



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENFERMAGEM

THAÍS PAULINO DO PRADO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DOS RECEPTORES GPR120 E GPR40
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

CAMPINAS

2019

THAÍS PAULINO DO PRADO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DOS RECEPTORES GPR120 E GPR40
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Enfermagem da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde na Área de Concentração: Cuidado e Inovação Tecnológica em Saúde e Enfermagem.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA THAÍS PAULINO DO PRADO E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO.

CAMPINAS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, CEPID/OCRC Processo nº 2013/07607-8).

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P882a Prado, Thais Paulino do, 1995-
Avaliação do efeito do agonista dos receptores GPR120 e GPR40 na cicatrização de feridas em camundongos diabéticos / Thais Paulino do Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Eliana Pereira de Araújo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Enfermagem.

1. Cicatrização. 2. Ácidos graxos. 3. Inflamação. I. Araújo, Eliana Pereira de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Enfermagem. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of effect of agonist of receptors GPR120 e GPR40 na wound healing of diabetic wound

Palavras-chave em inglês:

Wound healing

Fatty acids

Inflammation

Área de concentração: Cuidado e Inovação Tecnológica em Saúde e Enfermagem

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Eliana Pereira de Araújo [Orientador]

Thiago Antônio Moretti de Andrade

Luiz Osório Silveira Leiria

Data de defesa: 28-06-2019

Programa de Pós-Graduação: Enfermagem

Identificação e informações acadêmicas do(s) aluno(s)

- ORCID do autor: 0000-0001-5740-8072

- Currículo Lattes do autor: Lattes <http://lattes.cnpq.br/5713284056363152>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

THAÍS PAULINO DO PRADO

ORIENTADORA: Profª Drª ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO

MEMBROS:

- 1. PROFª. DRª. Eliana Pereira de Araújo**
- 2. PROF. DR. Thiago Antônio Moretti de Andrade**
- 3. PROF. DR. Luiz Osório Silveira Leiria**

Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Enfermagem.

Data: DATA DA DEFESA 28/06/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à todas as pessoas que um dia se sentiram incapazes, que já foram depressivas e inseguras, que tiveram medo de viver os sonhos, mas que se desafiaram.

Aos que acreditam na Ciência e dedicam suas habilidades para a construção do conhecimento, e aos que a cada dia são privados da oportunidade de realizar uma pós-graduação *Strictu sensu*.

AGRADECIMENTOS

Viver a experiência de realizar mestrado foi para mim mais do que uma conquista acadêmica. É uma representação da minha luta social, das conquistas e sonhos diários. Foi amadurecer, experimentar, responder as ansiedades de aprendiz de pesquisadora, me desafiar ao extremo, perceber os meus limites, minhas dificuldades, desenvolver habilidades, me relacionar. Exigiu de mim ser mais do que enfermeira e aluna, gerou em mim algo além de conhecimento, por isso agradeço...

Primeiramente à Deus, que em sua grandeza sonhou por mim.

Aos meus mentores e inspirações profissionais...

Minha orientadora Prof^a Dr^a Eliana Pereira de Araújo por me ensinar e apoiar durante o trabalho, pela disponibilidade e atenção, por todas as palavras de motivação, pela preocupação e comprometimento com o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso pela orientação, por me corrigir e motivar a ser pesquisadora e também pelo acolhimento.

À Professora Maria Helena Melo Lima pelos inúmeros momentos que passei ao seu lado, nas disciplinas, no ambulatório, nas atividades de extensão e em todos os momentos que esteve presente durante a minha formação desde os primeiros anos de graduação.

À minha família...

Aos meus pais que em sua simplicidade me ensinaram o que não se estuda em livros e artigos e estiveram sempre próximos a mim. A todos os familiares que oraram por mim, se preocuparam e se orgulham das minhas conquistas.

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Sinalização Celular do CEPID OCRC e aos funcionários, Erika Anne, Joseane Morari, Gerson Ferraz, Márcio Cruz e Ruth Reynoso. Em especial aos alunos Vanessa Bóbbo, Carlos Poblete Jara, Natália Mendes, Rodrigo Carraro, Davi Sidartha e Karina Moreira por muito me ensinarem e por todo o trabalho realizado juntos.

À Universidade pela formação e os momentos vividos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, aos professores que diariamente me inspiram, aos funcionários que dedicaram seu trabalho para minha formação e aos colegas pós-graduandos.

Aos amigos que há anos conheci e aos amigos mais próximos no dia a dia que me viram vibrar e sofrer a cada momento, obrigada por compartilharem a vida comigo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Serviço Social de Apoio ao Estudante por me financiarem.

Aos meus amigos de anos passados e as amizades construídas nesses anos de pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

A progressão mundial do diabetes e as complicações associadas à hiperglicemia acentuam a ocorrência de feridas crônicas, que resultam em amputação, e impulsionam a busca por novas tecnologias no tratamento dessas lesões. Receptores GPR120 e GPR40 são potenciais alvos terapêuticos no tratamento de distúrbios metabólicos, por exercerem efeitos anti-inflamatórios e atuarem na estimulação da proliferação celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do GW9508, um agonista duplo dos receptores GPR120 e GPR40, na cicatrização de feridas em modelo experimental. Foram utilizados camundongos C57/BL6J machos, adultos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os animais foram submetidos a confecção de duas feridas excisionais de 6 mm na região dorsal. A retração da pele foi estabilizada com prótese de silicone. Após serem aleatoriamente divididos em 2 grupos, veículo ou GW9508, os animais receberam tratamento tópico com 20 μ L de gel de carbopol incorporado ao veículo ou GW9508 a 100 μ M, uma vez ao dia até 5º ou 12º dia pós-lesão, quando o tecido foi coletado. Os grupos foram comparados quanto a retração macroscópica das feridas, morfologia do tecido cicatricial e expressão gênica por qRT-PCR em tempo real. Para as análises estatísticas aplicamos o teste t de *Student* em amostras independentes e para mais de duas variáveis, análise de variância (ANOVA), considerando $p < 0,05$. O tratamento tópico com o GW9508 em camundongos não diabéticos aumenta a velocidade de cicatrização de feridas nos dias 6 e 8 pós-lesão, enquanto em camundongos induzidos ao diabetes esse efeito não foi observado. Durante a fase proliferativa, o tratamento com GW9508 diminuiu a expressão gênica de f480, il-1 β , mmp9 e vegf quando comparado ao veículo. O tratamento não modificou quantitativamente a deposição de fibras de colágeno, mas foi capaz de alterar a morfologia do tecido conjuntivo,

