figura 20:</b> Análise da migração de células Tregs para a lesão.....	

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Receptores de quimiocinas e moléculas de adesão expressos nas Tregs.....	37
---	----

## **Lista de abreviaturas**

**A2A** - receptor purinérgico de adenosina

**ACK** – tampão de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KHCO}_3 + \text{EDTA Na}_2\text{H}_2\text{O}$ ) das células vermelhas do sangue (hémaceas).

**AGEs** - produtos finais de glicação avançada

**AMPc** – monofosfato cíclico de adenosina

**APCs** - células apresentadoras de antígenos

**BSA** – albumina bovina sérica

**C57BL/6** – nomenclatura do animal B6

**CBA** – “*cytometric bead array*”

**CCL17 (TARC)** – quimiocina reguladora da ativação do timo.

**CCL22 (MDC)** – quimiocina derivada de macrófagos

**CCR10** – receptor de quimiocina 10

**CCR4** – receptor de quimiocina 4

**CCR8** – receptor de quimiocina 8

**CCS** – Centro de Ciências e Saúde

**CECAL** - Centro de Criação de Animais de Laboratório

**CEUA** - Comissão de Uso de Animais

**CTLA-4** – antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico

**CXCL** – quimiocina CXC ligante

**CXCL10** – quimiocina do ligante 10

**CXCR2** – receptor de quimiocina CXC2

**DCs** – células dendríticas

**Diab** – diabéticos

**DM** – Diabetes *mellitus*

**DM1** – Diabetes *mellitus* tipo 1

**DM2** – Diabetes *mellitus* tipo 2

**ECM** - matriz extracelular

**ELISA** – ensaio Imunoenzimático

**EUA** – Estados Unidos da América

**Facs** – “*Fluorescence activated cell sorting*”

**Foxp3** - fator de transcrição *forkhead-box p3*

**GITR** – receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide

**GLUT-2** – transportador de glicose

**GrzA** - granzima A

**GrzB** - granzima B

**HE** – hematoxilina e eosina

**HTAB** - brometo de hexadeciltrimetilamônio

**I** – intersecção

**I.V.** - via intravenosa

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IC** – infiltrado celular

**ICAM** – molécula de adesão intracelular 1

**IDO** - 2,3 dioxigenase indoleamina

**IFN- $\gamma$**  – interferon gama

**IL** – interleucina

**IL-15** – interleucina 15

**IL-2** – interleucina 2

**IL-35** – interleucina 35

**IPEX** - imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia e herança ligada ao cromossomo X

**kDa** - quilodaltons

**LAG3** - ligação do gene 3 ativador de linfócitos

**LCs** – células de Langerhas

**MCP-1** – proteína quimiotática de monócitos 1

**MHC** – complexo de histocompatibilidade

**MMPs** – metaloproteinase de matriz

**MPO** – mieloperoxidase

**PBS** – tampão fosfato

**PC61** – anticorpo monoclonal anti-CD25

**Pfr** - perforina

**PL** – Pele lesada

**PN** – Pele normal

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**SFB** – soro fetal bovino

**TCR** – receptor de célula T

**Teff** - célula T efetora

**TGF- $\beta$**  fator de crescimento transformador beta

**T<sub>h</sub>1** – célula T helper 1

**T<sub>h</sub>2** - célula T helper 2

**TMB** - 3,3,3,3-tetrametilbenzidina

**TNF-  $\alpha$**  – fator de necrose tumoral alfa

**T-PBS** - PBS + Tween 20

**Tr1** - células T reguladoras tipo 1

**T<sub>reg</sub>** – células T reguladoras

**UFRJ** – Universidade Federal do Rio de Janeiro

**UV** - raios ultravioletas

## 1. Introdução

A cicatrização de feridas ainda hoje é um problema clínico significativo. Estima-se que 1-2% da população de países desenvolvidos sofrerão com feridas crônicas em algum momento de suas vidas. Apenas nos EUA, 6.5 milhões de pacientes possuem feridas crônicas o que representa um grande impacto nos custos dos sistemas de saúde pública (Sen *et al.*, 2009).

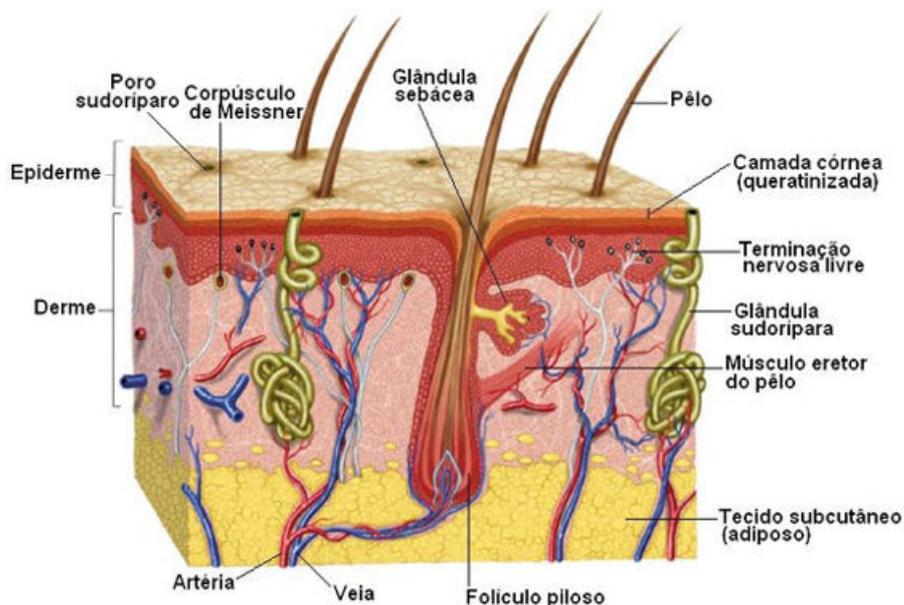
O valor gasto em cuidados com as feridas e a perda de produtividade dos indivíduos acometidos e suas famílias representam um grande custo para toda a sociedade (Stadelmann *et al.*, 1998). De acordo com a Global Industry Analysts Inc. o mercado mundial de curativos pode chegar a US\$ 22.8 bilhões em 2017 (Analysts, 2010). No Brasil ainda não há dados estatísticos sobre a população que sofre com feridas. No entanto, uma empresa brasileira do mercado de curativos, a LM Farma Indústria e comércio S/A, faturou em torno de R\$ 30 milhões no ano de 2011 com previsão para aumentar em 10% o faturamento no ano seguinte. O crescimento do mercado de curativos reflete o aumento da demanda indicando o grande número de pacientes que necessitam de cuidados especiais para o tratamento de feridas.

Muitos fatores extrínsecos e intrínsecos ao paciente podem interferir no processo de cicatrização. Os fatores extrínsecos estão relacionados às condições da ferida e ao tratamento realizado: cuidados com a assepsia local, com a realização dos curativos e os produtos utilizados. Enquanto os fatores intrínsecos estão relacionados às condições clínicas do paciente, e podem ser agravadas na presença de doenças crônicas, como o diabetes, doenças cardiovasculares e doenças imunológicas, que alteram o fluxo sanguíneo e a resposta imune (Tazima *et al.*, 2008). Pacientes com diabetes apresentam retardo na cicatrização de feridas, sendo considerada crônica, uma vez que não são fecham no tempo esperado (mais de seis meses) ou que apresentam complicações (Chettibi *et al.*, 2009; Santos, 2000; Ferreira *et al.*, 2006). Como resultado de feridas crônicas, os pacientes desenvolvem úlceras que são geralmente dolorosas e difíceis de tratar. Caso esses cuidados não sejam efetuados o paciente pode sofrer consequências graves, tais como: amputação de membros, infecções generalizadas e dor intensa o que inviabiliza a realização das atividades normais dos indivíduos. O imenso impacto social e econômico de feridas crônicas ressalta a importância da realização de estudos que possam contribuir para aperfeiçoar os recursos disponíveis, assim como contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de feridas.

Assim, o entendimento do processo de cicatrização é um significativo desafio para os profissionais de saúde que buscam novas terapias, para que estas sejam incorporadas em protocolos de tratamento de feridas.

### 1.1. Estrutura e fisiologia da pele

A pele é o revestimento externo do corpo, considerado o maior órgão do corpo humano e o mais pesado, representando aproximadamente 16% do peso corporal, sendo constituída por duas camadas: a epiderme, a camada mais superficial, e a derme, que esta intimamente relacionada com o tecido subcutâneo (adiposo) (**Figura1**) (Isaac *et al.*, 2010; Junqueira e Carneiro, 2004).

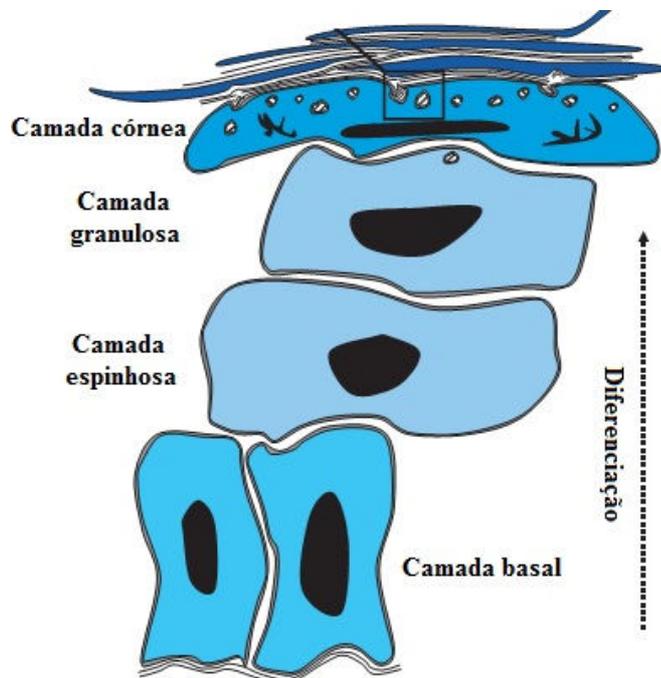


**Figura 1- Diagrama da pele humana demonstrando as duas principais camadas da pele: epiderme e derme.** Disponível em <<http://www.auladeanatomia.com/tegumentar/tegumentar.htm>>.

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. As células mais abundantes neste epitélio são os queratinócitos que produzem a queratina. A queratina é uma proteína resistente e impermeável responsável pela proteção da pele. Nesse epitélio existem também os melanócitos (produtores de melanina, um pigmento castanho que absorve os raios ultravioletas - UV), as células de Langerhans (células dendríticas da pele) e as células de Merkel (células sensitivas – tato, pressão) (que existem em maior quantidade na

pele espessa da palma das mãos e planta dos pés, localizadas na parte profunda da epiderme apoiadas na membrana basal) (Isaac *et al.*, 2010; Junqueira e Carneiro, 2004).

Pela definição morfológica, a epiderme pode ser dividida em quatro camadas distintas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. A camada basal é a mais profunda, em contato com a derme, constituída por células cúbicas pouco diferenciadas que se dividem continuamente, dando origem a todas as outras camadas. Algumas destas células diferenciam-se e passam para as camadas mais superficiais, enquanto outras permanecem na camada basal e continuam a se dividir. A camada espinhosa é constituída por células cúbicas ou achatadas com mais queratina que a camada basal. Começam a formar junções celulares umas com as outras, como desmossomas (por isso o aspecto de espinhos). A camada granulosa é constituída de células achatadas, com grânulos de queratina proeminentes. A camada córnea é constituída de células achatadas eosinófilas sem núcleo (mortas) com grande quantidade de filamentos, principalmente queratinas (**Figura 2**) (Proksch *et al.*, 2008).



**Figura 2 – Diagrama da epiderme humana mostrando suas quatro camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal.** (Adaptado de Proksch *et al.*, 2008).

A derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipodérmico. A derme é constituída por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina, e outros elementos da matriz extracelular, como proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água. A derme é dividida em duas camadas de limites pouco distintos: a papilar em contato com a epiderme, e a reticular, mais profunda onde predominam as fibras colagenosas. É na derme que se localizam os vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, vasos linfáticos e também os nervos e os órgãos sensoriais a eles associados. Sua espessura é superior a da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tênsil e resistência mecânica (Isaac *et al.*, 2010; Junqueira e Carneiro, 2004).

A pele também exibe uma ampla lista de funções essenciais para a homeostase do organismo, tais como a manutenção da integridade do corpo, a proteção contra agressões externas, o isolamento corporal da água, a sensibilidade a estímulos externos, a função de barreira contra os microrganismos, tem papel essencial na termo regulação, e finalmente, a absorção e excreção de substâncias (Isaac *et al.*, 2010; Junqueira e Carneiro, 2004; Velnar *et al.*, 2009).

Como qualquer outro órgão, a pele está propensa a sofrer agressões oriundas de fatores patológicos intrínsecos e extrínsecos que irão causar o desenvolvimento de alterações na sua constituição como, por exemplo, as feridas cutâneas.

## **1.2. Fases clássicas da cicatrização de feridas**

O processo de reparo de feridas é um dos mais complexos processos biológicos que ocorrem no organismo (Tazima *et al.*, 2008). A cicatrização normal de feridas compreende uma cascata complexa e altamente integrada de eventos, que exige a interação de muitos tipos celulares, incluindo as células inflamatórias, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, bem como o envolvimento de fatores de crescimento e enzimas. (Singer e Clark, 1999).

Em todos os mamíferos o processo de cicatrização de feridas dérmicas passa por três fases sobrepostas antes que seu reparo completo ocorra: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (**Figuras 3**) (Tazima *et al.*, 2008; Gurtner *et al.*, 2008; Velnar *et al.*, 2009; DiPietro, 1995; Balbino *et al.*, 2005; Gogia, 2003).

A fase inflamatória prepara a ferida para a cicatrização e remove os restos celulares e tecidos desvitalizados, a fase proliferativa reconstrói as estruturas danificadas e proporciona força tênsil à ferida, e a fase de remodelamento modifica a cicatriz imatura para uma madura, a fim de ajustar o tamanho da ferida e dar forma à lesão (Gogia, 2003).

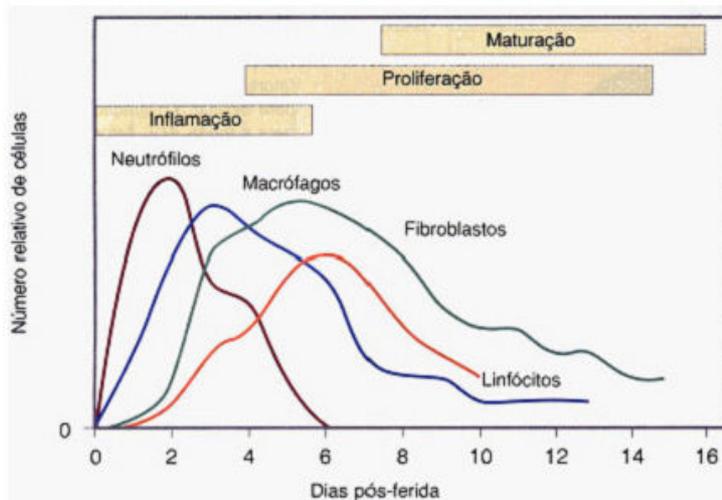


Figura 3- Fases clássicas da cicatrização de feridas e padrão de infiltrado inflamatório em feridas da derme. (Tazima *et al.*, 2008).

### 1.3. Fase Inflamatória

O processo inflamatório desencadeia a cicatrização; se não há inflamação, a cicatrização de feridas será retardada. A fase inflamatória usualmente dura de 24 a 48 horas e está completa em 2 semanas, seguida por uma fase subaguda de aproximadamente 2 semanas (Gogia, 2003).

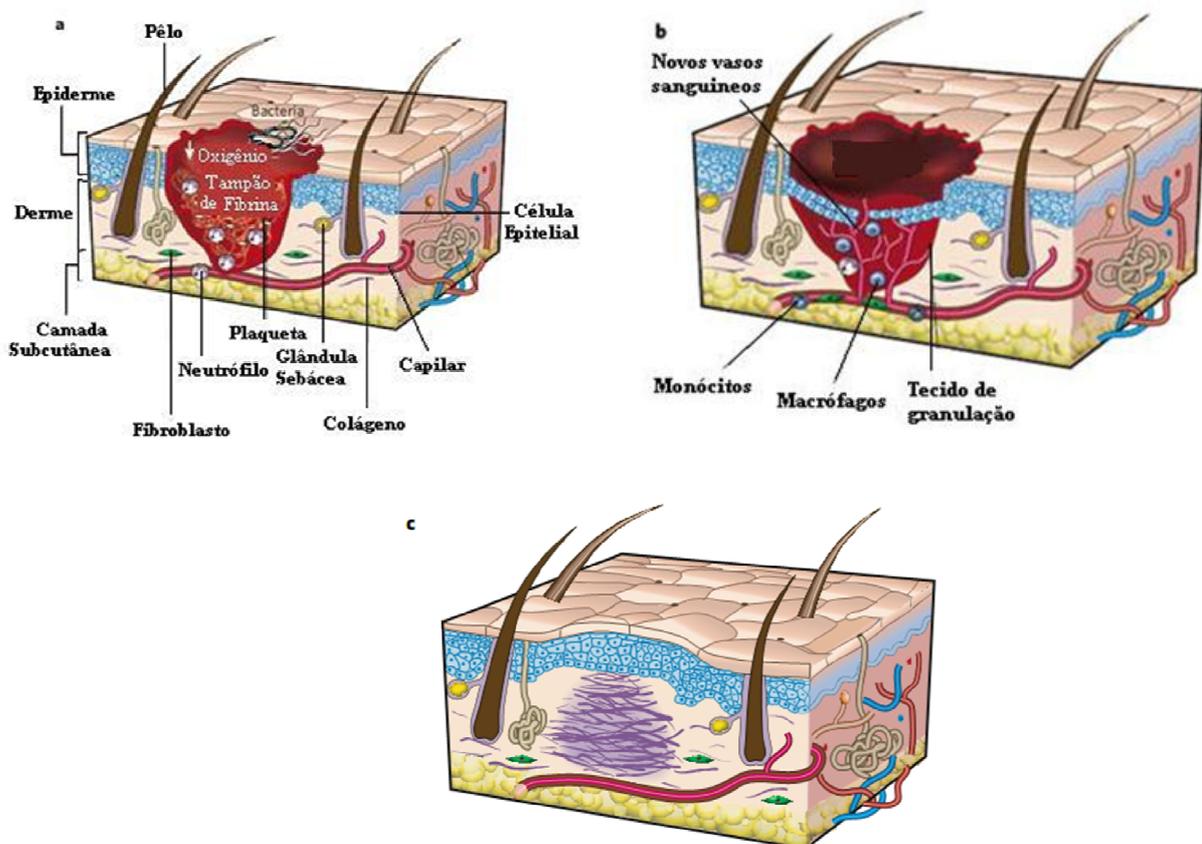
O processo de inflamação ocorre imediatamente após o dano tecidual, e eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para o tamponamento dos vasos rompidos. Quase concomitante ao estímulo lesivo, e devido à influência nervosa (descarga adrenérgicas) e ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos, ocorre vasoconstrição como primeira resposta, para lentificar ou parar a perda sanguínea na área afetada (Gogia, 2003; Balbino *et al.*, 2005).

Os componentes da cascata de coagulação, as vias inflamatórias e o sistema imunológico são ativados para prevenir perdas de fluido e sangue, para remover tecidos desvitalizados e para prevenir infecção. A homeostasia é alcançada inicialmente pela

formação de um agregado de plaquetas, seguido por uma matriz de fibrina, os quais formam uma sustentação ideal para a infiltração celular (Grose e Werner, 2004; Balbino *et al.*, 2005).

Os neutrófilos oriundos da circulação são as primeiras células a alcançarem a região inflamada, sendo o tipo celular predominante entre o primeiro e segundo dias (Balbino *et al.*, 2005; Gurtner *et al.*, 2008). Os neutrófilos são recrutados para a ferida em resposta à ativação do complemento, à desgranulação de plaquetas, ativação dos leucócitos residentes e pelos produtos da degradação microbiana, e são responsáveis por iniciar a fagocitose de tecidos desvitalizados e substâncias estranhas. Os neutrófilos são células comumente encontradas em sítios de inflamação, porém, tendem a deixar o local com o passar do tempo devido ao direcionamento natural da fase inflamatória para a fase de reparo (Grose e Werner, 2004; Gurtner *et al.*, 2008).

Após 2-3 dias, aparecem monócitos na ferida e estes se diferenciam em macrófagos. Acredita-se que os macrófagos são cruciais para coordenar os eventos tardios da resposta à injúria (Figura 4A) (Gurtner *et al.*, 2008).



**Figura 4 - Fases clássicas do reparo de feridas.** Há três estágios clássicos no reparo de feridas: (A) inflamação, (B) proliferação e (C) remodelação (Adaptado de Gurtner *et al.*, 2008).

#### 1.4. Fase Proliferativa

A fase proliferativa ocorre entre 2-10 dias após a injúria e é caracterizada pela proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. Esta fase continua até a cicatrização da ferida. A regeneração da epiderme é iniciada horas após a ocorrência da lesão (Gogia, 2008). O reparo epitelial passa por uma sequência de migração, proliferação e diferenciação celular (**Figura 4B**). O primeiro evento é a migração de queratinócitos sobre a pele lesada. A neoangiogênese, associada à presença de macrófagos e fibroblastos, substitui a matriz de fibrina pelo tecido de granulação, o qual forma um novo substrato para a migração dos queratinócitos no estágio tardio do processo de reparo. Os queratinócitos são as células que direcionam o processo de reparo para a fase de proliferação e maturação, e finalmente há o restabelecimento da função de barreira do epitélio. Os queratinócitos ativados são hiperproliferativos, migratórios, alteram seu citoesqueleto, aumentam a expressão de receptores de superfície e produzem componentes da membrana basal. Essas respostas são essenciais para a reepitelização da área de injúria. Queratinócitos ativados também produzem sinais parácrinos para alertar fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e linfócitos, assim como sinais para os queratinócitos vizinhos. Posteriormente os queratinócitos recebem sinais para desativação (Freedberg *et al.*, 2001).

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação, após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente dos macrófagos, são ativados e migram das margens da ferida para o seu centro. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessário a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, a neovascularização da região da lesão (Balbino *et al.*, 2005).

Com a fibroplasia, se inicia a formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia) composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados. Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exudativos e sangram com facilidade. A neovascularização é essencial neste estágio porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (Balbino *et al.*, 2005).

Na parte final desta fase, os fibroblastos, que são atraídos para a borda da ferida, são estimulados pelos macrófagos, e alguns se diferenciam em miofibroblastos (Opalenik e Davidson, 2005). Outras células como células epiteliais, endoteliais e mesenquimais, também podem se diferenciar em miofibroblastos. Os miofibroblastos são células contráteis que, ao longo do tempo, aproximam as bordas da ferida. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que em última instância forma o principal componente da cicatriz madura (Werner, Krieg, Smola, 2007).

Quando a arquitetura epitelial é reconstituída, num processo de cicatrização normal, os miofibroblastos desaparecem através do processo de apoptose. Quando esse processo é falho ocorre à formação de cicatrizes hipertróficas (Balbino *et al.*, 2005).

### **1.5. Fase de Remodelamento**

O remodelamento inicia-se 2-3 semanas após a injúria e pode durar por um ano ou mais. Durante esse estágio, todos os processos ativados após a injúria diminuem gradualmente e cessam. Assim a maioria das células entra em apoptose ou saem da ferida, deixando uma massa que contém poucas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. A interação epitelial-mesenquimal provavelmente regula a integridade e homeostasia da pele (Szabowski e *et al.*, 2000). Após 6-12 meses, a matriz extracelular é ativamente remodelada e sua composição passa de colágeno tipo III para colágeno tipo I, principalmente. Esse processo é devido à ação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e isso reforça o tecido de reparo. Entretanto, tal tecido nunca irá recuperar as propriedades de uma pele original (**Figura 4C**) (Levenson *et al.*, 1965).

### **1.6. Feridas Cutâneas**

Desde os primórdios da humanidade até os dias atuais, as feridas constituem um problema de saúde para o ser humano, pois as lesões de pele têm repercussões físicas, associadas à dor, imobilidade e incapacidade; psicoemocionais, relacionadas à autoestima e

autoimagem; e diminuição da qualidade de vida, originadas por hospitalizações e afastamento do convívio social.

As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas no tempo esperado ou que apresentam complicações e muitas das vezes estão associadas a uma comorbidade. As feridas crônicas representam uma epidemia silenciosa, que afeta uma grande fração da população mundial e representa grande ameaça para a saúde pública e para a economia (Santos, 2000). O custo do tratamento dessas feridas está crescendo rapidamente e estima-se um forte aumento na incidência de diabetes e obesidade devido ao envelhecimento da população e mudanças nos hábitos alimentares causando um enorme custo para a área da saúde (Sen *et al.*, 2009).

Os Estados Unidos tem um gasto anual de 25 bilhões de dólares no tratamento de feridas crônicas. Atualmente, mais de 1000 centros ambulatoriais de ferida estão em operação representando o maior mercado do mundo e o que mais cresce na área do tratamento de feridas (Sen *et al.*, 2009).

Existem poucos dados estatísticos sobre a população que sofre com feridas no Brasil. De acordo com uma pesquisa realizada pela Frost & Sullivan, empresa internacional de pesquisa e consultoria de mercado, o setor de curativos no Brasil representou US\$ 121,1 milhões em 2010 e a perspectiva é que este mercado cresça 3% ao ano até 2016 (Wound Care Management, 2007). Num estudo realizado com pacientes internados em um hospital de grande porte em Belo Horizonte, dos 1.073 pacientes internados no período estudado, 525 (48,9%) apresentavam feridas. A hipertensão arterial foi a comorbidade apresentada com maior percentual (432-31,1%) de pacientes, seguida pelo Diabetes mellitus (166-12,3%). Do total de feridas, 18,6% eram consideradas crônicas. Dessas 10,4% eram consideradas úlceras diabéticas (Maciel, 2008).

## **1.7. Diabetes**

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica comumente irreversível, que embora seja de caráter controlável, sua prevalência global continua a aumentar devido ao envelhecimento populacional e alterações no estilo de vida. Atualmente, existem cerca de 366 milhões de diabéticos no mundo e estima-se que em um período de 20 anos a população de diabéticos chegará a 552 milhões (Federação Internacional de Diabetes, 2010). A Índia foi

indicada como principal contribuinte para este índice global no ano de 2000 com um número estimado de 31,7 milhões de diabéticos adultos. O número previsto de diabéticos na Índia ao longo das próximas três décadas foi estimado para chegar a 80 milhões de diabéticos adultos (Vaz e Patnaik, 2012). De acordo com a Associação Americana de Diabetes, 7% da população em geral e 21% das pessoas acima de 60 anos de idade possuem diabetes nos EUA (Pradhan *et al.*, 2007; Hobizal *et al.*, 2012), contabilizando cerca de 20,8 milhões de diabéticos, sendo que para 2030 estes números irão dobrar (Brem e Tomic-Canic, 2007). No Brasil, as projeções para 2030 são de que possa existir cerca de 39,9 milhões de diabéticos, o que representa um grande aumento em relação aos 5 milhões de diabéticos estimados em 2002 (Federação Internacional de Diabetes, 2010; Ferreira *et al.*, 2006).

As duas principais formas de diabetes *mellitus* em incidência, prevalência e importância clínica, são o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Além desses, existem outros tipos específicos de diabetes e também o diabetes gestacional (Associação Americana de Diabetes, 2008). É de nosso particular interesse o DM1, visto que ele será usado como nosso modelo experimental para a indução de lesão crônica.

O DM1, 5-10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células  $\beta$  pancreáticas com conseqüente deficiência na produção de insulina. Diferentes processos patogênicos estão relacionados ao desenvolvimento do diabetes, que vão desde a destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, até alterações metabólicas que levam a resistência à insulina. Existem também casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM1 (Fabrini *et al.*, 2008). Na maioria dos casos, o DM1 ocorre devido à destruição autoimune induzida por inflamação e apoptose das células  $\beta$  pancreáticas, geralmente associada com a infiltração de células imune inata, que produzem citocinas, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o qual promove a apoptose das células  $\beta$  e aumento do infiltrado de células T específicas, que atacam e destroem as células  $\beta$  (Graves e Kayal, 2011).

O DM é caracterizado principalmente pela incapacidade do hormônio insulina em exercer seus efeitos, seja pela ausência total ou parcial deste hormônio e/ou resistência celular a este, produzindo uma série de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). A ausência completa da insulina e de suas ações resulta em um excesso de glicose na corrente sanguínea, fato que prejudica o funcionamento normal do organismo e resulta em fenômenos característicos do DM1, como o

desenvolvimento de uma hiperglicemia até o ponto em que ultrapassa o limiar renal de excreção da glicose. Ocorre então uma grande perda de glicose na urina, e a alta concentração urinária desse substrato resulta numa poliúria, que por sua vez leva a sede e desidratação. O escoamento contínuo de carboidratos junto com a diminuição das reservas adiposas de triglicérides e da massa corpórea magra provoca a perda de peso no indivíduo, mesmo com uma ingesta alimentar alta (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007; Levy, 2006). Esse quadro caracteriza assim os sinais clássicos do DM1: hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, poliúria e polifagia, apesar do baixo peso corporal, hiperlipidemia, cetonúria e acidose.

### **1.8. Feridas em indivíduos diabéticos**

Como descrito anteriormente, a cicatrização de feridas requer a interação bem orquestrada de complexos eventos biológicos e moleculares como a migração e proliferação celular e o depósito de matriz extracelular (ECM). No entanto os indivíduos diabéticos sofrem com um retardo na cicatrização devido à estagnação do processo inflamatório (Pradhan *et al.*, 2007; Velnar *et al.*, 2009).

As alterações hemodinâmicas provocadas pelo diabetes são uma das principais causas no retardo do processo de cicatrização. A situação de estase venosa juntamente com a hipóxia (ausência de O<sub>2</sub>), que na maioria das vezes é derivada da insuficiência vascular periférica, é prejudicial para o processo de cicatrização, pois pode exacerbar a resposta inflamatória, alterando o processo de cicatrização por aumento dos níveis de radicais de oxigênio na lesão tecidual (Guo e DiPietro, 2010). Além disso, o excesso da oferta de glicose na corrente sanguínea também provoca aumento na produção de espécies de radicais livres (ROS). Estes, estão relacionado à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), alteração na via de polióis de hexosaminas e da reação inflamatória com liberação de citocinas e disfunção endotelial (Guo e DiPietro, 2010; Acosta *et al.*, 2008).

O processo de cicatrização dos diabéticos também envolve a desregulação das funções celulares. Estas incluem função de leucócitos diminuída relacionada com a hiperglicemia, a diminuição ou deficiência na produção de fatores de crescimento, desequilíbrio entre o acúmulo de matriz extracelular e a remoção pelas MMPs, resposta angiogênica prejudicada, ativação insuficiente de macrófagos, acúmulo de colágeno, desregulação na quantidade de

tecido de granulação, migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos (Brem e Tomic-Canic, 2007; Pradhan *et al.*, 2007; Guo e DiPietro, 2010).

Os pacientes diabéticos são mais propensos ao desenvolvimento de feridas crônicas e/ou úlceras nos pés devido a uma multiplicidade de fatores, assim como o desenvolvimento de neuropatias, doenças vasculares periféricas, traumas e infecções (Khanolkar *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2010; Pradhan *et al.*, 2007). As úlceras de pé são uma das principais causas de admissões em hospitais quando se fala em indivíduos diabéticos, é também uma das principais morbidades associada ao diabetes, muita das vezes levando a dor, ao sofrimento e a uma baixa qualidade de vida para esses pacientes. Estima-se que 15-25% de todos os pacientes com diabetes desenvolva o pé diabético ou as úlceras de pé, e 84% das amputações de perna estejam relacionadas com o diabetes (Brem e Tomic-Canic, 2007; Pradhan *et al.*, 2007; Kimberlee *et al.*, 2012).

O prolongado processo de cura dessas feridas diabéticas, por vezes interrompida devido ao alto custo, afeta a qualidade de vida do paciente devido à mobilidade diminuída e perda de produtividade. Este processo de cicatrização é um significativo desafio para os profissionais de saúde que buscam terapias alternativas e formas de aperfeiçoar e incorporá-las em protocolos de tratamento de feridas de forma adequada.

### **1.9. Indução de diabetes**

A fim de estudar o processo de cicatrização de feridas cutâneas fez-se necessário induzir o diabetes para obter um modelo de ferida de difícil cicatrização. Os agentes diabetogênicos como a aloxana e estreptozotocina têm sido utilizados em estudos experimentais para indução ao DM1, pois estas drogas têm a capacidade de reproduzir em animais de laboratório o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem na doença naturalmente adquirida. Ambos xenobióticos caracterizam-se por seu efeito tóxico seletivo às células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas (Bairros, 2009). A aloxana, assim como a estreptozotocina, é um análogo da glicose que se acumula preferencialmente nas células  $\beta$  pancreáticas através do transportador de glicose GLUT2. A diabetogenicidade da aloxana é devido à formação de espécie reativas de oxigênio (ROS) com consequente necrose das células  $\beta$  (Lenzen, 2008).

A aloxana foi inicialmente descrita por Brugnatelli em 1818 e suas propriedades diabetogênicas foram reportadas por Dunn, Sheehan e McLethie em 1943 ao administrar esta droga em coelhos e observarem uma necrose específica das ilhotas pancreáticas. Desde então, a aloxana tem sido utilizado como indutor do DM1 em modelos animais. (Bairros, 2009). A aloxana exerce suas ações diabetogênicas quando administrado de forma parenteral: intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. A dose de aloxana requerida para indução ao DM depende da espécie de animal, forma de administração e status nutricional (Bairros, 2009).

Os camundongos diabéticos induzidos com aloxana apresentam sinais clássicos do DM1 humano como hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, poliúria, polifagia, baixo peso corporal, danos no sistema ocular, renal, cardíaco, vascular e nervoso, hiperlipidemia, cetonúria e acidose (Bairros, 2009; Rerup, 1970).

## **1.10. Resposta imunológica no reparo tecidual**

### **1.10.1. Receptor de quimiocina CCR4**

A cicatrização de feridas seja qual for sua origem: trauma, cirúrgica ou infecciosa, procede através de um padrão de sobreposição de eventos, incluindo a coagulação, inflamação, reepitelização, a formação de tecido de granulação e remodelação do tecido. Muitos destes processos são regulados por quimiocinas, uma superfamília de proteínas de 8-15 quilodaltons (kDa), que possuem atividades biológicas diversas. Definido por uma tetracisteína, estas proteínas são subdivididas em quatro famílias distintas de acordo com as configurações dos resíduos de cisteína na extremidade N-terminal (Milatovic e Richmond, 2008). Hoje em dia é usada uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores, onde os receptores são definidos como: CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Entretanto, algumas quimiocinas ainda são distinguidas por seus nomes tradicionais (Olson e Ley, 2002).

As quimiocinas são importantes moléculas envolvidas no controle da migração de células, principalmente células do sistema imunológico, para determinados sítios no organismo. As quimiocinas são secretadas por diversos tipos celulares de forma constitutiva

ou quando estas são ativadas por algum estímulo inflamatório (Soldevila e Zepeda, 2003; Behm *et al.*, 2001).

As quimiocinas se ligam aos receptores de sete alças transmembranares associado às proteínas Gs, atuam através destes receptores de alta afinidade expostos na superfície das células (Kim *et al.*, 2002). Muitas quimiocinas são constitutivamente expressas e mostram-se aumentadas no dano tecidual cutâneo. Neste último caso, essas direcionam a migração de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos) para dentro do leito da lesão (Kroeze *et al.*, 2012; Behm *et al.*, 2001).

O papel das quimiocinas ou seus receptores individuais tem sido estudado no processo de cicatrização de feridas, principalmente em modelos de camundongos, dando destaque às famílias CXC e CC. Por exemplo, os camundongos transgênicos que super expressam CXCL10 na pele (uma quimiocina angiostática que recruta linfócitos T) exibiram alterações no processo de cicatrização, caracterizada por aumento da fase inflamatória com fase de granulação alongada e desorganizada. Essa fase de granulação alongada foi caracterizada pela formação prejudicada da vasculatura do leito da ferida exibindo feridas que não cicatrizavam. Além disso, estudos em camundongos deficientes para o receptor CXCR2 (um receptor de quimiocinas envolvidos na angiogênese) mostraram diminuição no recrutamento de neutrófilos, redução da migração e proliferação dos queratinócitos durante a reepitelização, e um atraso significativo na neovascularização, retardando o fechamento das lesões (Milatovic e Richmond, 2008).

Visto a importância da interação quimiocina/receptor, nosso grupo vem investigando a participação do receptor de quimiocina CCR4 no processo de cicatrização. O receptor de quimiocina CCR4 responde a dois ligantes: a quimiocina derivada de macrófagos (MDC/CCL22) e a quimiocina regulada pela ativação do timo (TARC/CCL17). Ambas são produzidas essencialmente por monócitos e macrófagos, células dendríticas e também por células estruturais, células endoteliais e fibroblastos (Iellem *et al.*, 2001; Wang e *et al.*, 2010), indicando que essas quimiocinas podem também contribuir para a regulação da reepitelização, a formação de tecido de granulação, angiogênese e remodelação do tecido (Kroeze *et al.*, 2012).

O receptor de quimiocinas CCR4 está expresso funcionalmente em distintos subtipos de células T, incluindo células T ativadas, células T<sub>H</sub>2 e células T reguladoras (Tregs). O CCR4 também foi encontrado nas plaquetas, células exterminadoras naturais (NK),

macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas são importantes fontes de liberação de CCL17 e em contato com macrófagos produzem CCL22 durante a inflamação e na homeostase (Poppensieker *et al.*, 2011).

Ainda é controverso o papel do receptor de quimiocina CCR4 no processo de cicatrização cutânea, entretanto estudos mostram que a ausência desse receptor exacerba o processo inflamatório (Lehtimaki *et al.*, 2010; Dudda *et al.*, 2008). Lehtimaki e colaboradores mostraram no modelo de hipersensibilidade induzida por contato o aumento da inflamação na ausência do receptor (Lehtimaki *et al.*, 2010).

Assim, pressupomos que o receptor de quimiocina CCR4 possui um papel importante no processo de cicatrização cutânea em animais diabéticos, uma vez que a condição do diabetes promove desordens no processo de cicatrização.

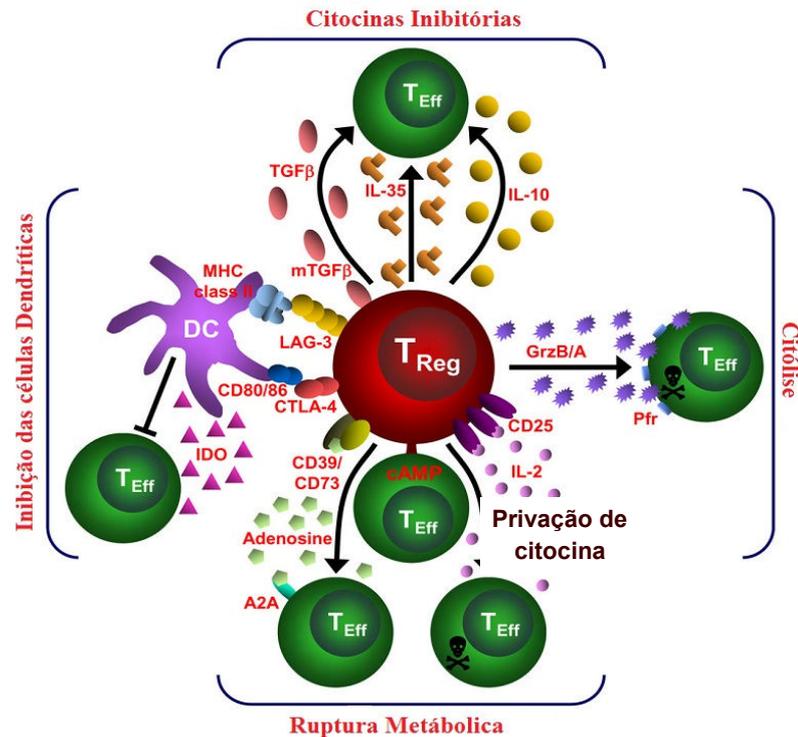
### **1.10.2. Células T reguladoras – Tregs**

As primeiras descrições de células capazes de regular a resposta imune foram nos meados da década de 70, quando foi relatado que algumas células T eram capazes de suprimir o desenvolvimento de doenças autoimunes (Gershon e Kondo, 1970). Em 1995, Sakaguki e colaboradores demonstraram que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressam constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (CD25) são responsáveis por esse efeito regulador. Essa descoberta foi comprovada a partir de evidências experimentais, onde foi observado que a depleção de uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> levava ao desenvolvimento da autoimunidade, em órgão específico em camundongos normais ou em ratos, além disso, a reconstituição da população depletada prevenia o desenvolvimento da autoimunidade. Assim, essa subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foi denominada de células Tregs (Sakaguki *et al.*, 1995).

Já é sabido que as células Tregs naturais são originadas no timo, através de uma interação de alta afinidade do seu receptor de célula T (TCR) com complexos de peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC expressos em células do estroma do timo. Além das células Tregs naturais, vários tipos de células T reguladoras induzidas já foram descritas (Th3 e células T reguladoras tipo 1 – Tr1), essas são induzidas na periferia por ação de fatores

específicos sobre as células T *naive* recém-egressas do timo (Bach, 1995; Pearson e MeDevitt, 1999; Oberg *et al.*, 2011).

As células Tregs são responsáveis pela regulação da resposta imunológica, prevenindo doenças inflamatórias, restringindo respostas aberrantes ou evitando com que a resposta seja inadequada (Lima, 2006; Campbell e Koch, 2011). As células Tregs agem modulando uma grande variedade de componentes tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa, e isso depende de sua habilidade de migrar para tecidos específicos (Campbell e Koch, 2011). O mecanismo utilizado por elas para mediar a supressão varia desde a produção de citocinas incluindo fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$ , interleucina (IL)-10 e IL-35 até o contato célula – célula. Alguns desses já estão bem descritos como: (1) um grande consumo de IL-2 diminuindo sua quantidade no meio, necessária para proliferação da célula T efetora, (2) a supressão da célula T efetora pela transferência do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPc), um potente inibidor da ativação de leucócitos, (3) a supressão por citólise mediada pela secreção de perforina e das granzimas A e B, (4) supressão por contato célula – célula, através da ligação de moléculas de superfície das células Tregs e células dendríticas, como o CTLA-4 e CD80/CD86 que induz a expressão de 2,3 dioxigenase indoleamina (IDO) pelas células dendríticas, uma potente molécula imunossupressora e (5) pelo bloqueio da maturação das células dendríticas através da ligação do gene 3 ativador de linfócitos (LAG3) com o complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II presente nas células dendríticas (**Figura 5**) (Vignali *et al.*, 2008).

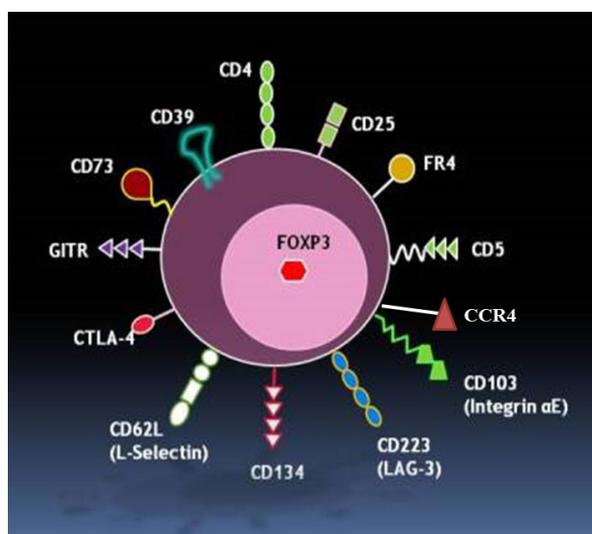


**Figura 5 – Mecanismo de ação das Tregs.** Esse esquema mostra quatro mecanismos de ação utilizados pelas Tregs. Citocinas inibitórias incluindo a IL-10, a IL-35 e o TGF- $\beta$ . A citólise inclui mecanismos de morte dependente da perforina e das granzimas A e B. A ruptura metabólica inclui a apoptose mediada pela privação da IL-2; inibição mediada pelo AMPc e imunossupressão mediada pela geração de CD39 e CD73. A inibição das células dendríticas inclui mecanismo que modulam a maturação e a função das células dendríticas como a supressão da maturação das células dendríticas mediada pela ligação do LAG-3 com o MHC-II e a indução da produção de IDO pelas células dendríticas através das interações CTL-4/CD80-86. T<sub>eff</sub>: célula T efetora; GrzB/A: granzima B ou A; Pfr: perforina; A<sub>2</sub>A: receptor purinérgico de adenosina; IDO: 2,3 dioxigenase indoleamina. (Adaptado de Vignali *et al.*, 2008).