apresentando derme mais entrelaçada pelas fibras de colágeno e formação de papilas dérmicas, o que torna o tecido cicatricial mais resistente e mais próximo à pele íntegra. Com base nos resultados de Guerrero-Juarez e colaboradores (2019), a reanálise de dados de sequenciamento de RNA de célula única do tecido da ferida mostrou 20 aglomerados de células organizadas principalmente em 4 linhagens, a saber: fibroblastos, miofibroblastos, células mielóides e células endoteliais. Os genes modulados pelo tratamento são expressos por grupos celulares de fibroblastos e células de origem mielóide importantes no processo de cicatrização. Nosso estudo mostrou que o tratamento tópico com GW9508 aumenta a velocidade de cicatrização da ferida em camundongos saudáveis, mas não em camundongos diabéticos. Na fase proliferativa o tratamento com GW9508 modula negativamente genes inflamatórios expressos por fibroblastos e células mielóides resultando em um tecido estruturalmente mais semelhante à pele íntegra quando comparado ao controle. Estudos futuros poderão colaborar para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno e para a identificação da melhor forma de emprego destes agonistas.

Palavras-chaves: DECs: Cicatrização; Ácidos Graxos; Inflamação.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Inovação no Cuidado em Enfermagem e Saúde

Abstract

Worldwide progression of diabetes and the complications associated with hyperglycemia accentuate occurrence of chronic wounds that result in amputation. Novel approaches for new technologies in the treatment of these lesions are very desirable. GPR120 and GPR40 receptors are potential therapeutic targets in the treatment of metabolic disorders owing to their anti-inflammatory effects and stimulation of cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the effect of GW9508, a dual agonist of GPR120 and GPR40 receptors, on wound healing in an experimental model. We used C57 / BL6J streptozotocin-induced diabetic and non-diabetic mice subjected to two 6 mm excision wounds in the dorsal region. Skin retraction was stabilized with silicone prosthesis. After randomization, the animals received topical treatment once a day with 20 μ L of carbopol gel incorporated with vehicle (ethyl alcohol) or GW9508 (100 μ M) until tissue extraction on the 5th and 12th day after injury. The groups were compared for wound retraction, scar tissue morphology and qRT-PCR gene expression. For statistical analysis we applied Student's t-test on independent samples and for more than two variables, analysis of variance (ANOVA), considering $p < 0.05$. Topical treatment with GW9508 in non-diabetic mice modulates wound healing on days 6 and 8 post-injury, whereas in diabetes-induced mice this effect was not observed. During proliferative phase, GW9508 treatment decreased the α 480, il-1 β , mmp9 and vegf expression. This treatment was not able to modify quantitatively the deposition of collagen fibers, however it was able to alter the morphology of the connective tissue, presenting a dermis more intertwined by collagen fibers and formation of dermal papillae, characterizing most resistant scar tissue, close to the intact skin. As in the studies by

Guerrero-Juarez et al (2019), the reanalysis of wound single cell RNA sequencing, was described 20 cell clusters organized into four strains composed of fibroblasts, myofibroblasts, myeloid cells, and endothelial cells. Topical treatment with GW9508 modulated genes showed to be expressed in fibroblast cell clusters and cells of myeloid origin. Our study showed that topical treatment with GW9508 improves wound healing in non-diabetic mice, but not in diabetic mice, although negatively modulating of inflammatory genes in the proliferative phase, expressed by fibroblasts and myeloid cells resulting in a tissue structurally similar to regenerated skin. Future studies may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in this phenomenon and to identify the best way for using these agonists.

Key words: Wound healing; G-protein coupled receptor 120/40; fatty acids; inflammation;

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da pele e funções relacionadas.....	19
Figura 2. Estrutura celular da pele.....	20
Figura 3. Vias de sinalização celular dos recptores GPR120 e GPR40.....	25

Lista de Abreviaturas e Siglas

μM	Micromolar
AKT	Proteína Quinase B
α-SMA	Actina A (G ou F???) do Músculo Liso
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
Ca ⁺⁺	Íon Cálcio
CCL5	Motivo Ligante de Quimiocina 5
CXCL10	Motivo Ligante de Quimiocina 10
CCL17	Motivo Ligante de Quimiocina 17
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CREB	Proteína Ligada ao Elemento Responsivo ao AMP cíclico (Elemento ou proteína ligante responsivo(a) ao AMP cíclico)
DHA	Ácido Graxo Insaturado Docosahexaenóico
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECM	Matriz Extracelular
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPCs	Células Progenitoras Endoteliais
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular (extracellular signal-regulated kinases)
ETOH	Álcool Etilico
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FFAR1	Receptor de Ácido Graxo Livre 1
FFAR4	Receptor de Ácido Graxo Livre 4
F4/80	Módulo Semelhante à EGF Contendo Hormônio Tipo Mucina Semelhante ao Receptor 1, do inglês <i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
GPR 40	Receptor Acoplado a Proteína G 40
GPR120	Receptor Acoplado a Proteína G 120
IFN-g	Interferon Gama

IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
GRB2	Proteína Ligante do Receptor Para Fator de Crescimento
GSK3	Glicogênio Sintase Quinase 3
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1	Fator induzido por hipóxia-1
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IκB	Inibidor de Kapa B
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-24	Interleucina 24
IMC	Índice de Massa Corpórea
IR	Receptor de Insulina
IRS-1	Substrato 1 do Receptor de Insulina
IRS-2	Substrato 2 do Receptor de Insulina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
MAPK	Quinase Ativadora da Atividade Mitogênica
MCP1	Proteína Quimiotática Monocítica 1
MEC	Matriz Extracelular
MMP-1	Metaloproteinase 1
MMP-2	Metaloproteinase 2
Mmp9	Metaloproetinase 9
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3 Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PKB	Proteína Quinase B
RNA _m	Mensageiro do Ácido Ribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico

SDF-1 α	Célula Estromal Derivada do Fator 1 Alfa
TAB-1	Quinase Beta Ativada
TAK-1	Quinase Kappa AtivadaTIMP-2 Inibidores de Metaloproteinase 2
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- α	Fator de Crescimento Transformador Alfa
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
Lista de Abreviaturas e Siglas	13
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVO GERAL	27
Objetivos Específicos	27
MÉTODOS	27
Tipo de Estudo	27
Animais	27
Indução do Diabetes	28
Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina (ipITT)	28
Confecção das Feridas	28
Tratamento	29
Documentação e avaliação do tecido cicatricial	30
Coleta de Tecidos	30
Extração de RNA	31
qRT- PCR - PCR quantitativo em tempo real	32
Microscopia Óptica	32
Análise de sequenciamento de RNA de célula única (scRNAseq)	33
Análises Estatísticas e Apresentação dos Dados	34
Aspectos Éticos	34
Financiamento	34
RESULTADOS	34
Introduction	36
Methods	37
Experimental Animals	37

Diabetes induction	38
Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ipITT)	38
Excisional wound	38
Treatment	38
Photo documentation and macroscopic wound size measurement	39
Microscopy	39
RNA Extraction	39
Real-time PCR	40
Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) analysis	40
Results	41
Discussion	50
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	62

INTRODUÇÃO

O diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia, decorrente de falhas na produção e/ou utilização da insulina no organismo. Dados na Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam o número crescente de casos da doença e as consequências à saúde e à qualidade de vida. A prevalência mundial de diabetes sofreu um aumento espantoso nas últimas décadas passando de 4,7 % em 1980 para 8,5 % em 2014. Um a cada onze indivíduos no mundo é diabético, isso representa 422 milhões de pessoas no mundo (1).

A hiperglicemia constante resulta em alterações na fisiologia de órgãos e sistemas importantes, como rins, sistema circulatório, e reposta imune, tornando o diabetes a causa principal de retinopatias, infartos, acidentes vascular cerebral, infecções, alterações na pele, feridas crônicas, e amputações (1,2). Em 2016, 1,6 milhão de mortes foi causada por complicações do diabetes (1).

A pele tem por função principal a proteção do organismo contra agressões do meio externo. Ela protege a pessoa contra traumas, infecção por patógenos, perda de água, radiação solar ultravioleta, assim como participa no controle do equilíbrio térmico, fluxo sanguíneo, além das funções sensoriais e do reflexo da imagem corporal do indivíduo (3,4) (Figura 1).

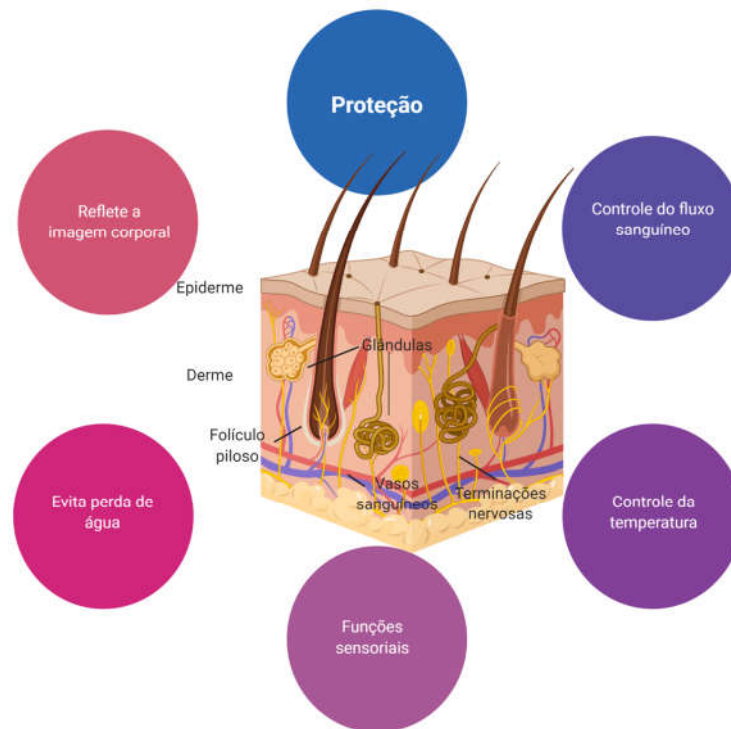


Figura 1. Estrutura da pele e funções relacionadas.

Existe na superfície da pele uma microbiota, que age como barreira mecânica e antimicrobiana, capaz de proteger o corpo contra invasão de microrganismos patogênicos. Cinco camadas de estratos conferem à epiderme robustez e força (5,6).

A proteção contra atrito e perda de água é feita pelo estrato córneo, uma camada de células mortas, achatadas, preenchidas com a proteína queratina. Em algumas regiões do corpo, há abaixo desta camada, células mortas embaladas com elementos lipídicos, chamadas de estrato lúcido. Queratinócitos maduros constituem o estrato granuloso, o qual torna a pele impermeável. O estrato granuloso se origina da migração de células do estrato espinhoso, que é formado por queratinócitos produtores de queratina, e células imunes chamadas células de *Langerhans*, as quais informam o sistema imunológico sobre microrganismos invasores. Na região mais profunda da epiderme se encontra a camada basal, que contém células em divisão contínua e são capazes de

empurrar as células mais velhas para cima. Nessa camada estão os melanócitos, que controlam a pigmentação da pele (3,6).