Desde a descoberta das Tregs, apenas o Foxp3 (fator transcricional membro da família *forkhead*) pode ser reconhecido como marcador específico. Experimentos *in vivo* demonstraram a importância desse subtipo de célula T e o papel do Foxp3 no desenvolvimento de uma doença autoimune linfoproliferativa fatal. Em 2001, Bennett e colaboradores, demonstraram que camundongos podiam desenvolver espontaneamente uma mutação no gene Foxp3, ocasionando a síndrome *Scurfy*, que resulta na completa perda das células Tregs e na morte desses animais em 3-4 semanas após o nascimento. Em humanos foi demonstrado que indivíduos com IPEX compartilhavam as mesmas características fenotípicas que os *scurfy*. O IPEX, doença fatal em humanos caracterizada por desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia e herança ligada ao cromossomo X, também esta relacionada

à ocorrência de mutações no gene *Foxp3*. (Oberg e colaboradores, 2011; Campbell e Ziegler, 2007; Bennett e colaboradores, 2001). Em 2003, o grupo do pesquisador Rudensky e o grupo do pesquisador Sakaguchi, mostraram que a desregulação imune gerada em indivíduos com IPEX e animais *Scurfy* eram devido à ausência de Tregs, visto que a expressão de *Foxp3* nas Tregs é necessária para o desenvolvimento da diferenciação das células  $CD4^+ CD25^+$  e sua função supressora. Os trabalhos ainda relatam que células similares ao fenótipo das células Tregs naturais também apresentam atividade supressora (Oberg e colaboradores, 2011).

A célula Treg foi identificada fenotipicamente (**Figura 6**) por expressar em sua superfície altos níveis da cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (CD25), no entanto, análises de expressão de genes revelaram a expressão de vários outros genes, incluindo o receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide, o GITR, e o gene 3 de ativação de linfócitos, o LAG-3, que são expressos após a sua ativação (Yamazaki *et al.*, 2003; Triebel *et al.*, 1990). Outro marcador associado à Treg é o antígeno 4 do linfócito T citotóxico, o CTLA-4. O CTLA-4 é um receptor inibitório que compartilha seus ligantes, CD80 e CD86, com o receptor coestimulatório CD28. O CTLA-4 só é induzido nas células T efetoras após ativação do TCR, enquanto nas Tregs ele é constitutivamente expresso intracelularmente e na sua superfície (Oberg *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2000).



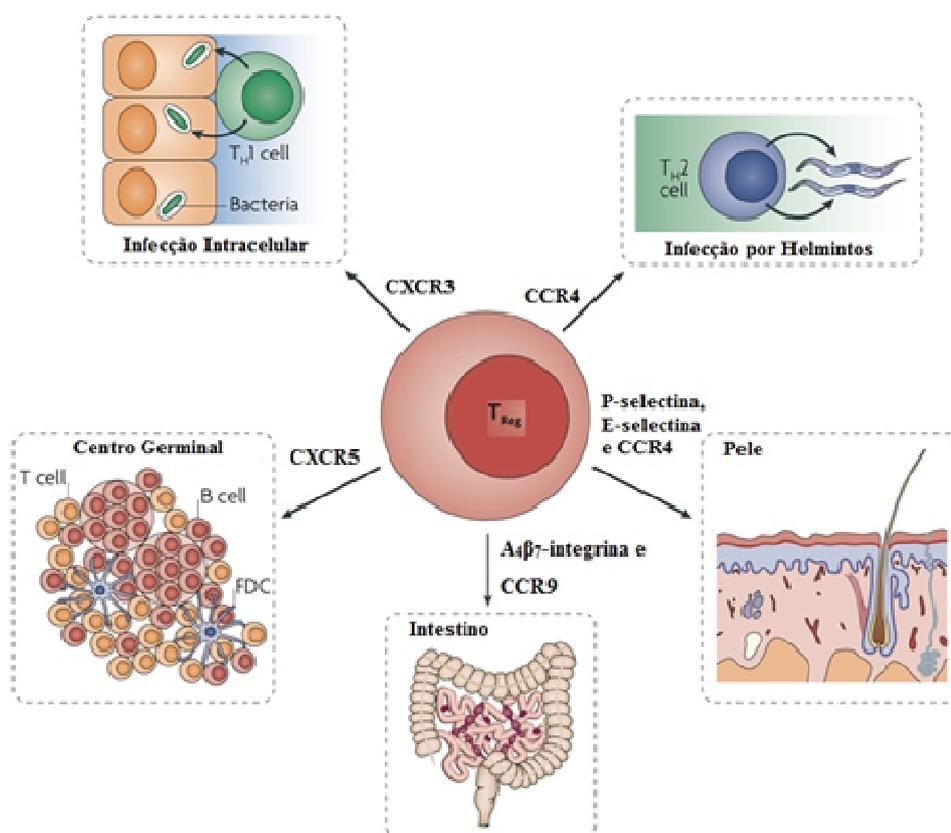
**Figura 6 – Marcadores das Tregs.** As células Tregs expressam diferentes receptores característicos em sua superfície além do fator de transcrição específico o *Foxp3*. Disponível em <<http://www.lucerna-chem.ch/309.html#1b>>.

Além desses marcadores, as Tregs também expressam moléculas de adesão e receptores de quimocinas na sua superfície (**Tabela 1**), responsáveis pela sua distribuição em tecidos linfóides e não linfóides. Em 2001, Iellem e colaboradores demonstraram que as Tregs expressam os receptores CCR4 e CCR8 na sua superfície e que elas migram *in vitro* frente aos ligantes desses receptores.

**Tabela 1 – Receptores de quimocinas e moléculas de adesão expressos nas Tregs**  
(Adaptada de Campbell, 2011).

Sítios de migração da Treg	Receptor	Funções	Referências-chaves
Tecidos linfóides	CD62L	Migração para os LN	Importante no modelo de diabetes NOD-SCID
	CCR7	Migração para os LN e para o baço	Treg CCR7 <sup>-/-</sup> falha na prevenção da colite
Tecidos não linfóides	Ligantes de E-selectina, P-selectina	Migração para pele e tecidos inflamados	Importante na tolerância cutânea
	Integrina $\alpha E\beta 7$	Localização epitelial	Retenção da Treg durante infecção com <i>L.major</i>
	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Migração para os tecidos linfóides associados ao intestino	Funciona na migração da Treg para o intestino
	CCR2	Migração para os tecidos inflamados	Importante na migração da Treg durante a rejeição aloenxerto
	CCR4	Migração para a pele e outros tecidos inflamados	Importante na tolerância pulmonar e cutânea
	CCR5	Migração para tecidos inflamados	Direciona a localização da Treg na infecção por <i>L.major</i>
	CCR6	Migração para sítios de inflamação mediados pela célula Th17	Funciona na migração da Treg durante auto-imunidade mediada pela célula Th17
	CCR8	Migração para pele e para sítios de inflamação mediados pelas células Th2	Expresso nas Tregs
	CCR10	Migração para os tecidos de mucosa e pele	Expressos nas Tregs do fígado humano inflamado
	CXCR6	Migração para o fígado	Expresso nas células Tregs de humanos
CXCR4	Migração para a medula óssea, placa de Peyer e sítios de tumor	Associação com as células Treg infiltrantes no tumor	

As Tregs também expressam em sua superfície certas moléculas de adesão como a cadeia  $\alpha E$  da integrina (também conhecida com CD103) que juntamente com o receptor de quimiocina CCR4, possui a habilidade de induzir a expressão de ligantes de carboidratos como P-selectina e E-selectina por ativação da enzima  $\alpha$ -(1,3)-fucosiltransferase VII, sendo isso importante para a migração e/ou retenção das células Tregs à pele. As Tregs expressam também a integrina  $\alpha 4\beta 7$  que juntamente com o receptor de quimiocina CCR9 promove sua migração para o intestino (**Figura 7**) (Campbell e Koch, 2011).



**Figura 7 – Receptores expressos pelas Tregs que direcionam a migração para diferentes tecidos e microambientes.** A expressão de diferentes combinações de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas medeiam a migração das células Tregs para diferentes tecidos. (Adaptado de Campbell, 2007).

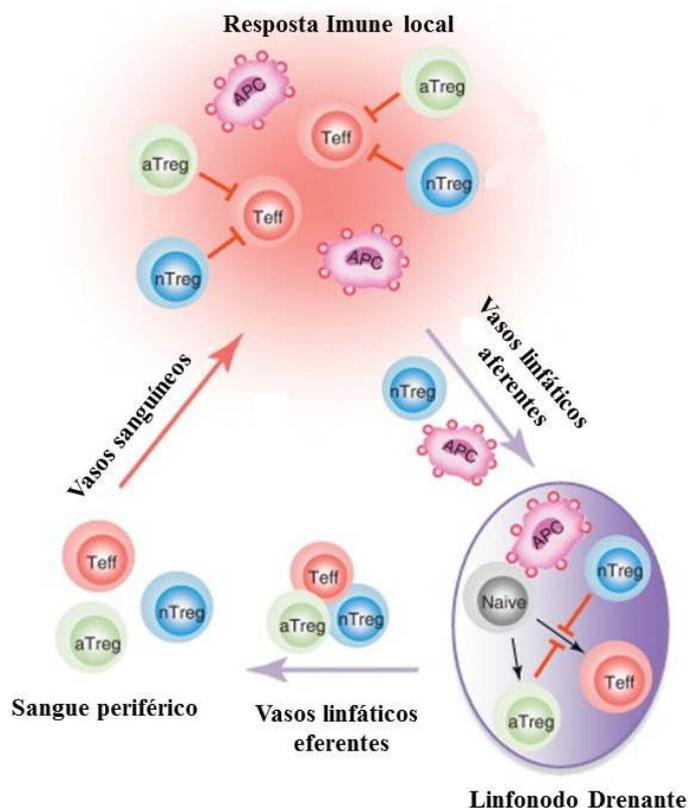
Em 2011, Tubo e colaboradores demonstraram que dois receptores de quimiocinas diferentes estão envolvidos no recrutamento das células Tregs para a pele durante a inflamação, o CCR4 e CCR10, e que a migração para pele esta dividida em duas etapas. Os ligantes do CCR4 estão presentes no endotélio da derme e facilitam a entrada das Tregs do

sangue para a derme, enquanto o CCR10 controla a subsequente migração dessas células da derme para a epiderme (Tubo *et al.*, 2011). Também foi observado, em 2010, por Lehtimaki e colaboradores que os receptores de quimiocinas CCR10 e CCR4 são receptores importantes no recrutamento de células inflamatórias para o local inflamado. Além disso, o receptor CCR4 parece estar envolvido no funcionamento das Tregs, promovendo e suprimindo a resposta imune, e que mais de 80% das células CD25<sup>+</sup> do sangue periférico de humanos expressam CCR4 (Lehtimaki *et al.*, 2010).

Recentes estudos demonstraram que a pele de um adulto normal contém entre 10-20 bilhões de células T de memória, incluindo os seus subtipos: células T helper, células T citotóxicas e células T reguladoras (Seneschal *et al.*, 2012). As células T de memória são aquelas que já tiveram um contato prévio com um determinado antígeno e que estão prontas para responder de maneira rápida e eficaz contra uma futura exposição àquele antígeno (Abbas e Lichtman, *Imunologia Básica*). Ainda segundo Seneschal e colaboradores a pele de humanos contém uma população de células Tregs residentes que representa 5-10% das células T residentes na pele. As células residentes são células estáveis, permanentes naquele tecido (Seneschal *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2006). Através de análises de pele normal de humano por imunohistoquímica e citometria de fluxo foi possível revelar que as células Tregs de memória residentes na pele estão predominantemente localizadas próximas à epiderme ou ao epitélio folicular, sempre próximo às células de Langerhans (LCs) e que elas representam 3% das células totais (Seneschal *et al.*, 2012).

Durante uma resposta imune, as Tregs são capazes de migrar para o linfonodo drenante e para o local inflamado. Depois de saírem do timo, as células Tregs *naive* (células que ainda não tiveram contato com antígenos) migram através do sangue para tecidos periféricos e através de vasos aferentes linfáticos para órgãos linfóides. A migração das Tregs para o linfonodo drenante é necessária para a sua ativação. Juntos, o microambiente e o linfonodo drenante, possuem o papel de estabilizar a supressão mediada pelas células Tregs. No linfonodo drenante, as Tregs interagem com as células apresentadoras de antígenos (APCs) que exibem peptídeos derivados de antígenos, levando a proliferação, remodelamento da cromatina em genes linfóides específicos e diferenciação em células Tregs efetoras antígenos-específicas. As células efetoras não expressam CD62L ou CCR7, o que permite sua saída dos órgãos linfóides através dos vasos eferentes linfáticos e consequente migração para o local inflamado via a expressão seletiva de integrinas e receptores de quimiocinas nos tecidos específicos. Assim como  $\alpha 4\beta 7$  e CCR9 estão relacionados com a migração através de

vasos pequenos pelo endotélio do intestino, a E e P-selectina junto com a quimiocina CCL17 (TARC) estão relacionadas com a migração para a pele inflamada suprimindo a resposta imune (**Figura 8**) (Ding *et al.*, 2012). Essa recirculação foi mostrada por Tomura e colaboradores em 2010, onde usando animais transgênicos Kaede (proteína de fluorescência verde foto conversível clonada de coral que muda a sua cor de verde para vermelho quando exposta a luz ultravioleta, ideal para monitorar com precisão o movimento celular *in vivo* em diferentes estágios da resposta imune), foi possível observar que durante uma reação imune cutânea ocorria um aumento na migração de células T CD4<sup>+</sup> no linfonodo drenante e que aproximadamente metade das células T CD4<sup>+</sup> que migravam eram Tregs (Tomura *et al.*, 2010).



**Figura 8 – Recirculação das células Tregs durante uma resposta imune.** Durante a resposta imune, as Tregs migram para o tecido periférico passando pelos linfonodos drenantes, interagem com as células dendríticas ganhando especificidade para migrar para os tecidos inflamados, onde suprimem a inflamação. (Adaptado de Ding *et al.*, 2007).

Seneschal e colaboradores demonstraram que além da apresentação de antígenos, a interação das células Tregs residentes na pele com as LCs (células de Langerhans) induz a proliferação das Tregs (Seneschal *et al.*, 2012). Clark e Kupper, em 2007 demonstraram que as células Tregs de pele de humanos podem proliferar de maneira antígeno independentes quando cultivadas com IL-15 e fibroblastos da derme, condições encontradas em tecido inflamado (Clark e Kupper, 2007). Além disso, outro estudo mostrou que as células Tregs residentes na pele de humanos podem expandir localmente durante uma inflamação cutânea e podem servir como freio na regulação da inflamação do tecido (Dudda *et al.*, 2008).

Assim, uma diminuição no número de células Tregs está relacionada ao desenvolvimento de autoimunidade, como doenças alérgicas e infecciosas enquanto que o aumento de células Tregs esta relacionado à baixa imunidade tumoral. Em modelo de camundongos, as células Tregs podem ser utilizadas para inibir uma resposta imune como na rejeição de transplantes e em doenças alérgicas, ou no desenvolvimento de vacinas bloqueando a atividade supressora. Por isso, a habilidade de manipular a atividade das células Tregs tem enorme potencial terapêutico (Ding *et al.*, 2012).

Assim, pressupomos que o receptor de quimiocina CCR4 modula a migração das células Tregs para a ferida e assim, juntos, possuam um papel importante no atraso da cicatrização cutânea em animais diabéticos, uma vez que a condição do diabetes promove desordens no processo de cicatrização.

## **2. Objetivos**

### **Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é descrever o papel do receptor de quimiocina CCR4 e das células T reguladoras no processo de fechamento de feridas de difícil cicatrização, utilizando um modelo experimental de lesão cutânea induzida cirurgicamente em camundongos diabéticos.

### **Objetivos Específicos:**

- Investigar a participação do receptor CCR4 no fechamento das feridas de animais diabéticos e não diabéticos;
- Investigar se as células T reguladoras contribuem/participam do fechamento das feridas;
- Estudar a participação do receptor CCR4 no recrutamento das células T reguladoras para a ferida;
- Caracterizar o novo tecido formado no 7º e 14º dias após a indução cirúrgica da lesão, através da coloração por Hematoxilina & Eosina (H&E);
- Quantificar o depósito de colágeno total nas lesões no 7º e 14º dia;
- Avaliar o perfil celular das lesões: quantificar neutrófilo, macrófago e células Tregs;
- Determinar o balanço de citocinas inflamatórias: IL-6, IL1- $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ .

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Para esse modelo foram utilizados camundongos C57BL/6 e animais deficientes para o receptor de quimiocina CCR4 (CCR4<sup>-/-</sup>) pesando entre 20 e 25 g. Os animais provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – e do biotério do Instituto de Microbiologia (UFRJ), foram mantidos no biotério do Programa de Pesquisa Celular e Molecular/ICB/UFRJ, sob condições de ciclo claro/escuro de 12/12 h com livre acesso à ração e água. A manipulação e os procedimentos, descritos a seguir, com os animais obedeceram aos princípios e foram aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Ensino e Pesquisa (CAUAEP-CCS) (protocolo: DFBCICB 028).

#### **3.2. Indução de diabetes**

O diabetes foi induzido com dose única de aloxana (65 mg/Kg de peso corporal, diluída em salina) por injeção intravenosa (i.v.) no plexo orbital após jejum de 8 horas. Camundongos controles receberam apenas solução salina (KORSGREN et al, 1990).

#### **3.3. Dosagem da glicemia**

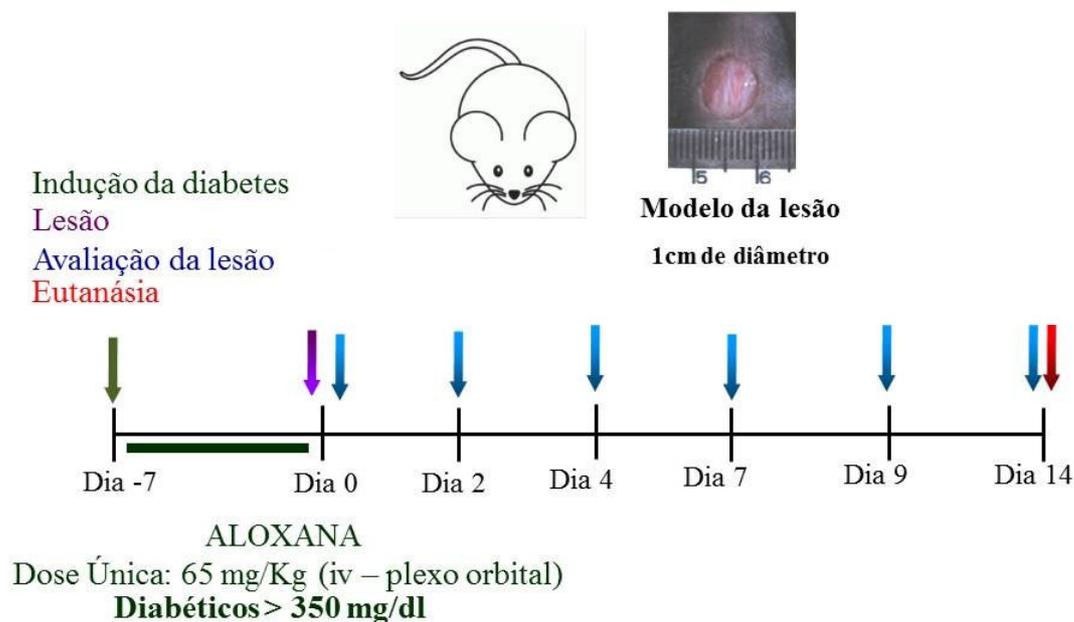
O método utilizado para diagnóstico do diabetes é a glicemia capilar, realizada com o glicosímetro Accu-Check Active (Roche Diagnóstica Brasil). Dessa maneira, a glicose sérica dos animais, que receberam a aloxana, foi quantificada no 7º dia após a injeção, sendo considerados animais diabéticos aqueles que apresentaram a glicemia acima de 350 mg/dL (SOUZA, NASCIMENTO, COSTA, 2009).

### 3.4. Administração de IL-2 e anti-CCL17/22

Os animais C57BL/6 foram devidamente separados em três grupos: animais tratados com AAV-IL2 (lentivirus que carrega RNA para IL-2), com o intuito de aumentar o número de células Tregs, visto essas células serem dependentes de IL-2 para proliferarem; animais tratados com AAV-luciferase (controle do AAV-IL-2), e animais tratados com anti-CCL17 e anti-CCL22 (anticorpos policlonais doados pelo Dr. Steven Kunkel). O AAV-IL-2 ou AAV-luciferase foram administrados uma semana antes da realização da lesão, em 100 µL intraperitoneal (i.p.) diluído em tampão fosfato (PBS) na concentração de  $8,65 \times 10^{10}$  vírus/mL. Os anticorpos contra CCL17 e CCL22 foram doados pelo Dr. Steven Kunkel, esses foram produzidos em seu laboratório em coelhos, possuindo uma titulação em torno de  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  de IgG. A administração do soro anti-CCL17 e anti-CCL22 foi feita dois dias antes da realização da lesão, em um volume de 1 mL i.p.

### 3.5. Anestesia e lesão

Os animais foram devidamente anestesiados por uma injeção i.p. da solução contendo Cetamina (112,5 mg/kg) e Xilazina (7,5 mg/kg) diluídas em salina e administrado na dose de 10 µL/g de animal. Depois de anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral e depilados. Para a demarcação da pele a ser retirada, utilizou-se um punch metálico contendo lâmina cortante na sua borda inferior. Com esse instrumento foi removido um segmento circular de pele de 1 cm de diâmetro na região do dorso. Após a cirurgia os animais foram mantidos em caixas com no máximo 5 animais e foram acompanhados diariamente.



Durante o experimento os camundongos tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em ambiente com temperatura entre 23 e 25°C. Seguindo o modelo abaixo:

### **3.6. Avaliação Morfométrica**

A avaliação da cicatrização foi realizada em todos os animais mediante a mensuração da área de contração do ferimento. Os animais tiveram suas lesões fotografadas por câmera digital modelo SONY Cyber-shot DSC-W110, 7.2 mega pixels, mantida em tripé a distância constante de 8 cm da base. As áreas das lesões dos animais foram obtidas nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 após a cirurgia. A imagem da fotografia digital da lesão foi analisada no software IMAGE J, no qual foi feito o cálculo da área. Para a plotagem dos gráficos de retração da área da lesão, as áreas medidas nos dias zero foram consideradas 100% e as áreas medidas nos dias subsequentes foram calculadas como porcentagem relativa à área inicial (dia zero).

### **3.7. Análise Histológica**

Após sete dias da indução da lesão os animais foram eutanaziados e através de uma incisão cirúrgica foi retirado a lesão mantendo uma área de pele íntegra ao redor. Esse material foi fixado em cortiça (a fim de evitar que o material se dobre) e colocado em solução de formaldeído tamponado 4% por 48 h. Posteriormente as lesões foram divididas ao meio e identificadas em cassetes histológicos dando início ao processamento do material. Primeiramente 30 min em água corrente, 40 min no banho de álcool 70%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III, 1h no banho de xilol I e xilol II, 40 min no banho de parafina I e parafina II e inclusão dos blocos de parafina. Os cortes histológicos foram corado com hematoxilina e eosina (HE) para evidenciar as características estruturais e o infiltrado celular da pele. A análise foi realizada em microscópio óptico de luz convencional.

### **3.8. Quantificação do colágeno total**

Para análise do colágeno total, foram feitos cortes histológicos com 7  $\mu\text{m}$  de espessura. Após a desparafinização em xilol e hidratação, os cortes foram lavados em água destilada (5 min), cobertos com ácido pícrico saturado (30 min), lavados novamente em água destilada (5 min), e imersos em ácido fosfomolibdico 0,2% (1 min). Após, os cortes foram corados com solução de Picrosirius por 90 min, depois lavados com ácido clorídrico 0,01 N (2 min), seguido por lavagem com álcool 70% (45 segundos), desidratação, clarificação e montagem com lamínula.

A quantidade de colágeno foi determinada por meio de análise morfométrica quantitativa pelo programa ImagePro Plus, versão 4.5.1. As imagens para análise foram obtidas por câmera digital acoplada a microscópio de luz convencional e foram fotografadas com lente objetiva de 40x. Foram analisados vinte campos de cada amostra (n=3). As fibras de colágeno foram marcadas pela cor vermelha, e o percentual de colágeno de cada campo analisado foi obtido pela divisão da área de fibrose pela área total do tecido. O resultado foi expresso como % de fibras de colágeno/ $\mu\text{m}^2$ .

### **3.9. Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

Após 2, 4 e 7 dias da indução da lesão, os animais foram eutanaziados e a lesão foi retirada (somente a área não reepitelizada) e homogeneizada em tampão fosfato (PBS) contendo inibidores de protease (Roche® - 1 tablete do inibidor de protease + 50  $\mu\text{L}$  de triton 0,1% + 50 mL de PBS). O homogeneizado foi em seguida centrifugado a 1500 RPM por 10 min. O sobrenadante foi ressuspenso em uma solução de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (80 mM) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e centrifugado a 12000 RPM por 15 min. Para reação da MPO, 60  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubado com 4  $\mu\text{L}$  de 3,3,3,3-tetrametilbenzidina (TMB) (1,9 mg/mL) e com 40  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) por até 15 minutos. A reação foi interrompida com tampão acetato de sódio (0,2 M). A quantificação dos neutrófilos foi realizada a partir da curva padrão de neutrófilos. Para obtenção desses neutrófilos, 1 mL de tioglicolato foi injetado no camundongo intraperitonealmente e, após 6 h, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado. Foi realizada uma contagem diferencial através de lâminas de cytopspin e aproximadamente 95% eram neutrófilos. Assim os neutrófilos foram obtidos e diluídos de

forma seriada na concentração inicial de  $4 \times 10^5$  células/mL. A densidade óptica das amostras foi quantificada em espectrofotômetro a 630 nm. As proteínas foram dosadas segundo o método de Bradford, usando a albumina sérica bovina como padrão. O resultado foi expresso como número de neutrófilos por mg de proteína do tecido.

### **3.10. Quantificação de citocinas e quimiocinas:**

#### **3.10.1. Cytometric Bead Array (CBA)**

A concentração das citocinas no homogeneizado das lesões retiradas após 2, 4 e 7 dias da indução cirúrgica foi determinada por citometria de fluxo utilizando-se o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation* (BD Biosciences, San Diego, CA), um ensaio multiplex que mensura quantitativamente analitos solúveis com base em suas diferentes intensidades de fluorescência. O kit CBA utilizado permite a distinção das seguintes citocinas: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12p70 em uma amostra de 50  $\mu$ l. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience, San Diego, CA) e análise foi realizada no software FCAP Array. As proteínas foram dosadas segundo o método de Bradford, usando a albumina sérica bovina como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em ng ou pg de citocina por mg de proteína.

#### **3.10.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Após 2, 4 e 7 dias da indução da lesão, os animais foram eutanaziados e a lesão foi retirada (somente a área não reepitelizada) e homogeneizada em PBS contendo inibidores de proteases. O homogenato foi centrifugado a 12000 RPM por 10 min, em seguida o sobrenadante foi guardado no ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até o dia da dosagem. A quantificação das citocinas foi realizada utilizando kits de dosagem de citocinas (PeproTech e R&D Systems, Inc), conforme descrito a seguir.

Para o ensaio, placas de 96 poços foram previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura. Estes anticorpos foram diluídos (concentração final 2  $\mu\text{g/mL}$ ) em PBS e incubados por 18 h à temperatura ambiente. As placas então foram lavadas quatro vezes com PBS + 0,05% Tween-20 (T-PBS). As ligações não específicas foram bloqueadas

com PBS + 1% BSA por 2 h à temperatura ambiente, seguida de nova etapa de lavagem com T-PBS. Os padrões das citocinas e as amostras foram adicionadas nas placas e incubados por 18 h à temperatura ambiente. Então, as placas foram lavadas com T-PBS e foram adicionados os anticorpos biotinilados específicos para cada citocina (concentração final 0,5 µg/mL). Após 1 h, as placas foram lavadas com T-PBS, o conjugado avidina-peroxidase (diluição 1:2000) foi adicionado em cada poço e incubados por mais 30 minutos. As placas foram lavadas com T-PBS e incubadas com o TMB (0,2 mg/mL). Após 20 min, a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a densidade óptica quantificada em espectrofotômetro a 405 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices). Através deste método foram dosadas as citocinas TNF-α e TGF-β. As proteínas foram dosadas segundo o método de Bradford, usando a albumina sérica bovina como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em ng ou pg de citocina por mg de proteína de tecido.

### **3.11. Obtenção das células das feridas**

Após sete dias da indução da lesão, os animais foram eutanaziados e a lesão foi retirada com 5 mm de tecido adjacente. A lesão então foi cortada em pequenos pedaços ( $\leq 2$  mm x 2 mm) e incubada em solução dispase (descrito abaixo) em uma placa de 24 poços overnight à 4°C com leve agitação. No dia seguinte, foram removidos todos os tecidos sólidos da placa de 24 poços e esses foram incubados em um coquetel de enzimas (descrito abaixo) em um tubo Falcon de 15 mL à 37°C com leve agitação por 2 h. A placa com a solução dispase permaneceu à 4°C. Em um tubo Falcon de 50 mL com uma peneira de 70 µm, a solução dispase foi peneirada e o poço da placa foi lavado com PBS a fim de remover as células aderentes, e pipetadas através da peneira. Em seguida o tecido sólido foi esmagado com um êmbolo de uma seringa de 3 mL contra a peneira, e rinsada com meio RPMI completo com 5% de SFB. O tubo Falcon foi centrifugado a 250 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi ressuspendido em ACK, centrifugado e ressuspendido em PBS. Foi feita a contagem total das células ( $10^6$  cels/mL) e iniciou-se a marcação para citometria de fluxo.

### **Soluções utilizadas:**

- **Solução dispase:** 5 mL de RPMI, 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 3 mL de dispase II a 1 mg/mL (Roche Diagnóstico).
- **Coquetel de enzimas:** 22,5 mL de RPMI, 5% de SFB, 2 mM L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 25 mg hialuronidase tipo 1-S de testículos de bovino (Sigma-Aldrich), 25 mg colagenase tipo 1A de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), 30 mg DNase I grade II do pâncreas de bovino (Roche Diagnóstico) e 2,5 mL de sulfato de gentamicina a 5 mg/mL).

### **3.12. Citometria de Fluxo – FACS**

Para essa análise foi feito um *pool* de células obtidas da junção de três lesões de animais diferentes, com um total de  $10^6$  cels/mL. Após o procedimento de isolamento das células da lesão, foi realizada a marcação para três populações distintas: neutrófilos (Ly6G/GR-1), macrófago (F4/80) e Treg (CD4, CD25 e Foxp3). Assim as células foram ressuspensas para  $2 \times 10^6$  células/ 100  $\mu$ L em PBS e iniciou-se a marcação. Para marcação de moléculas de superfície as células foram incubadas com Fc block (diluição 1:100 uL) por 5 minutos no gelo em seguida com os respectivos anticorpos: anti-Ly6G-FITC (BD Pharmingen), anti-GR-1-PE (BD Pharmingen), anti-F4/80-PE (E-bioscience), anti-CD4-PECy-5 (BD Pharmingen) e anti-CD25-PE (BD Pharmingen) por 20 min à 4°C no escuro (diluição 1:100 uL). Para a marcação intracelular foi utilizado o *Kit Foxp3 Staining Buffer Set* (eBioscience). Brevemente, as células foram incubadas durante 30 min à 4°C no escuro em uma solução de fixação/permeabilização. Em seguida, a suspensão celular foi lavada em uma solução tampão de permeabilização adicionado com Fc block e incubado por 5 min. Em seguida, o anti-Foxp3-FITC (E-bioscience) foi adicionado e incubado por 30 min à 4°C no escuro. As células foram lavadas 2 vezes em uma solução tampão de permeabilização e ressuspensa em PBS. A leitura foi realizada no FACSCalibur (CellQuest™ software; Becton and Dickinson, Mountain View, CA) e os resultados analisados no programa FlowJo (Tree Star, Inc).

### **3.13. Análise estatística**

Os resultados obtidos para a plotagem do gráfico de retração da área das lesões foram avaliados estatisticamente através do teste *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni (comparações múltiplas). Foram consideradas diferenças significativas os valores de  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,001$ (\*\*\*).

A significância dos demais experimentos foi obtida através do teste t- Student para amostras não pareadas. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteínas presente em cada amostra. Foram consideradas diferenças significativas os valores de  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,001$ (\*\*\*).

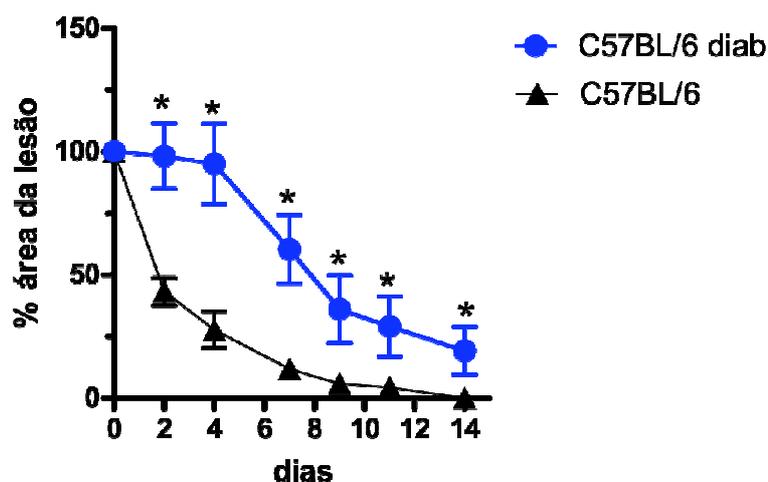
## 4. Resultados

A fim de caracterizar o papel do receptor de quimiocina CCR4 e das células Tregs na cicatrização de feridas crônicas, foi utilizado o modelo de indução de diabetes. Após a confirmação da condição do diabetes, foi utilizado o modelo de lesão cutânea induzido cirurgicamente no dorso dos animais C57BL/6 e dos animais deficientes para o receptor de quimiocina CCR4 (CCR4<sup>-/-</sup>). Após a cirurgia os animais foram mantidos em caixas individuais, divididos em grupos: C57BL/6 diabéticos e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos acompanhados diariamente. Também foi realizado experimentos em animais não diabéticos (controle), comparando assim o processo de cicatrização de feridas agudas e crônicas. Esses foram divididos em grupos: C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>. Os parâmetros avaliados foram: contração da área da lesão (análise macroscópica), análise microscópica (análise histológica – H&E), quantificação de fibras de colágeno (coloração de Picrosirius Red), quantificação de neutrófilos (ensaio de MPO), perfil celular (caracterização e quantificação do infiltrado celular na lesão - FACS) e quantificação de citocinas (IL-6, IL-10, IL12p70, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL1- $\beta$ ).

### 4.1. Contração da área da lesão de camundongos diabéticos e não diabéticos

Nossa primeira análise foi realizada visando caracterizar em nosso laboratório o modelo de feridas crônicas de difícil cicatrização em animais diabéticos. Assim, foi realizado um experimento comparando a contração da área da lesão em animais C57BL/6 diabéticos com os animais C57BL/6 não diabéticos. As áreas medidas no dia zero foram consideradas 100% e as áreas medidas nos dias subsequentes foram calculadas como porcentagem relativa à área inicial (dia zero).

Conforme podemos observar, os animais C57BL/6 diabéticos possuem um retardo no processo de cicatrização em relação aos animais C57BL/6 não diabéticos, dado que já era esperado visto que o processo de cicatrização é retardado na condição do diabetes, ocasionando feridas crônicas (**Figura 9**).



**Figura 9** – Os animais C57BL/6 diabéticos possuem um retardo no processo de cicatrização em relação aos animais C57BL/6 não diabéticos. As áreas foram calculadas a partir de fotos obtidas nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 e analisadas com o software Image J. O teste estatístico realizado foi two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde  $P < 0,05$  (\*). Em cada grupo há pelo menos 5 animais. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes.

#### 4.2. Contração da área da lesão de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos

Em seguida, fomos comparar a contração da área da lesão de animais C57BL/6 diabéticos com os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos. Os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos possuem um acelerado processo de cicatrização quando comparados aos animais C57BL/6 diabéticos (**Figura 10**). Essa diferença é observada tanto nos registros fotográficos (**painel A**) quanto no gráfico da contração da área da lesão (**painel B**).

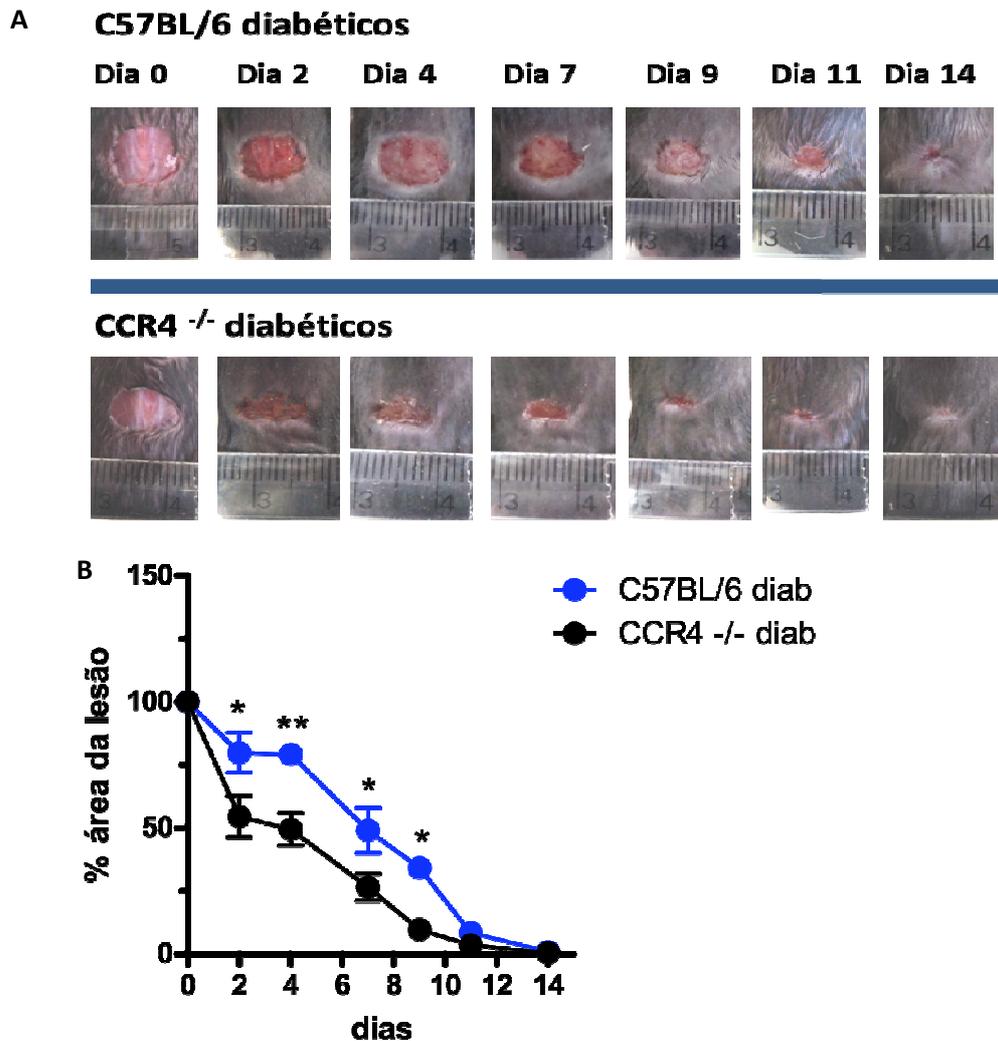
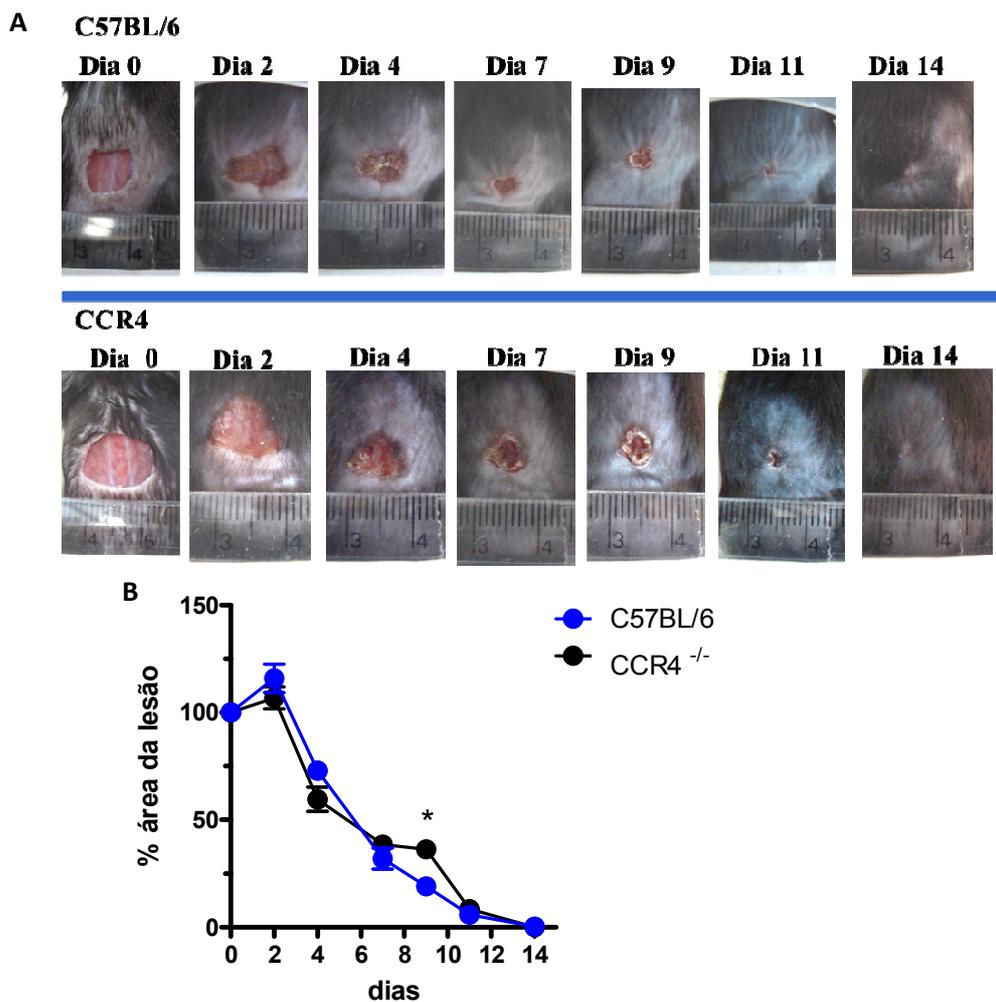


Figura 10 – Os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos possuem um acelerado processo de cicatrização quando comparado aos animais C57BL/6 diabéticos. As áreas foram calculadas a partir de fotos obtidas nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 (painel A) e analisadas com o software Image J para a plotagem do gráfico que representa a contração da área da lesão (%) (painel B). O teste estatístico realizado foi two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde  $P < 0,05$  (\*) e  $P < 0,01$  (\*\*). Em cada grupo há pelo menos 5 animais. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes.