Subjacente a epiderme está a derme que fornece, através do colágeno e elastina, suporte e elasticidade à pele. Há também nessa camada, um sistema de proteção contra microrganismos e substâncias tóxicas, composto por quatro tipos de células imunológicas: i) mastócitos, células que identificam espécies patogênicas e em seguida liberam sinais químicos para atrair outras células do sistema imunológico; ii) linfócitos T, glóbulos brancos com memória celular para microorganismos; iii) células dendríticas apresentadoras de patógenos e iv) macrófagos capazes de eliminar detritos celulares (6) (Figura 2).

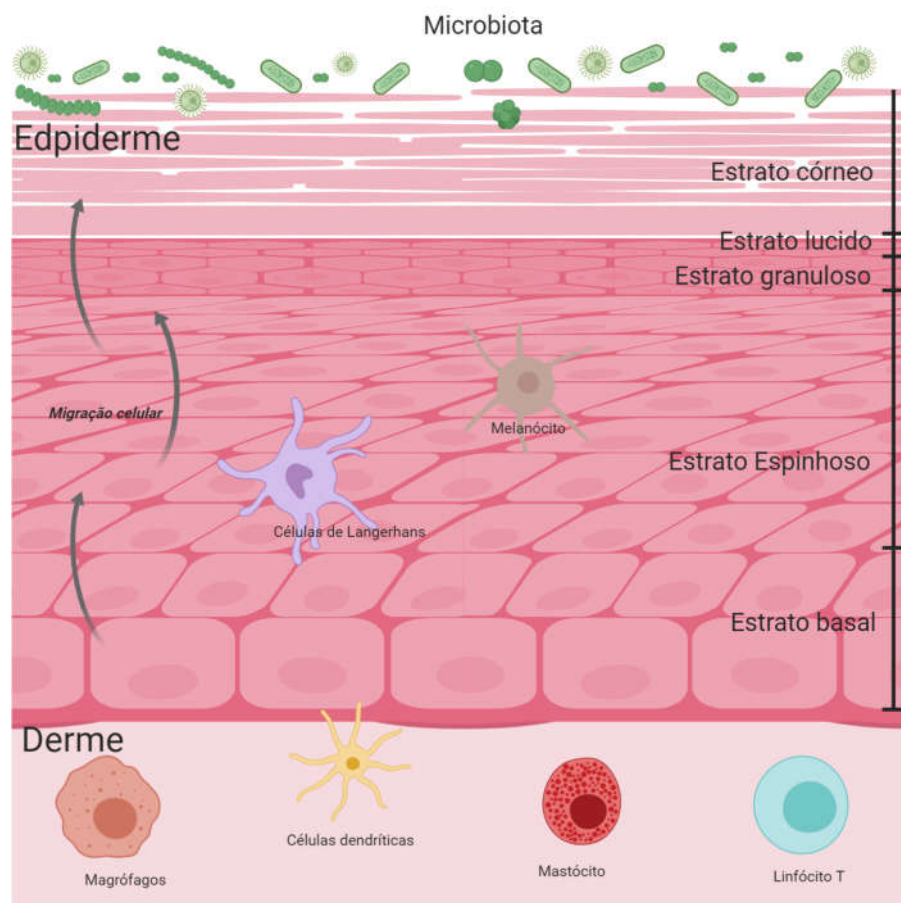


Figura 2. Estrutura celular da pele

Essa estrutura de superproteção pode ser desfeita por diversas doenças e feridas agudas e crônicas. Devido à sua visibilidade as lesões cutâneas repercutem em efeitos não apenas físicos, mas também, psicológicos (6).

A perda da integridade cutânea desencadeia um processo fisiológico bastante complexo, denominado cicatrização. Plaquetas, células polimorfonucleares, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais atuam no local da lesão, estimulando a produção de citocinas, quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento. O processo fisiológico é constituído por fases que se sobrepõem e são divididas didaticamente em: inflamação, proliferação celular e remodelamento do tecido (4,7,8).

As plaquetas agregadas formam um tampão de fibrina e fibronectina que proporciona proteção a área lesada, estanca o sangramento e secreta citocinas e fatores de crescimento capazes de promover vasodilatação e consequente aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos próximos à ferida, o que permite a quimioatração e migração de leucócitos, monócitos e macrófagos iniciando assim a fase inflamatória (4,9,10).

As plaquetas agregadas por fibrina constituem uma matriz provisória no leito da ferida, que posteriormente recrutará células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos para o local da lesão. Com a chegada dessas células ao leito da ferida inicia-se a fase proliferativa. Dentre as substâncias mais importantes secretadas nesse momento podemos destacar os mediadores do processo de cicatrização, o Fator de Crescimento Transformador- α e β (TGF- α e TGF- β), o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), os quais são responsáveis pela formação da nova Matriz Extracelular (MEC) e de vasos sanguíneos que atraem e ativam fibroblastos que estão nas bordas da lesão. Os fibroblastos são capazes de secretar Interleucina-1 (IL-1), e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I). Em conjunto estes atores moleculares dão início a fase proliferativa (11–14).

A intensa atividade de migração e divisão celular leva ao surgimento de uma barreira de permeabilidade no tecido recém formado ocorrendo o

estabelecimento do fornecimento adequado de sangue (angiogênese) e o reforço do tecido cutâneo lesado (fibroplasia), denominado reepitelização (7).

Nesta fase os fibroblastos iniciam uma síntese intensa das fibras de colágeno tipo I e em seguida colágeno tipo II, que no final será degradado por Metaloproteinases (MMP) e resultará em colágeno maduro do tipo III. Simultaneamente ocorre também, a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos o qual proporciona a contração da nova MEC reduzindo o tamanho da lesão e formando uma cicatriz menor que a ferida inicial (7,15).