#### 4.3. Contração da área da lesão de camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>

Comparação da contração da área da lesão de animais C57BL/6 com os animais CCR4<sup>-/-</sup>. Foi observada diferença significativa, apenas no 9º dia (Figura 11). É possível observar o perfil de cicatrização desses animais tanto nos registros fotográficos (painel A) quanto no gráfico da contração da área da lesão (painel B).



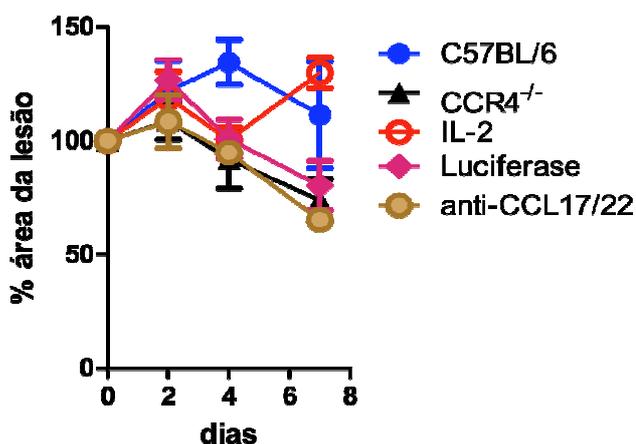
**Figura 11 – Perfil de contração da área da lesão dos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>.** As áreas foram calculadas a partir de fotos obtidas nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 (painel A) e analisadas com o software Image J para a plotagem do gráfico que representa a contração da área da lesão (%) (painel B). O teste estatístico realizado foi two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde  $P < 0,05$  (\*). Em cada grupo há pelo menos 5 animais. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes.

#### 4.4. Contração da área da lesão de camundongos diabéticos CCR4<sup>-/-</sup>, C57BL/6 e C57BL/6 que receberam AAV-IL-2 ou AAV-luciferase ou anti-CCL17/22

As quimiocinas CCL17 e CCL22 se ligam ao receptor de quimiocina CCR4 promovendo o recrutamento das células Tregs para a pele inflamada. Assim, com o intuito de investigar a participação dessa célula na lesão crônica, utilizamos anticorpos para essas citocinas, como também o AAV-IL2, o qual aumenta a produção de IL-2 nos animais e

consequentemente o número de Tregs (Nelson, 2012; Ritz e colaboradores, 2006; Abbas e colaboradores, 2010). Para a realização desse experimento os animais diabéticos foram divididos em 5 grupos:  $CCR4^{-/-}$ , C57BL/6, animais C57BL/6 que receberam animais C57BL/6 que receberam animais C57BL/6 que receberam , animais C57BL/6 que receberam AAV-luciferase (controle do AAV-IL-2), e animais C57BL/6 que receberam anti-CCL17/22. A contração da área da lesão nesses animais foi avaliada até o 7º dia de lesão.

Conforme podemos observar, os animais  $CCR4^{-/-}$  e os animais que receberam anti-CCL17/22 apresentaram um perfil de cicatrização semelhante, se mostrando mais acelerado que os animais C57BL/6 e que os animais que receberam AAV-IL2, quando observamos no dia 7 (**Figura 12**). Utilizamos uma outra estratégia, que foi o tratamento dos animais diabéticos com o anticorpo monoclonal PC61 (anti-CD25), para depletar Tregs, entretanto houve grande mortalidade, com apenas 10% de sobrevivência dos animais para a indução da lesão, e por isso esse grupo foi retirado (dado não mostrado). Vale ressaltar que faltou incluir nos experimentos um grupo de animais tratado com anticorpo inespecífico, como controle dos animais tratados com anti-CCL17/CCL22. Além disso, no dia 7 foram retiradas amostras das lesões dos diferentes grupos para análise por RT-PCR da presença de Tregs após os tratamentos utilizados. Nós temos no laboratório o material necessário, porém não foi possível fazer a análise antes da preparação dessa dissertação.

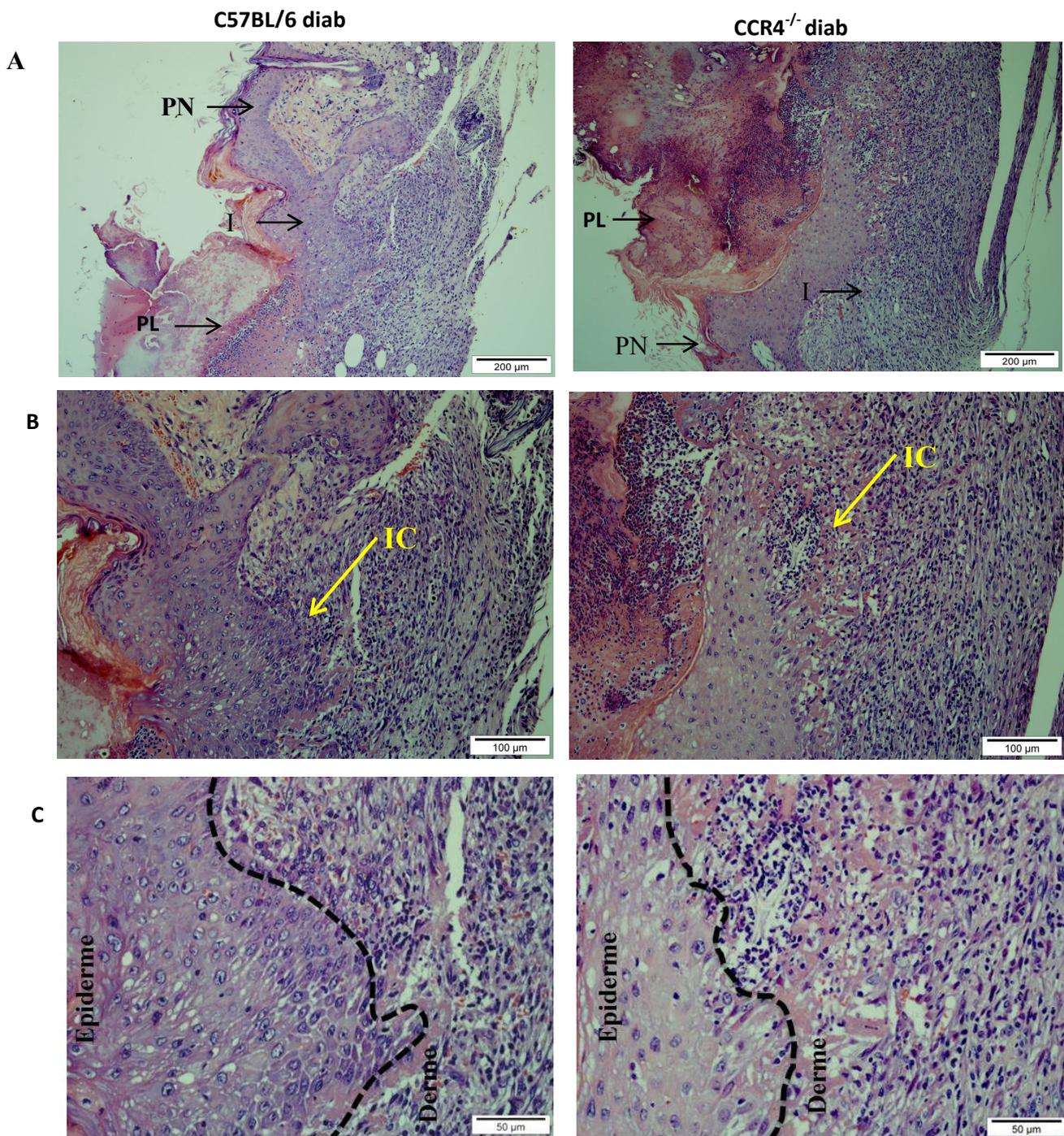


**Figura 12** – Contração da área da lesão de camundongos diabéticos  $CCR4^{-/-}$ , C57BL/6 e C57BL/6 que receberam IL-2, luciferase, e anti-CCL17/22. As áreas foram calculadas a partir de fotos obtidas nos dias 0, 2, 4 e 7 e analisadas com o software Image J para a plotagem do gráfico que representa a contração da área da lesão (%). O gráfico é representativo de um experimento independente.

#### 4.5. Caracterização do perfil histológico da lesão dos camundongos diabéticos

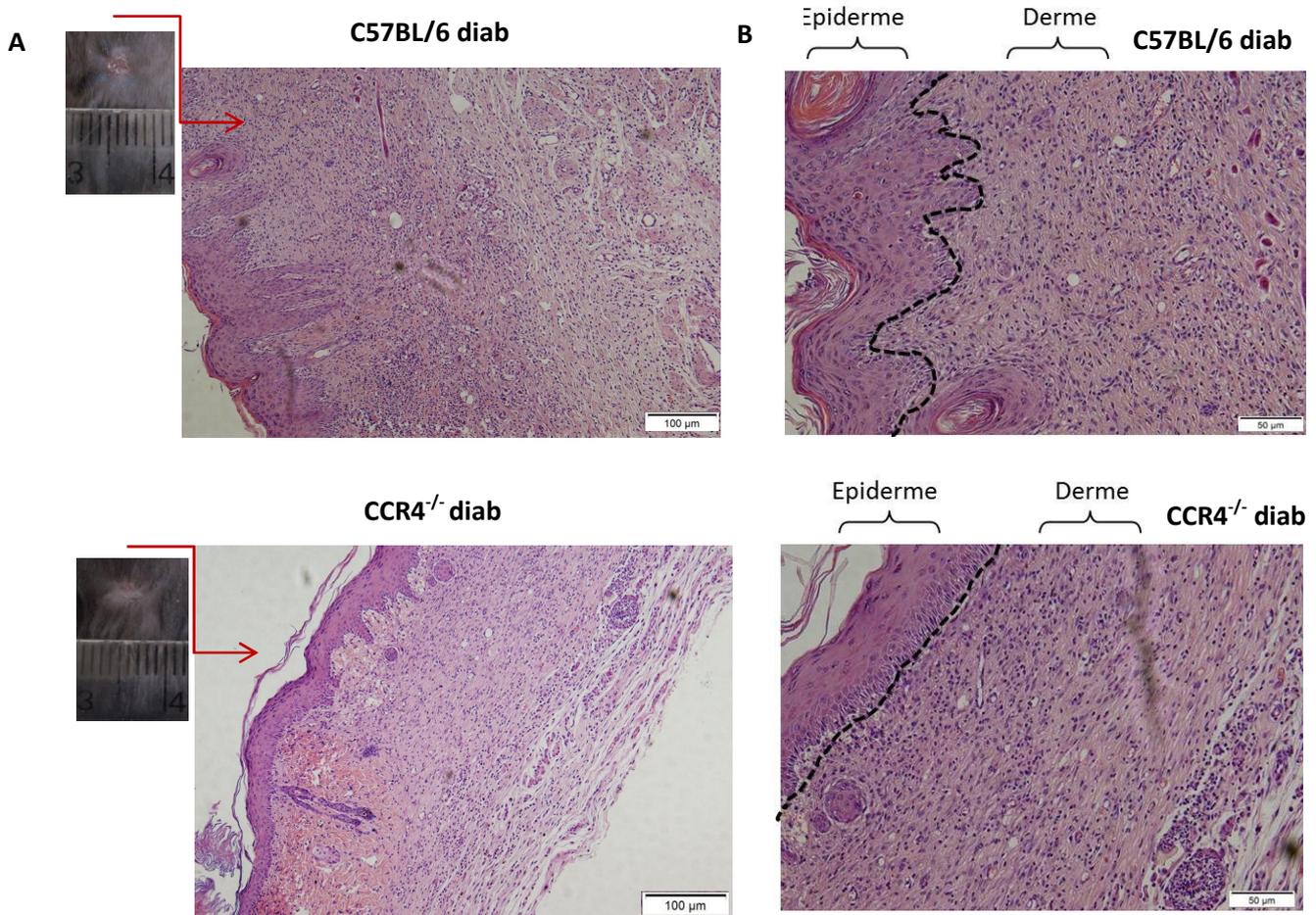
Com o intuito de avaliar qualitativamente o novo tecido formado, foram realizadas análises histológicas dos cortes corados por H&E de lesões com 7 dias. Considerando que os animais  $CCR4^{-/-}$  são animais deficientes para o receptor de quimiocina CCL17 e CCL22 responsável por recrutar células T ativadas, células  $T_H2$  e células Tregs, assumimos que dessa forma poderíamos obter diferença no processo de cicatrização entre os animais C57BL/6 e os  $CCR4^{-/-}$  acarretando em tecidos neoformados com características diferentes.

A análise histológica mostra que a cicatrização da lesão dos animais C57BL/6 e  $CCR4^{-/-}$  diabéticos induzem a formação de tecidos com características semelhantes, no entanto algumas pequenas diferenças podem ser observadas. As imagens obtidas com aumento de 10x (**painel A**) retratam a interseção entre a pele normal e a pele lesada. Na seta PL é possível observar a formação de escara (crosta) indicando que está ocorrendo regeneração epidérmica, a qual está maior nos animais  $CCR4^{-/-}$  diabéticos em relação aos animais C57BL/6 diabéticos. As imagens obtidas com aumento de 20x (**painel B**) nos permitem observar a migração de células inflamatórias, predominantemente do tipo mononuclear direcionados da borda para o centro da lesão, essa migração celular é semelhante nos dois grupos analisados. Ainda, observa-se a formação do tecido de granulação o qual é formado por fibroblastos, vasos sanguíneos e leucócitos. O tecido de granulação é característico da fase proliferativa, por isso a observação do tecido de granulação é um indicativo de que o processo de cicatrização está evoluindo. Não foi observada diferença no tecido de granulação entre os dois grupos analisados. Uma análise microscópica mais detalhada foi realizada a partir das imagens obtidas com aumento de 40x (**painel C**), mostrando a presença de infiltrado leucocitário em direção à lesão e aos vasos sanguíneos. Também é possível observar a divisão entre a epiderme e derme, onde os a epiderme encontra-se mais hiperplásica nos animais C57BL/6 comparada aos animais  $CCR4^{-/-}$  diabéticos (**Figura 13**).



**Figura 13 - Análises histológicas dos animais diabéticos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> no 7º dia de lesão.** O tecido foi retirado no 7º dia e corado por H&E. As imagens retratam a região da ferida e foram obtidas com aumento de 10x (200 µm), 20x (100 µm) e 40x (50 µm). **(A)** As imagens, obtidas em aumento de 10x, retratam a região de intersecção entre a pele normal e a pele lesada (ferida). PL – pele lesada, I – intersecção, PN – pele normal. **(B)** Imagens, obtidas em aumento de 20x, mostrando o infiltrado celular (IC- infiltrado celular). **(C)** Imagens, obtidas em aumento de 40x, mais detalhadas mostrando a divisão da epiderme e derme onde é possível visualizar os leucócitos.

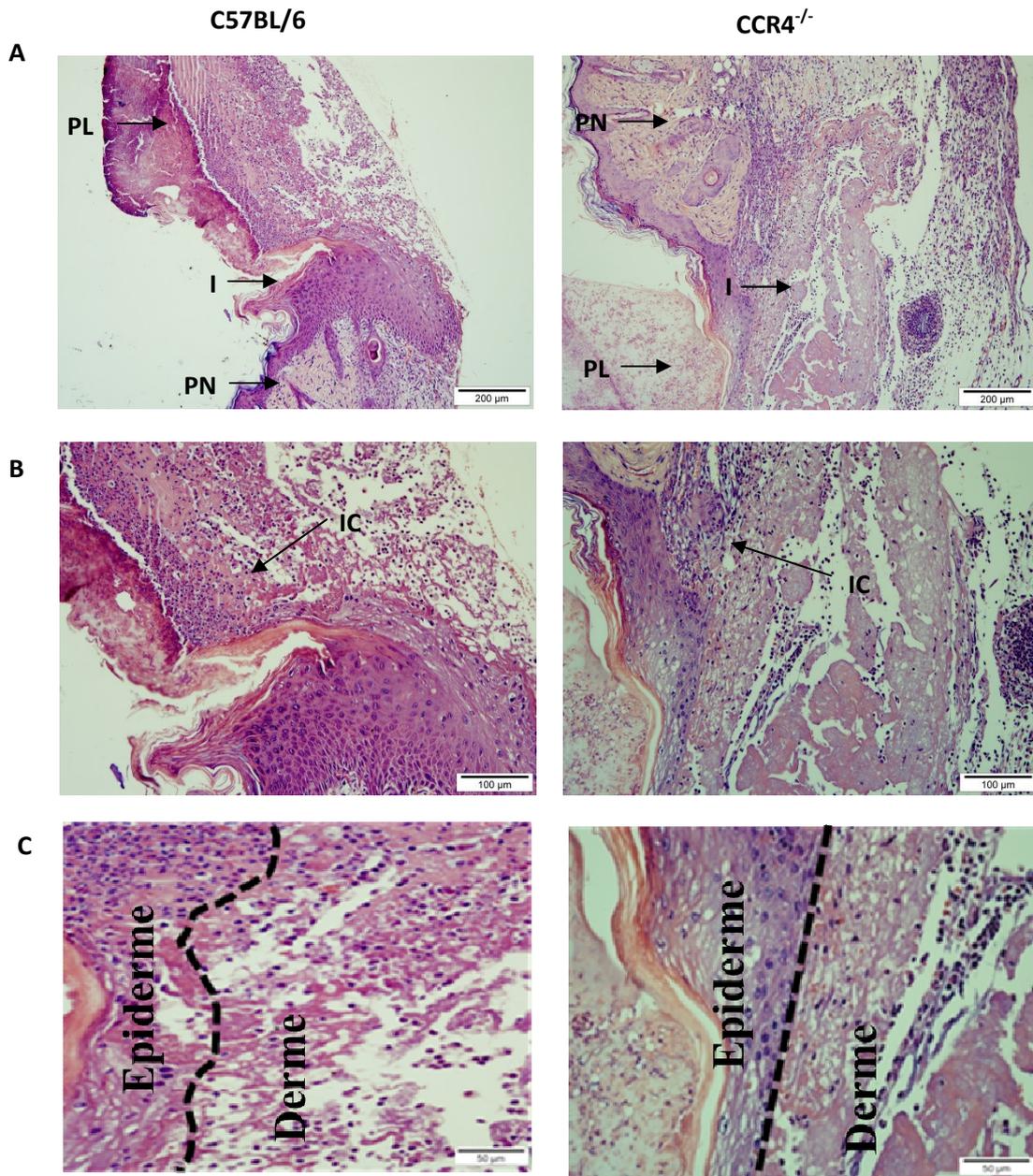
Também foi realizada a análise histológica em cortes corados por H&E no 14º dia de lesão. No aumento de 10x é possível ter uma visão completa do local onde foi realizada a lesão. Observa-se um novo tecido formado totalmente reepitelizado em ambos os grupos (**painel A, em coluna**). Na análise histológica com aumento de 20x é possível observar a epiderme e a derme regeneradas e o surgimento de anexos da pele, como as glândulas (**painel B, em coluna**), ressaltando que ainda existe uma leve hiperplasia epidérmica nos animais C57BL/6 comparada aos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos (**Figura 14**).



**Figura 14 - Análises histológicas dos animais diabéticos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> no 14º dia de lesão.** O tecido foi retirado no 14º dia e corado por H&E. As imagens obtidas no aumento de 10x (200 µm) e 20x (100 µm) retratam a região da ferida que se encontra totalmente cicatrizada. **(A)** Visão completa do tecido cicatrizado. **(B)** Imagens mais detalhadas mostrando a divisão da epiderme e derme.

#### 4.6. Caracterização do perfil histológico da lesão dos camundongos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>

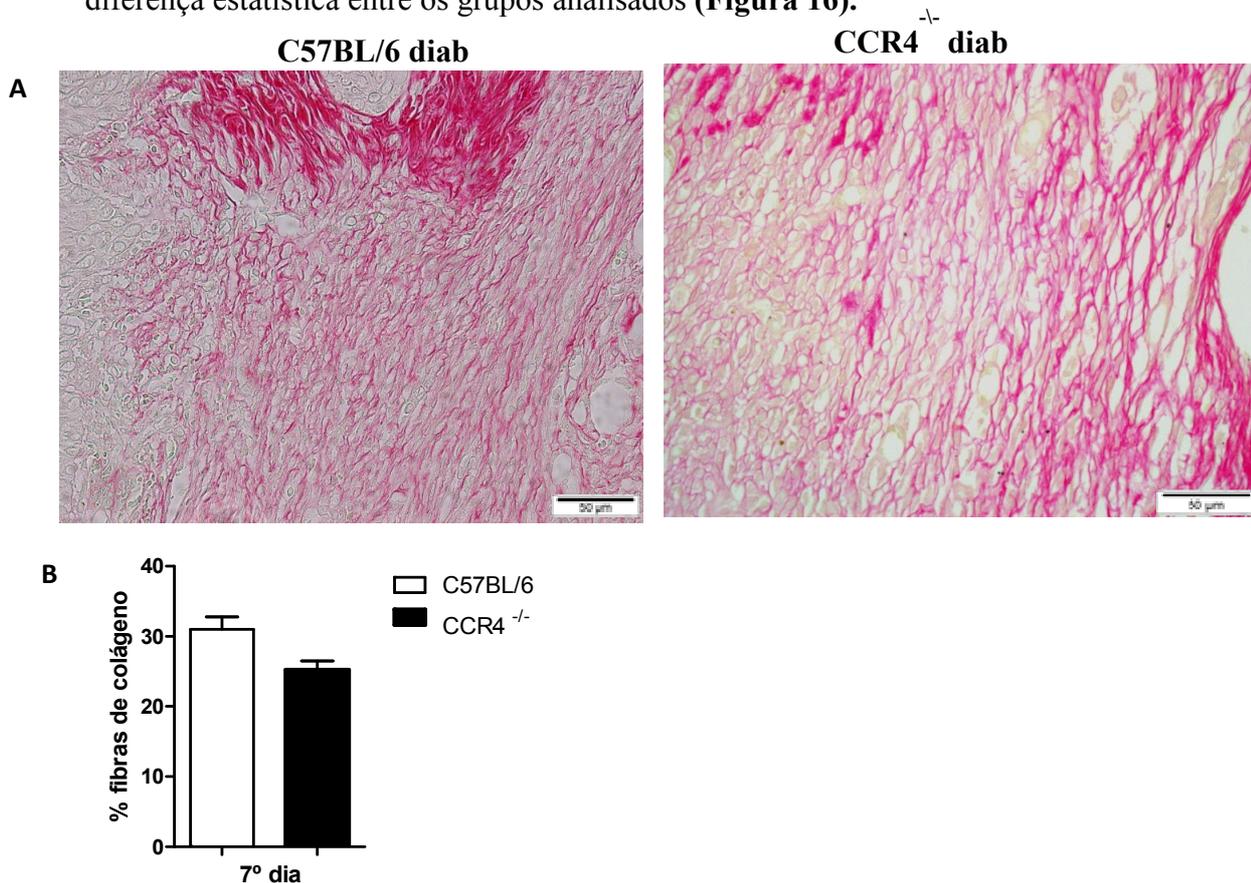
A análise histológica abaixo mostra o perfil histológico entre os animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>. As imagens obtidas no aumento de 10x nos permitem observar que a área total do animal CCR4<sup>-/-</sup> é maior que do animal C57BL/6, sugerindo a formação de um tecido edematoso em relação ao tecido formado no animal C57BL/6 (**painel A**). No local indicado pela seta PL é possível observar a formação de escara. Já nas imagens obtidas no aumento de 20x observa-se a migração celular direcionada da borda para o centro da lesão. Essa migração é semelhante nos dois animais (**painel B**). A partir das imagens obtidas com aumento de 40x (**painel C**) podemos observar que os animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> possuem um perfil histológico parecidos com migração de leucócitos e formação de novos vasos sanguíneos (**Figura 15**).