Na ausência de comorbidades, o processo fisiológico de cicatrização ocorre no período de uma a duas semanas. Porém, pacientes diabéticos apresentam maior susceptibilidade a ulceração e maior tempo de cicatrização. A fisiopatologia de feridas associadas ao diabetes envolve a presença de neuropatia, vasculopatia com consequente isquemia tissular, alterações ósseas e de tendões facilitando, portanto, complicações e infecções(16).

Alterações metabólicas relacionadas à hiperglicemia afetam diretamente a cicatrização (17). O acúmulo sistêmico dos Produtos Finais de Glicação Avançada, do inglês AGE, induz ao estresse oxidativo, prejudica as funções celulares, aumenta a inflamação e a rigidez da MEC. O estado inflamatório crônico de baixo grau associado às disfunções circulatórias geram má perfusão de oxigênio o que torna a cicatrização mais lenta (9,18–21).

Essas lesões crônicas em pacientes diabéticos representam risco de amputação e morte. Aproximadamente 20% das internações de indivíduos com DM são decorrentes de complicações do pé diabético, e são responsáveis por cerca de 85% das amputações não traumáticas (22).

Tais desfechos mobilizam pesquisas sobre a cicatrização de feridas diabéticas, a fim de complementarem as recomendações terapêuticas atuais, que basicamente são as de desbridamento, manutenção do leito úmido, controle da infecção no leito da ferida, em conjunto com alívio de pressão e revascularização do local atingido. As futuras estratégias de tratamento incluem terapias baseadas em células-tronco, entrega de fatores de crescimento codificadores de genes, aplicação de análogos de receptores de angiotensina e

neuropeptídeos, assim como, inibição de citocinas inflamatórias e ativação de vias de sinalização envolvendo componentes expressos em células cicatriciais (17,23).

A membrana celular de todas as células é composta basicamente por fosfolipídios. Esses ácidos graxos desempenham funções cruciais na integridade estrutural e funcionalidade da pele, na medida em que atuam como mediadores bioativos capazes de modificar a sinalização celular (11,12).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas e de acordo com suas características químicas e o tamanho da cadeia estrutural, são classificados em ácidos graxos de cadeia curta, média ou longa, saturados ou insaturados. Os insaturados são aqueles que apresentam pelo menos uma dupla ligação entre carbonos enquanto os saturados não apresentam dupla ligação. Ácidos graxos de cadeia longa de carbono são sólidos à temperatura ambiente, enquanto, os de cadeia curta (menos de quatorze carbonos) se apresentam em estado líquido nesta condição (3,24).

Estudos anteriores demonstraram que no processo de reparo tecidual os ácidos graxos insaturados (linoléico e oléico) estão envolvidos na redução da resposta inflamatória crônica, mediada por TNF- α , e exercem antagonismo sobre fatores pró-inflamatórios contribuindo assim para a modulação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Eles também são relevantes no processo de cicatrização de feridas, especificamente nos eventos de proliferação e diferenciação celular, angiogênese e síntese da MEC (11–14).

Um estudo mostrou o mecanismo por meio do qual os ácidos graxos insaturados desempenham suas funções. Os pesquisadores descreveram receptores específicos para os ácidos graxos insaturados conhecidos como Receptor Acoplado a Proteína G 120 (GPR120) também chamado de FFAR-4, do inglês Free Fatty Acids Receptor – 4 (25).

Atualmente, são conhecidos dezenas de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRs). Estes receptores pertencem à família das rodopsinas e são caracterizados por possuírem 7 α -hélices que atravessam a membrana celular. Estes receptores são capazes de ativar proteínas G heterotriméricas

ocasionando a ativação e a liberação de suas subunidades desencadeando assim uma cascata de sinalização intracelular (25).

Os receptores GPR120 ou FFAR-4 desempenham suas atividades por um mecanismo - diferente do clássico - ainda pouco conhecido para outros receptores dessa família, como o GPR40 ou FFAR-1. A ativação dos receptores GPR120 e FFAR4 está relacionada à melhora da sensibilidade sistêmica à insulina, associada a um aumento na função hepática e muscular, através da estimulação da secreção de GLP-1. A estimulação de GPR120 também diminui a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e reduz a expressão de genes inflamatórios (25–29).

A sinalização do FFAR-4 é dependente da proteína β -arrestina-2. Assim, a ligação de um agonista ativa o FFAR-4 promovendo a associação da β -arrestina-2 ao receptor. Em seguida, ocorre a internalização do complexo FFAR-4/ β -arrestina-2. No citoplasma a β -arrestina-2 pode ligar-se a proteína TAB1, bloqueando a associação da TAB-1 com a TAK-1 e, conseqüentemente a ativação da TAK-1. A ausência da ativação desta proteína impede a transdução de sinais nas vias inflamatórias do IKK/I κ B/NF κ B e da JNK, bloqueando, assim, o desenvolvimento da inflamação (25) (Figura 3).