**Figura 15 - Análises histológicas dos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> no 7º dia de lesão.** O tecido foi retirado no 7º dia e corado por H&E. As imagens retratam a região da ferida e foram obtidas com aumento de 10x (200 µm), 20x (100 µm) e 40x (50 µm). **(A)** As imagens, obtidas em aumento de 10x, retratam a região de intersecção entre a pele normal e a pele lesada (ferida). PL – pele lesada, I – intersecção, PN – pele normal. **(B)** Imagens, obtidas em aumento de 20x, mostrando o infiltrado celular (IC- infiltrado celular). **(C)** Imagens, obtidas em aumento de 40x, mais detalhadas mostrando a divisão da epiderme e derme onde é possível visualizar os leucócitos.

#### 4.7. Análise do depósito de colágeno total nas lesões dos animais diabéticos

Essa análise foi realizada com o intuito de quantificar as fibras de colágeno que são responsáveis por dar força tênsil e sustentação ao novo tecido formado e é o principal componente da matriz extracelular. A análise foi realizada através das fotos digitais retiradas no 7º dia de lesão e analisadas no programa Image Pro Plus. A partir das imagens obtidas com aumento de 40x (**painel A**) foi realizada a quantificação das fibras de colágeno. As fibras de colágeno foram marcadas pela cor vermelha, e o percentual de colágeno de cada campo analisado foi obtido pela divisão da área de fibrose pela área total do tecido. O resultado foi expresso como % de fibras de colágenos (**painel B**). Foi possível observar que não houve diferença estatística entre os grupos analisados (**Figura 16**).



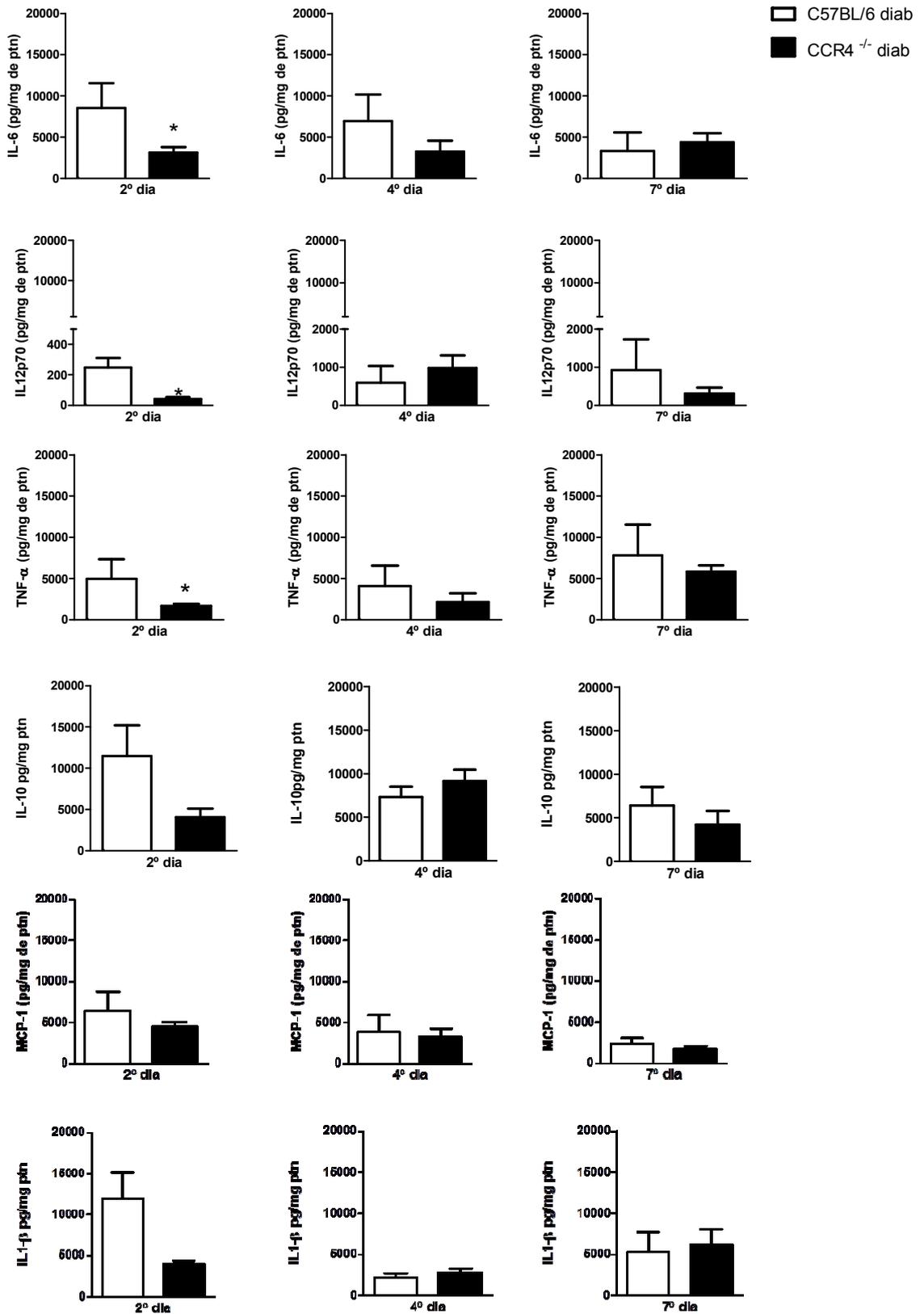
**Figura 16 – Análise do depósito de colágeno total na pele dos animais diabéticos C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> no dia 7 após a lesão. (A)** As lesões foram retiradas no 7º dia e a coloração utilizada para a marcação de colágeno foi Picrosirius Red. As fotos são representativas de cada grupo e foram fotografadas com objetiva de 40x (50 µm). **(B)** quantificação das fibras de colágeno no 7º dia de lesão. O gráfico é representativo de 3 experimento independente.



#### 4.8. Quantificação de citocinas e quimiocinas no homogeneizado de lesões

A quantificação de citocinas e quimiocinas liberadas no leito da lesão foi realizada através do método CBA e ELISA no homogeneizado das lesões retiradas nos dias 2, 4 e 7. Avaliamos a liberação dos mediadores inflamatórios como interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12p70), fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), proteína de monócitos (MCP-1), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ).

Na dosagem de IL-6, IL-12p70, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi observada menor produção/liberação dessas citocinas nos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos quando comparada aos animais C57BL/6, no 2º dia de lesão. Já no 4º e 7º dia da lesão essa diferença já não estava mais presente. Na dosagem de IL-10 não foi observada diferença estatística em nenhum dos dias analisados, no entanto no 2º e 7º existe uma tendência a menor produção/liberação dessa citocina pelos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabético. Na dosagem de MCP-1 não foi observada diferença estatística em nenhum dos dias analisados. Foi realizada também a dosagem do IFN- $\alpha$ , no entanto em todos os dias analisados (2º, 4º e 7º dias) os dois grupos (C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos) apresentaram valores  $\leq 20$  pg/mL (**Figura 18**).



**Figura 18 - Análise do perfil de citocinas e quimiocinas liberadas no leito da lesão no 2º, 4º e 7º dia pós lesão.** As lesões foram retiradas no 2º, 4º e 7º dia e as citocinas e quimiocinas foram quantificadas no sobrenadante dos homogeneizados das lesões pelo método de CBA/ELISA, os resultados obtidos foram normalizados pela quantidade de proteína em cada amostra. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student,  $P < 0,05$  (\*). Em cada grupo  $n=4-5$ . \* A IL-1 $\beta$  foi quantificada pelo método de ELISA. O gráfico é representativo de 3 experimento independente.

#### 4.9. Quantificação de citocinas e quimiocinas no homogeneizado de lesões nos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>

A quantificação de citocinas e quimiocinas liberadas no leito da lesão foi realizada através do método CBA no homogeneizado das lesões retiradas nos dias 2, 4 e 7. Na dosagem de IL-6 não foi observada diferença estatística em nenhum dos dias analisados. Na dosagem de IL-10 existe uma tendência a menor produção/liberação dessa citocina pelos animais CCR4<sup>-/-</sup> no 7º dia de lesão, enquanto para a citocina IL-12p70 houve uma tendência a maior produção/liberação dessa citocina no mesmo dia. Na dosagem de TNF- $\alpha$  existe uma tendência a menor produção/liberação dessa citocina pelos animais CCR4<sup>-/-</sup> no 4º e 7º dias de lesão. Foi realizada também a dosagem do IFN- $\alpha$ , no entanto em todos os dias analisados (2º, 4º e 7º dias) os dois grupos (C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup>) apresentaram valores  $\leq 20$  pg/ml. E na dosagem de MCP-1 os dois grupos apresentaram valores  $\geq 5000$  pg/ml (**Figura 19**).

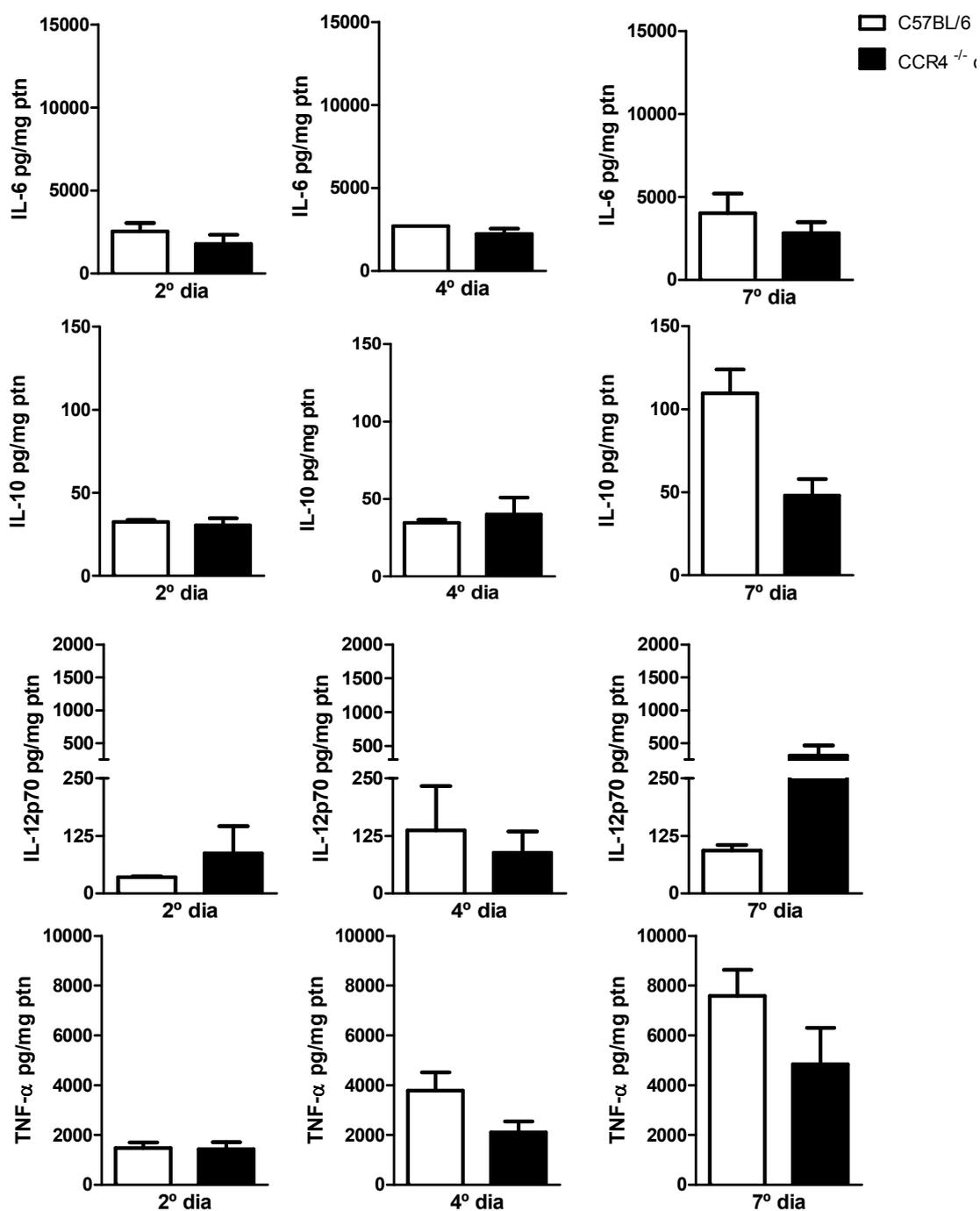


Figura 19 - Análise do perfil de citocinas e quimiocinas liberadas no leito da lesão dos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> no 2º, 4º e 7º dia pós lesão. As lesões foram retiradas no 2º, 4º e 7º dia e as citocinas e quimiocinas foram quantificadas no sobrenadante dos homogeneizados das lesões pelo método de CBA, os resultados obtidos foram normalizados pela quantidade de proteína em cada amostra. Em cada grupo n=4-5. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes.

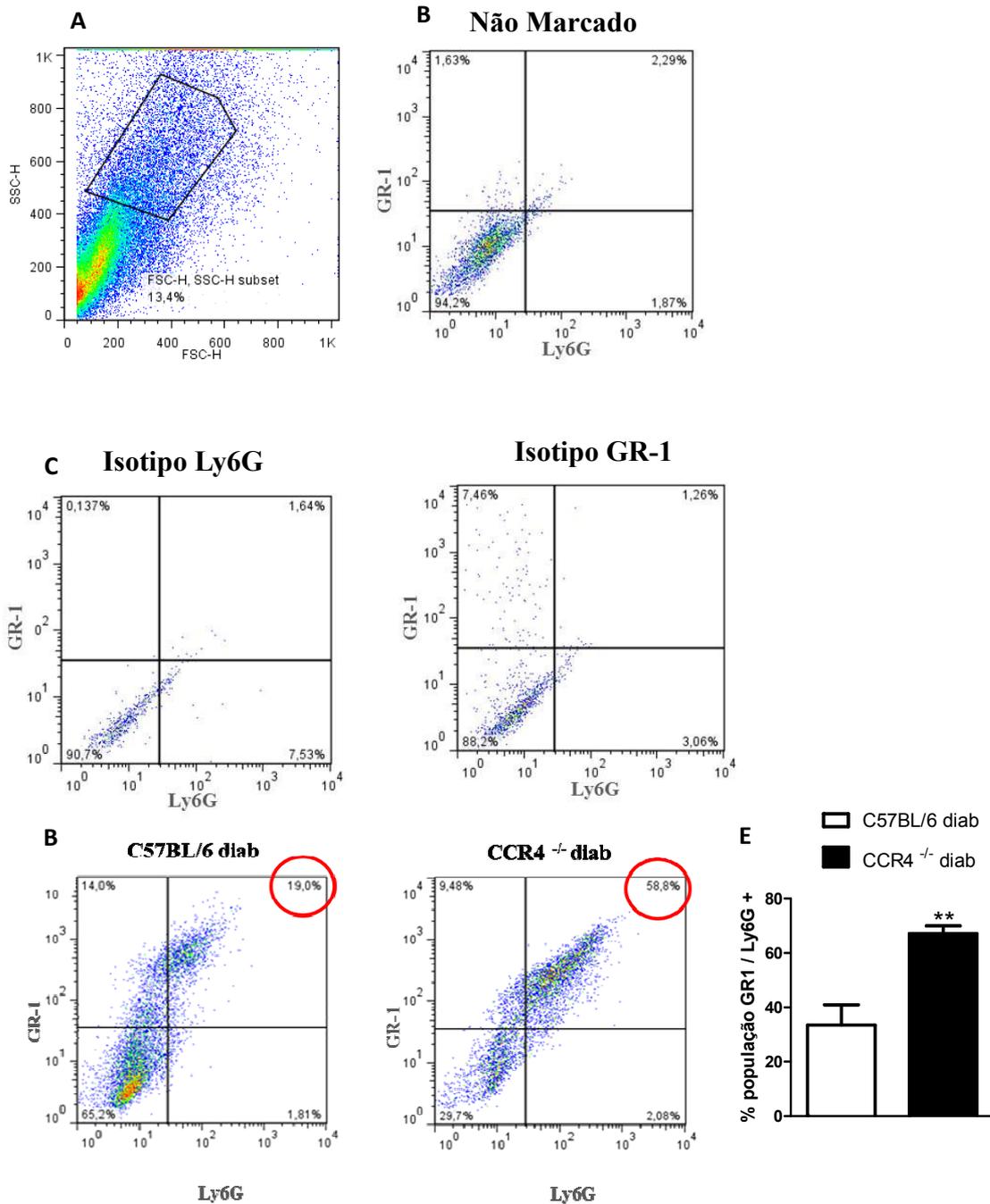
#### **4.10. Quantificação e diferenciação do infiltrado celular na lesão de animais diabéticos**

Para esta análise foi feito um *pool* de células obtido com a junção de três lesões de animais diferentes. As lesões foram retiradas no 7º dia e digeridas em um coquetel de enzimas conforme descrito na metodologia. Em seguida, após a obtenção das células, essas foram marcadas para três populações celulares distintas: neutrófilos, macrófagos e Tregs.

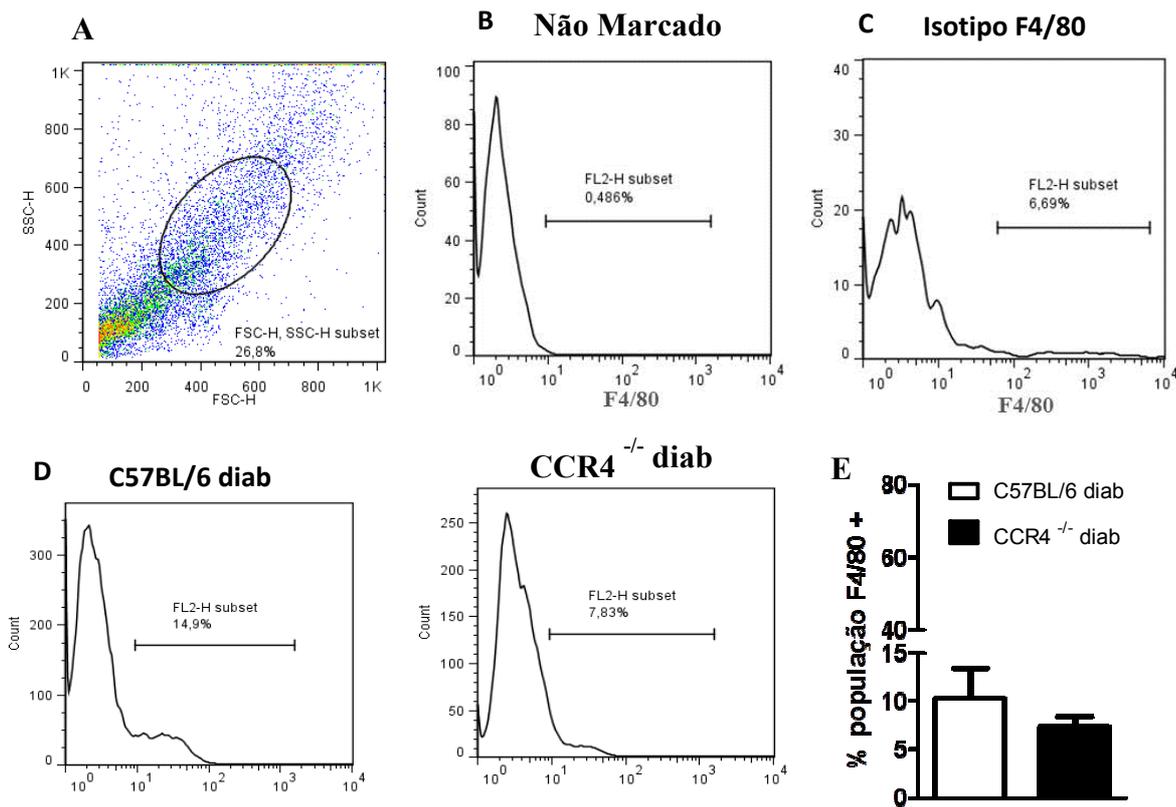
Para avaliar a migração de neutrófilos para o local da lesão foi analisada a expressão dos marcadores GR-1/Ly6G na superfície das células isoladas da lesão. A população de neutrófilos foi selecionada no “dot plot” de granulocidade (SSC-H) versus tamanho (FSC-H) e como controle negativo (não marcado) foram utilizadas as células isoladas da lesão sem anticorpo. A análise desse dado revelou que os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos possuem uma maior migração de neutrófilos quando comparados com os animais C57BL/6 diabéticos (**Figura 20**). Nas demais análises foram seguidos os mesmos padrões, com a população desejada sendo selecionada no “dot plot” FSC/SSC.