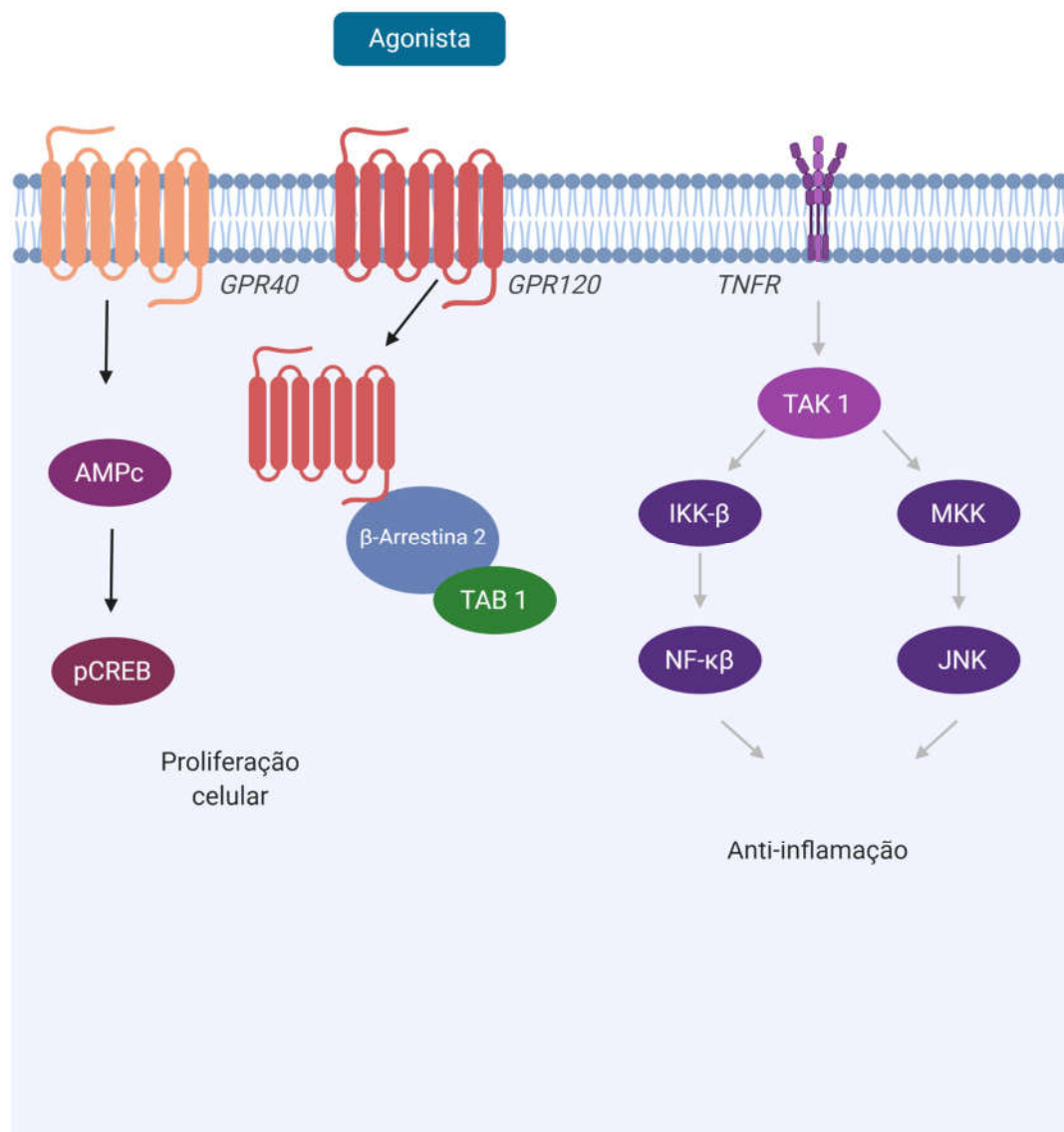


Figura 3. Vias de sinalização celular dos receptores GPR120 e GPR40.

Embora os mecanismos de ação de FFAR-1 sejam menos compreendidos do que aqueles do FFAR-4, estudos mostraram que a indução de mobilização de Ca^{++} e ativação da Proteína ou Elemento Ligante Responsivo ao AMP cíclico, do inglês CREB, podem desempenhar funções importantes nesse mecanismo (30) (Figura 3).

Estudos recentes destacam o potencial terapêutico dos receptores FFA4/GPR120, especificamente direcionados ao DM2. Há um progresso na

identificação e caracterização de ligantes agonistas de FFA4/GPR120 que, devido a seu importante efeito anti-inflamatório, geraram patentes (31).

O primeiro agonista sintético de FFA1/GPR40 descrito, GW9508 (ácido 4-[[[(3-fenoxifenil) metil] amino] benzenopropanóico), apresenta resultados metabólicos efetivo em receptores FFAR4/GPR120 e foi utilizado em estudos *in vivo* e *in vitro* (31–33). Animais obesos, que apresentavam inflamação crônica, quando tratados com essa molécula exibiram redução do fenótipo inflamatório, indicando que esses receptores poderiam ser alvos para o tratamento de distúrbios associados à inflamação (26). A expressão desses receptores nos pulmões e células endoteliais indicam o potencial terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias nas vias aéreas (31,34).

A participação dessas vias de sinalização na resposta imune que ocorre no tecido epitelial, no entanto, é pouco definida. Em 2011 um estudo definiu a ação de imunoativação de queratinócitos cultivados *in vitro* e a reação imune na pele *in vivo*, através da ativação de GPCRs. Após a ativação de células HaCaT por TNF- α e Interferon Gama (IFN-g), o GW9508 foi capaz de inibir a expressão de CCL5, CXCL10 CCL17, IL-11, IL-24 e IL-3 esse efeito foi anulado pela depleção de GPR40 com RNA de interferência. A administração tópica de GW9508 à pele suprimiu a inflamação alérgica (35).

Em 2016, um trabalho do nosso grupo demonstrou que o GPR120 também está expresso nas feridas cutâneas e que o tratamento tópico com o ácido graxo insaturado docosahexaenóico (DHA) em roedores não diabéticos leva a uma cicatrização mais rápida provavelmente por meio da ativação desse receptor (36).

Esses estudos abriram novas perspectivas para o potencial terapêutico dos agonistas sintéticos dos GPCRs na cicatrização.

Com base no contexto descrito anteriormente aventamos a hipótese de que a ativação dos receptores GPR120/40 pelo agonista seletivo GW9508 poderia diminuir o processo inflamatório em feridas crônicas além de modular a expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, angiogênese e

síntese da MEC melhorando assim a cicatrização de feridas em animais diabéticos.

A importância de identificarmos novos tratamentos para a cicatrização de feridas crônicas como as que apresentam os indivíduos com diabetes é de extrema importância no cuidado e tratamento humano, devido ao número crescente dessa doença em todo o planeta.

OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento tópico com o agonista seletivo do GPR120/40 na cicatrização de feridas em camundongos diabéticos.

Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o modelo de diabetes induzido por doses baixas de estreptozotocina;
- ✓ Determinar o tempo de cicatrização e avaliar a retração e a morfologia das feridas cutâneas após tratamento tópico com GW9508;
- ✓ Avaliar a modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas no processo de cicatrização;
- ✓ Identificar, através da bioinformática, as proteínas protagonistas no processo de diferenciação de células e que estão associadas à cicatrização.

MÉTODOS

Tipo de Estudo

Trata-se de estudo pré-clínico conduzido em modelo animal de diabetes induzida por estreptozotocina.

Animais

Em todos os estudos foram utilizados camundongos machos C57BL/6J adultos. Estes animais, recebidos com 6 semanas de vida, foram provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em caixas individuais, com ração padrão para roedores (Purina) e água *ad libitum*, sob condição padronizada de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Indução do Diabetes

Quando os camundongos atingiram 8 semanas de idade eles foram induzidos ao diabetes com injeção intraperitoneal de estreptozotocina na concentração 50 mg/kg (diluída em tampão de citrato de sódio com pH 4,5) em doses diárias, durante 5 dias, sempre após jejum de 4 horas.

Após 4 semanas da indução foi realizada a glicemia capilar e então, foram considerados hiperglicêmicos e, portanto, aptos para a inclusão no estudo os animais que obtiveram glicemia ≥ 250 mg/dL. Os animais com glicemia ≤ 250 mg/dL receberam a 6ª dose de estreptozotocina nas mesmas condições que as anteriores e quando constatada glicemia ≥ 250 mg/dL, eles foram incluídos, conforme protocolo (37).

Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina (ipITT)

Após 4 semanas da indução do diabetes foi realizado também um ipITT. Os camundongos foram submetidos a um jejum de 6h. As concentrações de glicose no sangue foram medidas com um glicosímetro portátil Optium™ mini (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, EUA) e tiras apropriadas. A glicose sanguínea foi medida nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de insulina intraperitoneal (1,5 UI / kg de peso corporal). A análise da área sob a curva para o decaimento da glicose ao longo do tempo demonstrou a tolerância à insulina encontrada nos diferentes grupos.

Confecção das Feridas

Após completarem 12 semanas de vida, os animais tiveram duas feridas excisionais confeccionadas no dorso (38). Para todos os procedimentos dolorosos, foi administrado anestesia geral, por aplicação intraperitoneal de 100 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilazina. Foi realizada a tricotomia 24 horas antes do procedimento cirúrgico com uso de creme removedor de pelo Veet® (peles normais), aplicado no dorso do camundongo por cinco minutos, o excesso do produto foi removido com água e gaze. No dia da confecção das feridas foi realizada antisepsia da região com clorexidine tensoativa 0,2%, soro fisiológico e clorexidine alcoólica 0,1% aplicados com

gaze. A ferida foi realizada com o uso de *punch* metálico de 6 mm, com lâmina cortante na borda. O local foi delimitado objetivando o centro da região dorsal dos animais. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a pele fixada com prendedor plástico. Foram retiradas a pele e a tela subcutânea até exposição da fáscia muscular. Imediatamente após o procedimento e após 12 horas, os animais receberam analgesia com Tramadol (5mg/kg) via intraperitoneal diluído em volume de 200 µL de soro fisiológico. Para verificar a contração fisiológica da ferida, esta foi estabilizada por fixação com sutura de próteses de silicone em anel de 8 mm interno e 10 mm externos, filme transparente *Tegaderm*® e fita adesiva conforme protocolo de modelo de feridas crônicas (38). Os animais foram mantidos em superfície aquecida por 20 min e em seguida retornaram as gaiolas individuais. Eles foram observados ainda quanto a ingestão de líquidos, temperatura corporal e sinais de dor.

Tratamento

Imediatamente após a realização da ferida, os animais foram distribuídos de forma aleatória entre quatro grupos experimentais: 1- animais não diabéticos tratados com veículo; 2- animais não diabéticos tratados com GW9508; 3- animais diabéticos tratados com veículo e 4- animais diabéticos tratados com GW9508. As feridas foram tratadas, imediatamente após a lesão, com um volume de 20µl das soluções (veículo ou GW9508), uma vez ao dia, até o dia da extração do tecido.

O grupo controle (veículo) foi tratado com gel de carbopol mais ETOH (diluyente do agonista); e o grupo GW9508 foi tratado com uma mistura homogênea de gel de carbopol e GW9508 reconstituído em álcool incorporado nas concentrações de 10 µM; 30 µM; 100 µM ou 1000 µM (39). As concentrações foram determinadas por revisão da literatura em artigos nos quais foram obtido o p_{50} do agonista e realizados ensaios experimentais com aplicação injetável e tópica do produto (35,40).

O agonista GW9508 foi adquirido da CAYMAN CHEMICAL COMPANY® numa concentração de 1.0 mM e em seguida foi reconstituído em ETOH e armazenado conforme *datasheet*.

Documentação e avaliação do tecido cicatricial

O processo de cicatrização foi avaliado por meio de fotografias tiradas com câmera digital Sony Cyber Shot® (modelo DSC-S950S 10MP 4 x Optical zoom) utilizando tripé apropriado para manter a distância da ocular e do animal em 15 cm para todas as imagens. As fotografias foram realizadas pelo mesmo avaliador, iniciando 96 horas após a cirurgia e a cada 48h até o dia de extração dos tecidos ou o fechamento completo de todas as lesões. Para capturar as imagens sem induzir o estresse, os animais foram submetidos à narcose com 10µL de Isoflurano® (BioChimico) embebido em gaze e acondicionados em caixa de acrílico e mantidos em câmara plástica, adaptadas para esse fim. O padrão respiratório e movimentos cardíacos foram avaliados.

As imagens digitais armazenadas tiveram a área da ferida mensurada por meio da utilização do software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD), mediante padronização da escala de medida. Os valores obtidos foram exportados para tabela *Excel*®. O padrão para determinação da área da ferida foi a escala de cor, sempre realizada pelo mesmo avaliador treinado para este fim e cegado quanto ao tratamento (animal identificado apenas pelo número).