Para avaliar a migração de macrófagos foi analisada a expressão do marcador de superfície F4/80. Não foi observada diferença estatística no recrutamento dessas células para o local da lesão entre os grupos (**Figura 21**).

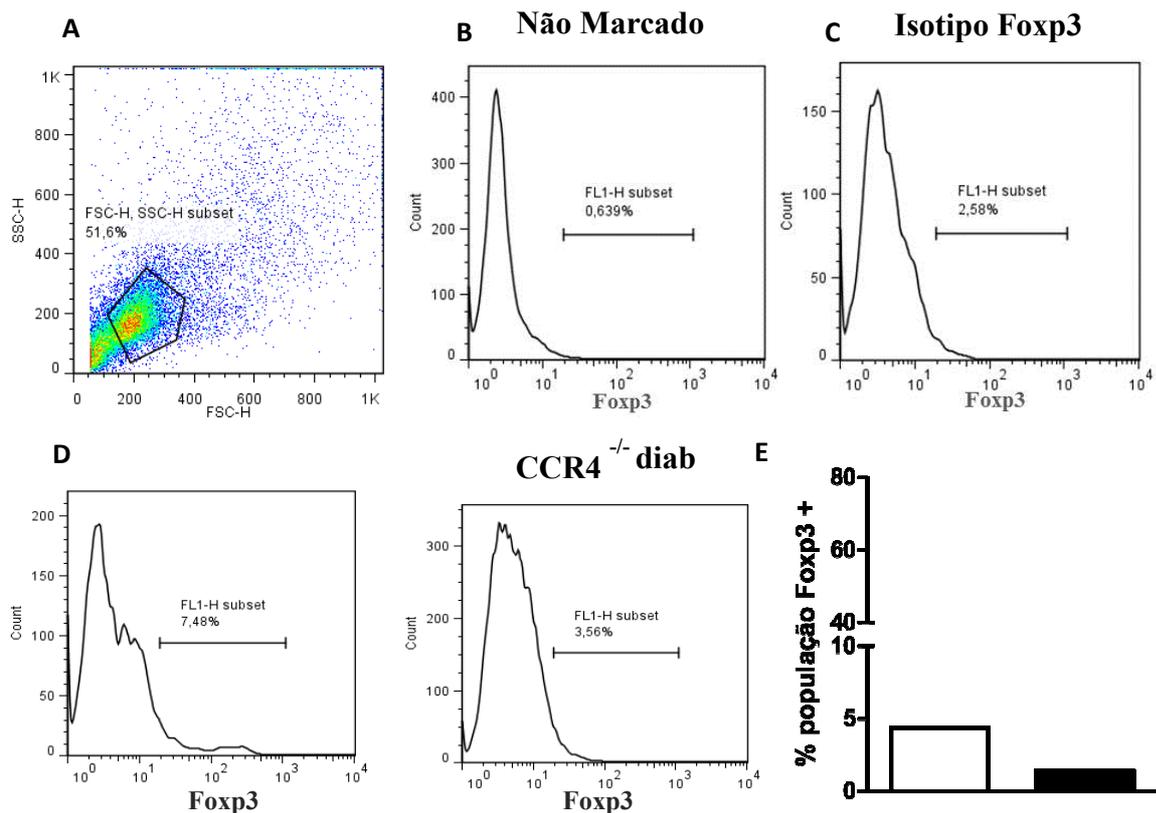
Na avaliação da migração das células Tregs foi utilizado o marcador intracelular Foxp3. Apesar de existir uma tendência a uma migração diminuída de células Tregs nos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos não foi possível realizar teste estatístico devido ao número de amostras inferior a 3 (**Figura 22**).



**Figura 20 – Os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos aumentam o recrutamento de neutrófilos para a lesão.** As lesões foram retiradas no 7º dia digeridas em um coquetel de enzimas e as células obtidas foram marcadas para GR-1/Ly6G. **(A)** Seleção da população de neutrófilos no “dot plot” FSC/SSC. **(B)** Como controle negativo foram utilizadas células isoladas da lesão não marcadas com anticorpos (não marcado). **(C)** Isotipos Ly6G e GR-1, respectivamente. **(D)** Análise da expressão de GR-1/Ly6G nos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos. **(E)** Representação gráfica da população de neutrófilos em 3 experimentos independentes, com um total de n=6 por grupo. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student,  $P < 0,01$  (\*\*). O gráfico é representativo de 6 experimentos independentes.



**Figura 21 – Análise da migração de macrófagos para a lesão.** As lesões foram retiradas no 7º dia digeridas em um coquetel de enzimas e as células obtidas foram marcadas para F4/80. **(A)** Seleção da população de macrófagos no “dot plot” FSC/SSC. **(B)** Como controle negativo foram utilizadas células isoladas da lesão não marcadas com anticorpos (não marcado). **(C)** Isotipo F4/80. **(D)** Análise da expressão de F4/80 nos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos. **(E)** Representação gráfica da população de macrófagos em 3 experimentos independentes, com um total de n=3 por grupo. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes.



**Figura 22 – Análise da migração de células Tregs para a lesão.** As lesões foram retiradas no 7º dia digeridas em um coquetel de enzimas e as células obtidas foram marcadas para Fxp3. **(A)** Seleção da população de linfócitos no “dot plot” FSC/SSC. **(B)** Como controle negativo foram utilizadas células isoladas da lesão não marcadas com anticorpos (não marcado). **(C)** Isotipo Fxp3. **(D)** Análise da expressão de Fxp3 nos animais C57BL/6 e CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos. **(E)** Representação gráfica da população de Tregs. Não foi possível realizar teste estatístico devido ao número de amostras inferior a 3. Em cada grupo n=1.

## 5. Discussão

O diabetes mellitus ocasiona alterações metabólicas importantes, como a neuropatia diabética e a insuficiência vascular periférica que são frequentes nesses casos, representando fatores que certamente favorecem a instalação e o desenvolvimento de lesões que não cicatrizam. Dado ao grande número de pacientes que sofrem com esse tipo de lesão e os fatores relacionados a ela como diminuição da qualidade de vida e o alto custo no tratamento, ressaltamos a importância do estudo de novas substâncias que acelerem a cicatrização das lesões cutâneas crônicas.

Partindo do princípio de que as feridas crônicas são caracterizadas por possuir um retardo no processo de cicatrização, fomos primeiramente comparar o processo de cicatrização de feridas cutâneas em animais C57BL/6 diabéticos e animais C57BL/6 não diabéticos. Nossos ensaios mostraram que os animais C57BL/6 diabéticos possuem um retardo no processo de cicatrização em relação aos animais C57BL/6 não diabéticos. Esse dado já era esperado visto que a cicatrização nos animais diabéticos é comprometida em detrimento das alterações vasculares e neuropáticas provocadas pela condição do diabetes, os quais promovem o surgimento de feridas crônicas retardando a sua cicatrização. Segundo Gregory e colaboradores, as lesões desenvolvidas em pacientes diabéticos são caracterizadas por uma reação inflamatória exagerada e prolongada em relação à fase inflamatória de um processo de cicatrização normal, com um prejuízo significativo no controle da invasão bacteriana local (Gregory e colaboradores, 2008). Essa afirmativa corrobora com os dados encontrados em nosso trabalho, visto que os animais diabéticos apresentaram um atraso significativo na contração da ferida.

Vale ressaltar que também foi comparado o processo de cicatrização entre os animais CCR4<sup>-/-</sup> e animais C57BL/6 não diabéticos, e que não foi observada nenhuma alteração em todos os parâmetros avaliados, sugerindo que a ausência do receptor CCR4 não promove nenhum comprometimento na cicatrização de animais saudáveis.

O processo de reparo de feridas crônicas é um dos mais complexos processos biológicos que ocorrem durante a vida humana. No momento após a injúria, a integridade do tecido e a homeostasia necessitam ser recuperadas. Para tal, várias vias intracelulares e intercelulares precisam ser ativadas e reguladas, para que não haja uma resposta exagerada ou insuficiente por parte das células do sistema imunológico. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos deletérios da invasão de patógenos, ao passo que o sistema respondendo de modo exacerbado pode gerar respostas inflamatórias prejudiciais (Cruvinel e

colaboradores, 2008). Assim, após iniciada a resposta imune, as vias imnomodulatórias também entram em ação para controlar a magnitude e duração da resposta. As células T reguladoras (Tregs) ajudam a limitar o dano causado por uma resposta imune exagerada, visto que em sua ausência pode resultar em inflamação intensa (Lima, 2006).

Assim com o modelo de lesão crônica bem estabelecido fomos investigar o papel do receptor de quimiocina CCR4 e das células Tregs no processo de cicatrização de lesões cutâneas crônicas. Para isso usamos animais CCR4<sup>-/-</sup>, a fim de investigar indiretamente a migração das células Tregs para a pele, visto que já está descrito na literatura que o receptor CCR4 e suas quimiocinas CCL17 e CCL22 ligantes são responsáveis por promover o recrutamento de células Tregs para a pele inflamada (Lehtimaki e colaboradores, 2010).

Nossos dados mostraram que os animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentam um processo de cicatrização acelerado em relação aos animais controle (C57BL/6), sugerindo que uma menor migração das células Tregs para a pele inflamada pode contribuir positivamente no processo de cicatrização de feridas crônicas. Experimentos para a quantificação das células Tregs na lesão foram realizados a fim de encontrar dados que corroborassem com esse resultado. No entanto, não foi possível realizar um teste estatístico para a comprovação deste fato, mas tudo indica que existe uma tendência a uma menor população de células Tregs nos animais CCR4<sup>-/-</sup> no 7º dia de lesão, sugerindo assim o envolvimento dessas células e do receptor CCR4 no processo de cicatrização.

Segundo Seneschal e colaboradores, a pele de humanos contém uma população de células Tregs residentes que representa 5-10% das células T residentes na pele (Seneschal e colaboradores, 2012; Clark e colaboradores, 2006). Em 2011, Tubo e colaboradores demonstraram que dois receptores de quimiocinas diferentes estão envolvidos no recrutamento das células Tregs para a pele durante a inflamação, o CCR4 e CCR10. Os ligantes do CCR4 estão presentes no endotélio da derme e facilitam a entrada das Tregs do sangue para a derme, enquanto o CCR10 controla a subsequente migração dessas células da derme para a epiderme (Tubo e colaboradores, 2011). Diante desses achados e sabendo que o receptor de quimiocina CCR4 está presente na superfície das células Tregs e é o responsável por direcionar a migração das células Tregs para a pele inflamada, podemos concluir que diante da deficiência desse receptor não ocorre/ou ocorre um menor recrutamento de novas células para a lesão proporcionando assim um equilíbrio ideal entre a inflamação e o efeito regulador/supressor das células Tregs residentes. Assim, a deficiência no receptor CCR4 e uma diminuição na migração das células Tregs contribui para o processo de cicatrização de

feridas crônicas, que muitas das vezes encontra-se estagnados na fase inflamatória.

A fim de investigar mais a fundo a participação das células Tregs no processo de cicatrização de lesões crônicas foi realizado um experimento com o intuito de aumentar e depletar a população de células Tregs na lesão. Para isso foi administrado o lentivirus contendo RNA para a citocina IL-2 em animais diabéticos C57BL/6 visando o aumento do número de Tregs. E a administração do anticorpo monoclonal PC61 (anti-CD25) em animais diabéticos C57BL/6 visando depletar a população de células Tregs. Também foi realizado um experimento em paralelo onde os animais diabéticos C57BL/6 foram tratados com anticorpos anti-CCL17 e anti-CCL22 visando bloquear o efeito dessas quimiocinas no recrutamento das células Tregs para a pele. Nossos dados mostraram que a redução de células Tregs, via ausência do receptor CCR4 ou pela inibição do efeito das quimiocinas CCL17/CCL22, acelera o fechamento de feridas crônicas. Ainda, nosso dado preliminar com o AAV-IL2 sugere que o aumento de células Tregs atrapalha o fechamento da lesão, provavelmente pela inibição do processo inflamatório que é fundamental para o estímulo inicial do processo de cicatrização. Não foi possível obter nenhuma conclusão com o experimento realizado com o anticorpo monoclonal PC61, visto que os animais vieram a óbito dois dias após a administração. A literatura está repleta de artigos mostrando a participação da IL-2 como um potente fator de crescimento induzindo a expansão das células Tregs. Recentes estudos clínicos em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e câncer têm mostrado que o tratamento com recombinante de IL-2 pode induzir a expansão de Tregs no sangue periférico (Nelson, 2012; Ritz e colaboradores, 2006; Abbas e colaboradores, 2010). No entanto, esse aumento da população de Tregs parece não contribuir para o processo inflamatório crônico, como estamos tentando sugerir com nossos dados com AAV-IL2, mas esses dados precisam ser refeitos e confirmados com melhores controles (AAV-luciferase que visivelmente melhorou a cicatrização; e RT-PCR para FOXP3 como controle da nossa manipulação da população de Treg).

Já está bem descrito na literatura que camundongos adultos que sofrem a depleção da população de células Tregs, desencadeiam doenças autoimunes severas e inflamação, assim como os camundongos que desenvolvem espontaneamente mutação no gene *Foxp3* (síndrome Scurfy) (Dudda e colaboradores, 2008; Oberg e colaboradores, 2011; Campbell e Ziegler, 2007; Bennett e colaboradores, 2001). Eguchi e colaboradores demonstraram que a administração de anticorpo monoclonal PC61 elimina as células  $CD4^{+}Foxp3^{+}$  e induz extremamente rápido o começo da diabetes em jovens camundongos NOD (Eguchi e colaboradores, 2006). Variações genéticas da IL2RA estão associadas com a susceptibilidade

do diabetes mellitus insulino dependente tipo 10 (IDDM10) ([www.abcam.com/IL2-Receptor-alpha-antibody-PC61-FITC-ab86911.html](http://www.abcam.com/IL2-Receptor-alpha-antibody-PC61-FITC-ab86911.html)). Assim, tais afirmativas vêm de encontro com nosso dado, onde animais C57BL/6 diabéticos que receberam injeção do anticorpo monoclonal PC61 (anti-CD25), com o intuito de depletar a população de células Tregs, vieram a óbito dois dias após a sua administração. Esse dado confirma que diante da indução de uma doença autoimune, diabetes tipo I, e com conseqüente associação do surgimento de uma inflamação crônica, camundongos que não possuem a população de células Tregs não sobrevivem, mostrando que a participação dessas células é fundamental diante do controle de uma doença inflamatória. Novos experimentos com PC61 serão realizados em animais não diabéticos com o intuito de observar o processo de cicatrização na ausência das células Tregs, visto que em animais diabéticos não será possível fazer esse ensaio.

Apesar de a literatura ser escassa sobre a participação do receptor CCR4 no processo de cicatrização de feridas cutâneas, o que se tem observado de uma maneira em geral é que na ausência desse receptor ocorre uma exacerbação da inflamação. Segundo Lehtimaki e colaboradores, foi demonstrado através do modelo de hipersensibilidade por contato induzida através de oxazolona, que a ausência do receptor CCR4 resulta em uma resposta imune secundária aumentada durante a inflamação alérgica cutânea (Lehtimaki e colaboradores, 2010). Em outros modelos inflamatórios, por exemplo, no modelo experimental de endotoxemia, animais CCR4<sup>-/-</sup> que foram desafiados com LPS exibem uma menor produção de citocinas inflamatórias no local e um maior recrutamento de macrófagos peritoneais (Chvatchko e colaboradores, 2000). Nesse mesmo contexto, Schuh e colaboradores demonstraram que animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentam uma resposta antifúngica eficiente caracterizada pelo aumento da função neutrofílica e pelo aumento de macrófagos no espaço broncoalveolar (Schuh e colaboradores, 2002). Algumas dessas características como o aumento do número de neutrófilos e menor produção/liberação de citocinas também foram observadas em nossos experimentos, contribuindo assim para o processo de cicatrização.

Outro fator importante analisado foi à qualidade da cicatriz através da análise histológica do tecido formado (H&E) e do depósito de fibras de colágeno. Essas análises foram feitas no 7º e 14º dias pós-lesão. Apesar dos dados da coloração de H&E mostrarem um perfil de cicatrização semelhante entre os dois grupos, foi possível observar diferenças sutis importantes, onde tanto no 7º quanto no 14º dia os animais C57BL/6 diabéticos apresentaram uma hiperplasia epidérmica em relação aos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos. No entanto, no trabalho de Lehtimaki e colaboradores, os autores afirmam que a ausência do CCR4 tem um efeito claro no processo inflamatório, onde camundongos CCR4<sup>-/-</sup> demonstram um tecido

edemaciado com aumento significativo no número de células inflamatórias na pele comparados com os animais controles (Lehtimaki e colaboradores, 2010). Os nossos dados com os animais não diabéticos mostraram esse mesmo perfil, onde animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentaram um tecido mais edemaciado. Entretanto, nos animais diabéticos essa fato não foi observado, o que pode ser explicado pela disfunção vascular e imune dos animais diabéticos.

A quantificação da expressão das fibras de colágeno totais mostrou que os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos possuem um novo tecido formado com características de um tecido mais maduro e resistente quando comparado ao tecido formado nos animais C57BL/6 diabéticos, que expressam menos fibras. O colágeno, em última instância, é o principal componente da cicatriz madura, este é responsável por dar força tênsil e sustentação do tecido (Werner e colaboradores, 2007), uma cicatriz com poucas fibras de colágeno esta sujeita ao rompimento frente uma segunda injúria. Não foi encontrado na literatura trabalho que pudesse servir como base para a comparação do depósito de colágeno nos animais CCR4<sup>-/-</sup>, entretanto sabe-se que a produção de colágeno é feita principalmente por miofibroblastos, e já foi demonstrado que o aumento da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) na pele dos animais deficientes para IL-10 sugere um aumento na diferenciação de fibroblasto em miofibroblastos, responsáveis pela contração da ferida nos camundongos (Roers e colaboradores, 2007). Assim de uma maneira indireta podemos associar a menor produção/liberação de IL-10 nos animais CCR4<sup>-/-</sup> com o aumento do depósito de fibras de colágeno, dados esses que corroboram com nosso trabalho.

A quantificação e diferenciação do infiltrado celular também foram analisadas, visto que complementam as análises histológicas. Nossos dados mostram que os animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos possuem um infiltrado neutrofilico maior que os animais C57BL/6 diabéticos no 7º dia de lesão, com já citado anteriormente. Vale ressaltar que através da quantificação de MPO foi possível observar diferença na magnitude da migração celular entre os animais diabéticos e animais não diabéticos. Como já esta bem caracterizada na literatura, os animais diabéticos possuem uma migração menor de células inflamatórias para o local da lesão, devido ao comprometimento vascular ocasionado em detrimento da condição do diabetes, o que dificulta e retarda o processo de cicatrização.

Os neutrófilos e macrófagos representam a maior fração de células inflamatórias recrutadas para a lesão durante um processo inflamatório. Imediatamente após a injúria, os neutrófilos migram através do endotélio e começam o desbridamento do tecido desvitalizado e de agentes infecciosos. Os neutrófilos são células comumente encontradas em sítios de inflamação, porém, tendem a deixar o local com o passar do tempo devido ao direcionamento

natural da fase inflamatória para a fase de reparo (Grose & Werner, 2004). Segundo Richards e colaboradores, está claro que as Tregs  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  inibem a resposta inflamatória assim como a resposta imune adaptativa. Eles demonstraram que as células Tregs limitam a resposta inflamatória inibindo o acúmulo e a sobrevivência dos neutrófilos dentro de horas após a inoculação de células tumorais. Nesse mesmo trabalho também foi demonstrado que no local da inoculação das células tumorais ocorre um aumento nos níveis dos neutrófilos atraídos pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL2 em animais deficientes para células Tregs em comparação com os controles. Essa afirmativa corrobora com nosso dado, mostrando que os animais C57BL/6 possuem um infiltrado neutrofílico menor que os animais  $CCR4^{-/}$ . Também foi mostrado anteriormente que animais  $CCR4^{-/}$  apresentam uma resposta antifúngica caracterizada pelo aumento da função neutrofílica e pelo aumento de macrófagos no espaço broncoalveolar (Schuh e colaboradores, 2002). Corroborando mais uma vez com nossos dados.

Os macrófagos persistem em todas as fases do processo de cicatrização. O seu número começa a aumentar durante a fase inflamatória, ocorre o pico durante a fase de formação do tecido de granulação e declina gradualmente durante a fase de maturação. Durante a fase inflamatória ocorre um influxo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) seguida por uma subsequente invasão de monócitos, que se diferenciam em macrófagos. Esses permanecem durante a formação do tecido de granulação combatendo microrganismos invasores, contribuindo para a eliminação de detritos e na liberação de fatores de crescimento. No entanto, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores citotóxicos, a atividade descontrolada de macrófagos também pode ser prejudicial para o reparo do tecido (Eming e colaboradores, 2010). Devido a sua importância no processo de cicatrização fomos quantificar a população de macrófagos presente no 7º dia de lesão. Em nossas análises não encontramos diferenças na população de macrófagos; talvez a técnica utilizada não tenha sido a ideal, e por isso iremos realizar novos experimentos através da técnica de imunohistoquímica que nos possibilita a identificação e localização dos macrófagos, como por exemplo diferenciar o tipo de macrófago envolvido no reparo tecidual, M1 (clássico) ou M2 (alternativo).

Outro parâmetro avaliado foi à quantificação de citocinas e quimiocinas. Algumas citocinas e quimiocinas são importantes reguladoras do processo de cicatrização uma vez que participam de processos como migração celular, diferenciação e proliferação (Slavin, 1996). Dessa forma buscamos avaliar a produção e liberação de citocinas como IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Resumindo, os dados obtidos nos permitem concluir

que os animais CCR4<sup>-/-</sup> produzem/liberam concentrações menores de citocinas principalmente no 2º dia de lesão, no entanto a citocina IL-10 possui uma tendência a menor liberação em todos os dias analisados (2º, 4º e 7º). Os animais diabéticos possuem uma maior produção/liberação de citocinas que os animais não diabéticos, caracterizando assim uma resposta inflamatória exacerbada quando comparado os dois grupos. Vale ressaltar também que algumas diferenças não foram observadas em detrimento de um número pequeno de amostras e que talvez a técnica de imunohistoquímica fosse melhor para observar essas alterações.

Ao analisarmos a citocina IL-6 nos 2º, 4º e 7º dias de lesão foi observada uma diminuição da produção/liberação dessa citocina no segundo dia de lesão, essa tendência permaneceu até o quarto dia. Lin e colaboradores utilizaram camundongos deficientes para IL-6 e observaram um atraso no fechamento da lesão em relação aos camundongos selvagens, além da redução no infiltrado leucocitário, reepitelização, angiogênese e depósito de colágeno. Estas observações sugerem que a IL-6 tem um papel importante na cicatrização de feridas (Thorper e Baynes, 2003). Entretanto Fujimoto e colaboradores descreveram que a produção excessiva dessa citocina pode implicar em uma variedade de distúrbios inflamatórios. Análises recentes *in vitro* sugerem que a IL-6 é uma citocina chave que determina o balanço entre células Tregs e células Th17 (Fujimoto e colaboradores, 2001). Também já está bem caracterizada que a produção excessiva de IL-6 *in vivo* altera o desenvolvimento e a função das células Tregs (Fujimoto e colaboradores, 2001). Assim podemos concluir que a IL-6 se faz necessário no processo de cicatrização, mas que uma produção excessiva dessa citocina pode acarretar em inflamação exagerada.

A IL-10 é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação. Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Adicionalmente, ela não só regula o crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune, mas também de queratinócitos e células endoteliais (Balbino e colaboradores, 2005). Roers e colaboradores, 2007, demonstraram que animais deficientes para a IL-10 possuem um processo de cicatrização acelerado em relação aos animais controle. Esse efeito foi atribuído a uma reepitelização mais eficiente, assim como, uma aceleração na contração da ferida. Também já é sabido que uma das maneiras pela qual as células Tregs medeiam a supressão da resposta imunológica é através da produção de citocinas, entre elas a IL-10 (Lima, 2006; Campbell e Koch, 2011). Esses achados corroboram com nosso trabalho visto que os animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentam uma população menor de células Tregs, apresentando uma tendência a menor produção/liberação dessa citocina durante todo o

processo de cicatrização.

A IL-12 é uma citocina importante na regulação da resposta inflamatória. A forma biologicamente ativa é o heterodímero de 70 kDA (IL-12p70), que é constituído de 2 subunidades (40 kDA –p40 e 35 kDA –p35). A IL-12 está envolvida na diferenciação de células T naive em células Th1 e estimula macrófagos do tipo M1 (macrófagos clássicos), sendo importante na fase inicial do processo de cicatrização, fase inflamatória. Caso continue sendo liberada, pode exacerbar a inflamação retardando o processo de cicatrização. Foi observada diferença entre os grupos apenas no 2º dia de lesão, onde os animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentaram uma menor liberação dessa citocina.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória responsável por estimular a ativação de neutrófilos e macrófagos, inibir a síntese de colágeno pelos fibroblastos, inibir a proliferação de células endoteliais e estimular a proliferação de fibroblastos (Schaffer & Barbul, 1998). Segundo Gregory e colaboradores, quantidades elevadas de TNF- $\alpha$  na ferida foram identificados como um fator molecular preditivo para a falha no fechamento da lesão (Gregory e colaboradores, 2008). Já Shinozaki e colaboradores, realizaram um estudo em animais deficientes para TNF- $\alpha$  mostrando que a ausência desta citocina promove a formação de tecido de granulação, porém retarda a reepitelização (Shinozaki e colaboradores, 2009). Lipsky e colaboradores demonstraram que o TNF inibe a função supressora de ambas Tregs naturais e induzidas (Lipssky e colaboradores, 2006) contribuindo assim para um retardo no processo de cicatrização. Essas afirmativas vão de encontro aos resultados encontrados nesse trabalho onde os animais C57BL/6 diabéticos possuem quantidade elevada de TNF- $\alpha$ , apresentando também um retardo no processo de cicatrização, quando comparado aos animais CCR4<sup>-/-</sup> diabéticos.

Camundongos deficientes para a quimiocina MCP-1 apresentam um retardo na reepitelização, angiogênese e na síntese de colágeno (Leitch e colaboradores, 2009). Em nossas análises não encontramos diferenças na produção/liberação de MCP-1, essa quimiocina induz a migração de macrófagos, no entanto também não foi encontrado diferença na população de macrófagos indicando assim que o receptor CCR4 não interfere no recrutamento dessas células.

A citocina IL-1 $\beta$  é produzida por macrófagos ativados, células endoteliais entre outras, sendo um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. Observamos uma menor produção/liberação dessa citocina nos animais CCR4<sup>-/-</sup> apenas no 2º dia de lesão.

Os resultados apresentados se tornam revelantes por demonstrarem que o receptor de quimiocina CCR4 contribui negativamente para o processo de cicatrização de feridas crônicas e que as células Tregs parecem estar envolvidas nesse processo.

## 6. Conclusão

- Os animais CCR4<sup>-/-</sup> possuem uma aceleração no processo de cicatrização quando comparados aos animais controles;
- O receptor de quimiocina CCR4 esta envolvido negativamente no processo de cicatrização;
- O aumento do número de células Tregs parece ser prejudicial para o processo de cicatrização, da mesma forma que a redução dessa população na pele tem um efeito positivo para o fechamento da lesão.
- Os animais CCR4<sup>-/-</sup> apresentam um depósito maior de fibras de colágeno caracterizando essa cicatriz como uma cicatriz mais madura e resistente.
- Os animais CCR4<sup>-/-</sup> possuem um infiltrado neutrofilico maior que os animais controles;
- Os animais CCR4<sup>-/-</sup> produzem/liberam menor concentração de citocinas pro e anti-inflamatórias no início do processo de cicatrização;

Em suma, os resultados encontrados mostram que o receptor de quimiocina CCR4 não contribui positivamente para o processo de cicatrização em animais diabéticos. E que provavelmente esse efeito deletério do CCR4 pode ser devido ao recrutamento de Tregs para o local da lesão cutânea. Esses dados podem ser utilizados futuramente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de ferida crônica tendo como alvo esse receptor e a Treg, visto que a lesão cutânea de difícil cicatrização ainda é um doença que acomete todos os tipos de classe social e etnias acarretando problemas sociais, emocionais e econômicos para a sociedade e seus portadores.

## 7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Básica: Funções e distúrbios do Sistema Imunológico*. Rio de Janeiro: *Elsevier*. Ed.2ª. 2007.

ACOSTA, J.B.; BARCO, D.G.; VERA, D.C.; SAVIGNE, W.; SAURA, P.L.; NIETO, G.G.; SCHULTZ, G.S. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *International Wound Journal*. 5 (4): 530-539. 2008.

ANALYSTS, G.I. Global wound care products Market to reach \$20.3 billion by 2015. According to new report by Global Industry Analysts. 2010. Disponível em: [http://www.prweb.com/releases/wound\\_care\\_products/wound\\_management\\_product/prweb4466274.htm](http://www.prweb.com/releases/wound_care_products/wound_management_product/prweb4466274.htm). Acesso em: 29 de janeiro de 2013.

Associação Americana de Diabetes, 2008.

BAEKKEVOLD, E.S.; WURBEL, M.A.; KIVISAKK, P.; WAIN, C.M.; POWER, C.A.; HARALDSEN, G.; CAMPEBELL, J.J. A role for CCR4 in development of mature circulating cutaneous T helper memory cell populations. *The Journal of Experimental Medicine*. 201 (7): 1045-1051. 2005.

BAIROS, A.V. *Biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo em ratos normais e diabéticos tratados com N-acetilcisteína*. 2009. 103f. Tese (Mestrado em Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41 (1): 27-51. 2005.

BEHM, B.; BABILAS,P.; LANDTHALER, M.; SCHREML, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 26: 812-820. 2012.

BENNETT, C.L.J.; CHRISTIE, F.; RAMSDELL, M.E.; BRUNKOW, M.E.; FERGUSON, L.; WHITESELL, L.; KELLY, T.E.; SAULSBURY, F.T.; CHANCE, P.F.; OCHS, H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of Foxp3. *Nature Genetics*. 27 (1): 20-31. 2001.

BISWAS, A.; BHARARA, M.; HURST, C.; GRUESSNER, R.; ARMSTRONG, D.; RILO, H. Use of sugar on the healing of diabetic ulcers: A review. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 4 (5): 1139-1145. 2010.

BORREGO, L.M.; ROSA, S.; ALGUERÓ, C.; TRINDADE, H.; PINTO, J.R. Células reguladoras. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. XIII (3): 365-376. 2007.

BREM, H.; CANIC, M.T. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 117 (5): 1219-1222. 2007.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. A Brief history of wound care. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 117 (7): 6S-11S. 2006.

BRUBAKER, A.L.; SCHNEIDER, D.F.; PALMER, J.L.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. An improved cell isolation method for flow cytometric and functional analyses of cutaneous wound leucocytes. *Journal of Immunological Methods*. 1-6. 2011.

CAMPBELL, D.J.; KOCH, M.A. Phenotypical and functional specialization of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*. 11: 119-130. 2011.

CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Immunology*. 7: 305-310. 2007.

CHETTIBI, S., FERGUSON, M.W.J. Wound repair: an overview. In: Gallin, JI, Snyderman, R, eds. Inflammation: *Basic Principles and Clinical Correlates*, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott. Williams and Wilkins, 865–881, 2009.

CLARK, R.A. Skin-resident T cells: The ups and downs of on site immunity. *The Society for Investigative Dermatology*. 130: 362-368. 2010.

CLARK, R.A.; FUHLBRIGGE, R.C. Immunology and skin disease 2009: Frontiers in cutaneous immunology. *Journal of Investigative Dermatology*. 129: 1849-1851. 2009.

CLARK, R.A.; KUPPER, T.S. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of nature regulatory T cells isolated from human skin. *Immunobiology*. (109) 1: 194-202. 2007.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA, D.; ARAÚJO, J.A.P.; SALMAZI, K.C.; KÁLLAS, E.G.; ANDRADE, L.E.C. Células T regulatórias naturais (T<sub>regs</sub>) em doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 48 (8): 342-355. 2008.

DELAVARY, B.M.; VEER, W.M.; EGMOND, M.V.; NIESSEN, F.B.; BEELE, R.H.J. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 216: 753-762. 2011.

DING, Y.; XU, J.; BROMBERG, J.S. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends in Immunology*. 33 (4): 174-179. 2012.

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

DUDDA, J.C.; PERDEU, P.; BACHTANIAN, E.; CAMPBELL, D.J. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *Journal of Experimental Medicine*. 205 (7): 1559-1565. 2008.

FABRINI, S. P.; ALFENAS, R.C.G.; PRIORE, S.E.; FRANCESCHINI, S. C. C. Evolução dos critérios para diagnóstico do diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 23(2): 111-118. 2008.

Federação Internacional de Diabetes, 2010.

FERREIRA, M.C.; JUNIOR, P.T.; CARVALHO, V.F.; KAMAMOTO, F. Complex wounds. *Clinics*. 61 (6): 571-578. 2006.

FREEDBERG, I.M.; CANIC, M. T.; KOMINE, M.; BLUMENBERG, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of Investigative Dermatology*. 116 (5): 633-640. 2001.

FUJIMOTO, M.; NAKANO, M.; TERABE, F.; KAWAHATA, H. OHKAWARA, T.; HAN, Y.; RIPLEY, B.; SERADA, S.; NISHIKAWA, T.; KIMURA, A.; NOMURA, S.; KISHIMOTO, T.; NAKA, T. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. 186: 32-40. 2011.

GERSON, R.K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 18: 723-733. 1970.

GOGIA, P.P. Feridas - Tratamento e cicatrização. *Revinter*. 1-9. 2003.

GRAVES, D.T.; KAYAL, R.A. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Bioscience*. 13: 1227-1239. 2011.

GROSE, R.; WERNER, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Molecular Biotechnology*. 28 (2): 147-66. 2004.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 89 (3): 219-229. 2010.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 459 (15): 314-321. 2008.

HOBIZAL, K.B.; WUKICH, D.K. Diabetic foot infections: current concept review. *Diabet Foot & Ankle*. 3: 1-8. 2008.

IELLEM, A.; MARIANI, M.; LANG, R.; RECALDE, H.; BORDIGNON, P.P.; SINIGAGLIA, F.; D'AMBROSIO, D. Unique chemokine response profile and specific expression of chemokine receptor CCR4 and CCR8 by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 194 (6): 847-853. 2001.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P.; ALDUNATE, C.B.; FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina (São Paulo)*. 89 (3/4): 125-131. 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 359-366. 2004.

KATO, T.; SAEKI, H.; TSUNEMI, Y.; SHIBATA, S.; TAMAKI, K.; SATO, S. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CC chemokine ligand (CCL)17 accelerates wound healing by enhancing fibroblast migration. *Experimental Dermatology*. 20: 669-684. 2001.

KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C.; STEPHENS, J.W. The diabetic foot. *QJM: An International Journal of Medicine*. 101: 685-695. 2008.

KIM, K.S.; KIM, S.K.; SUNG, K.M.; CHO, Y.W.; PARK, S.W. Management of type 2 diabetes mellitus in older adults. *Diabetes & Metabolism Journal*. 36: 336-344. 2012.

KORSGREN, O.; JANSSON, L.; SANDLER, S.; ANDERSSON, A. hyperglycemia-induced B cell toxicity. *Journal of Clinical Investigation*. 86: 2161-2168. 1990.

KROEZ, K.L.; BOINK, M.A.; SARDJOEPERSAD, S.C.S.; WAAIJMAN, T.; SCHEPER, R.J.; GIBBS, S. Autocrine regulation of re-epithelization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2 and CXCR3. *Journal of Investigative Dermatology*. 132: 216-225. 2011.

LAHL, K.; LODDENKEMPER, C.; DROUIN, C.; FREYER, J.; ARNASON, J.; EBERL, G.; HAMANN, A.; WAGNER, H.; HUEHN, J.; SPARWASSER, T. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *Journal of Experimental Medicine*. (10): 1-7. 2007.

LEHTIMAKI, S.; TILLANDER, S.; PUUSTINEN, A.; MATIKAINEN, S.; NYMAN, T.; FYHRQUIST, N.; SAVINKO, T.; MAJURI, M.L.; WOLFF, H.; ALENIOUS, H.; LAURERMA, A. Absence of CCR4 exacerbates skin inflammation in an oxazolone-induced contact hypersensitivity model. *The society for Investigative Dermatology*. 130: 2743-2751. 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51 (2): 216-226. 2008.

LEVENSON, S.M.; GEEVE, E.F.; CROWLEY, L.V.; OATERS, J.F.; BERARD, C.W.; ROSEN, H. The healing of rat skin wounds. *Annals of Surgery*. 161 (2): 293-308. 1965.

LEVY, M.N., STATION, B.A., KOEPPEN, B.M. Fundamentos de fisiologia. Tradução Nephtali Segal Grinbaum et al., 4. Ed. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2006.

LIMA, H.C. Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 81 (3): 269-281. 2006.

LUCAS, T.; WAISMAN, A.; RANJAN, R.; ROES, J.; KRIEG, T.; MULLER, W.; ROERS, A.; EMING, S.A. Differential roles of macrophages in diverse phases o skin repair. *The Journal of Immunology*. 184: 1-14. 2010.

MACIEL, É.A.F. Prevalência de feridas em pacientes internados em um hospital filantrópico de grande porte de Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

MATROUGUI, K.; ZAKARIA, A.E.; KASSAN, M.; CHOI, S.; NAIR, D.; VILLALOBOS, R.A.G.; CHENTOUFI, A.A.; KADOWITZ, P.; BELMADANIS.; PARTYKA, M. Natural regulatory T cells control coronary arteriolar endothelial dysfunction in hypertensive mice. *The American Journal of Pathology*. 178 (1): 434-441.2011.

MILATOVIC, S.Z.; RICHMOND, A. CXC chemokines and their recptors: A case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histology andl Histopathology*. 23 (11): 1399-1407. 2008.

OBERG, H.H.; JURICKE, M.; KABELITZ, D.; WESCH, D. Regulation of T cells activation by TLR ligands. *European Journal of Cell Biology*. 90:582-592. 2011.

OPALENIK, S.R.; DAVIDSON, J.M., Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *The Faseb Journal*. 19 (11): 1561-1573. 2005.

POPPENSIEKER, K.; OTTE, D.; SCHURMANN, B.; LIMMER, A.; DRESING, P.; DREWS, E.; SCHUMAK, B.; KLOTZ, L.; RAASCH, J.; MILDNER, A.; WAISMAN, A.; SCHEU, S.; KNOLLE, P.; FORSTER, I.; PRINZ, M.; MAIER, W.; ZIMMER, A.; ALFERINK, J. CC chemokine receptor 4 is required for experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating GM-CSF and IL-23 production in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1-6. 2012.

PRADHAN, L.; ANDERSE, N.D.; NABZDYK, C.; LOGERFO, F.W.; VEVES, A. Wound-healing abnormalities in diabetes and new therapeutic interventions. *US Endocrine Disease*. 68-72. 2007.

PROKSCH, E.; BRANDENER, J.M.; JESEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 17 (12): 1063-72. 2008.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacological Reviews*. 22 (4): 485-518. 1970.

RICHARD, H.; WILLIAMS, A.; JONES, E.; HINDLEY, J.; GODKIN, A.; SIMON, K.A.; GALLIMORE, A. Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunobiology*. 1-10. 2010.

SAKAGUCHI, S.K.; SAKAGUCHI, M.; ASANO, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal Immunology*. 155 (3): 1151-1164. 1995.

SANTOS, V.L.C.G. *Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio*. In: Duarte YAO, Diogo, M.J.D. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; 265-306. 2000.

SEN, C.K.; GORDILLO, G.M. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regeneration*. 17 (6): 763-771. 2009.

SENESCHAL, J.; CLARK, R.A.; GEHAD, A.; ALLAN, C.M.B.; KUPPER, T.S. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. **Immunity**. 36. 873-884. 2012.

SGOUROUDIS, E.; ALBANESE, A.; PICCIRILLO, A. Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. **The Journal of Immunology**. 181:6282-6292. 2008.

SHAFFER, M.; BARBUL, A.; Lymphocyte function in wound healing and following injury. **British Journal of Surgery**. 85: 444-460. 1998.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**. 341 (10): 738-746. 1999.

Sociedade Brasileira de diabetes, 2007.

SOLDEVILA, G., ZEPEDA, E. A. G. Role of chemokines in T cell development. **Immunology**. 22 (4): 371-384. 2003.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wound. **The American Journal of Surgery**. 176 (2): 26S-38S. 1998.

SZABOWSKI, A., SZABOWSKI, N.M., ANDRECHT, S., KOLBUS, A., KISTNER, M. S., FUSENIG, N. E., c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. **Cell**. 103 (5): 745-755. 2000.

TAKAHASHI, T.; TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; UEDE, T.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, N.; MAK, T.W.; SAKAGUCHI, S.; Immunologic self-tolerance maintained by CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocytes-associated antigen4. **The Journal of Experimental Medicine**. 192 (2): 303-310. 2000.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Simpósio: Fundamentos em Clínica Cirúrgica**. 41 (3): 259-264. 2008.

TOMURA, M.; HONDA, T.; TANIZAKI, H.; OTSUKA, A.; EGAWA, G.; TOKURA, Y.; WALDMANN, H.; HORI, S.; CYSTER, J.G.; WATANABE, T.; MIYACHI, Y.; KANAGAWA, O.; KABASHIMA, K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 120 (3): 883-893. 2010.

TOULON, A.; BRETON, L.; TAYLOR, K.; TENENHAUS, M.; BHAVSAR, D.; LANIGAN, C.; RUDOLPH, R.; JAMESON, J.; HAVRAN, W.L. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *Journal of Experimental Medicine*. 206 (4): 743-750. 2009.

TUBO, N.J.; MCLACHLAN, J. B.; CAMPBELL, J.J. Chemokine receptor requirements for epidermal T-cell trafficking. *The American Journal of Pathology*. 178 (6): 2496-2503. 2011.

VALENCIA, X.; STEPHENS, G.; MANSKY, R.G.; WILSON, M.; SHEVACH, E.M.; LIPSKY, P.E. TNF downmodulates the function of human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T-regulatory cells. *Immunobiology*. (108) 1: 253-261. 2006.

VAZ, J.A.; PATNAIK, A. Diabetes mellitus: Exploring the challenges in the drug development process. *Perspectives in Clinical Research*. 3(3): 109-112. 2012.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*. 37: 1528-1542. 2009.

VIGNALI, D.A.; CLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. *Nature Review Immunology*. 8 (7): 523-532. 2008.

WANG, X.; FUJITA, M.; PRADO, R.; TOUSSON, A.; HSU, H.C.; SCHOTTELIUS, A.; KELLY, D.R.; YANG, P.A., WU, Q.; CHEN, J.; ELMETS, C.A.; MOUNTZ, J.D.; EDWARDS, C.K. Visualizing CD4 T-cell migration into inflamed skin and its inhibition by CCR4/CCR10 blockades using in vivo imaging model. *British Journal of Dermatology*. 162: 487-496. 2010.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 127 (5): 998-1008. 2007.

WOUND CARE MANAGEMENT. Brazilian wound care dressings market. 2007. Disponível em: <http://www.frost.com/prod/servlet/report-brochure.pag?id=N0B2-01-00-00-00>. Acesso em: 29 de janeiro de 2013.

YAMAZAKI, T.; YANG, X.O.; CHUNG, Y.; FUKUNAGA, A.; NURIEVA, R.; PAPPU, B.; OROZCO, M.; KANG, H.S.; PANOPOULOS, A.D.; CRAIG, S.; WATOWICH, S.; JETTEN, A.M.; TIAN, Q.; DONG, C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. 181 (2): 8391-8401. 2008.