O fechamento da ferida foi expresso em porcentagem (%), calculada pela seguinte fórmula matemática: $(\text{área final}) - (\text{área diária} \times 100) / (\text{área inicial})$.

Coleta de Tecidos

Após a verificação do tempo de fechamento das feridas foram realizados outros grupos experimentais nos quais os tecidos foram extraídos nos dias 5 e 14 após o início do tratamento. O material foi armazenado de acordo com protocolo de técnicas laboratoriais para cada análise.

Para a coleta dos tecidos, os animais foram anestesiados com 100 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilazina, via intraperitoneal. Depois de cessados reflexos de dor e corneanos, os animais foram colocados em decúbito ventral e foi retirada a região da ferida com o auxílio de uma pinça do tipo dente de rato e tesoura pequena de ponta fina para remoção da área demarcada. Após

extração foram submetidos a eutanásia humanitária, por aprofundamento da anestesia com injeção intraperitoneal de 300 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina e 30 mg/Kg de Xilazina e posterior deslocamento cervical.

Diariamente, durante o período experimental, os animais foram observados quanto à: atividade motora, aceitação alimentar e de água, aspectos da ferida presença/ausência de secreção ou corpos estranhos, fixação da prótese de silicone e óbito. As feridas foram limpas com irrigação de soro fisiológico 0,9 %. Os dados foram registrados em protocolo individual e caderno de laboratório até o dia da eutanásia.

Extração de RNA

As amostras foram homogeneizadas em reagente de TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 30 s usando um homogeneizador de tecidos (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) na velocidade máxima. Em seguida foram centrifugadas a 6.000 g, e o conteúdo total de RNA foi isolado de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A síntese de cDNA foi realizada com 2 µg do total de RNA usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

A expressão gênica foi analisada através de PCR quantitativo em Tempo Real usando o sistema gênico (SABioscience). Foram usados os oligonucleotídeos gene-específicos para as proteínas abaixo discriminadas, sintetizadas pelo fabricante (Applied Biosystems): IL-1 β (Mm00434228_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), IL-10 (Mm01288386_m1), TNF- α (Mm00443258_m1), F480 (Mm00802529), SDF-1 (Mm00445553_m1), GPR40 (Mm00809442) and GPR120 (Mm00725193); e IDT DNA Technology: α -SMA (Mm157808773), FGF-1 (Mm.PT.56a.41158563), IGF-1 (Mm.PT.58.5811533), ITG α -5 (Mm164148797), SOX-2 (Mm.PT.58.12958650 .g), TGF-1 β (Mm.PT.58.43.479940), VEGF- α (Mm. PT.58.14200306).

Os dados foram analisados usando o sistema PCR Data Analysis Software (Excel & Web based) (SABiosciences).

qRT- PCR - PCR quantitativo em tempo real

Alíquotas de 5,0 ng de RNA foram submetidas à transcrição reversa utilizando-se primers hexaméricos randômicos e Superscrit Maloney MLV transcriptase reversa. A avaliação de resultados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene GAPDH (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2 x, 0,625 µL da solução de primers e sonda, 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem foram: 50° C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems).

Microscopia Óptica

Após dissecação, os tecidos de pele fixados por imersão em formaldeído foram processados com álcool em concentrações crescentes (70 %, 80 %, 95 % e 100 %), xilol e parafina, incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm com o auxílio de um micrótomo e fixados em lâminas de microscopia previamente tratadas com poli-l-lisina. Para a avaliação da morfologia celular na cicatrização os cortes foram corados com a técnica de hematoxilina e eosina. Os cortes foram incubados 30 segundos com hematoxilina, passados em água destilada e incubados por mais 30 segundos com eosina, seguidos de nova passagem em água destilada e desidratação. As

lâminas foram montadas com *Entellan*® e a seguir analisados e a imagem digital captada em microscopia de transmissão óptica.

Para avaliar as fibras colágenas, foi realizada a coloração com Picrosirius red, sendo processados cortes de 5,0 µm em 100 % de xilol seguido pela hidratação progressiva em 100, 95 e 70 % de etanol. Os cortes foram incubados em 0,1 % de sirius red (EasyPath, Brasil) por 1h, enxaguados em água e incubados em hematoxilina de Carazzi por 4 min em temperatura ambiente. Os padrões de birrefringência foram examinados em microscópio Zeiss West Germany-Axiophot equipado com filtros polarizados C-PL. Por meio do software TrueChrome Metrics® as imagens foram captadas. A coloração e a distribuição das fibras de colágeno foram analisadas com o software Ollympus Cell Suns®, utilizando o espectro de cores entre verde-claro (tipo III como colágeno) e vermelho (tipo I como colágeno).

Análise de sequenciamento de RNA de célula única (scRNAseq)

Os dados das contagens brutas de Guerrero-Juarez e cols foram obtidos do Sequence Read Archive (SRA)(41). Este arquivo é parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC), com colaboração da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), do *European Bioinformatics Institute* (EBI), e do *DNA Data Bank* do Japão (DDBJ).

Após a coleta, os dados foram pré-processados e analisados em Seurat v3 (Butler et al, 2018) para controle de qualidade. Foram analisados o número de genes expressos, o número de contagens e a fração mitocondrial. Esses limites foram definidos para 300-2500, 800-6000 e 0-0,06.

Células dentro de métricas de qualidade de limiar desejado foram então incorporadas em um layout direcionado à força de k vizinhos mais próximos, como descrito anteriormente por Weinreb et al, 2017. Genes expressos em pelo menos 10 células e com pelo menos 10 contagens foram mantidos para análises posteriores. Os genes também foram filtrados por percentil de variabilidade (80 %). O número de PCs foi estabelecido em 90, k para 2 vizinhos mais próximos e o número de iterações de layout de força para 1000. No total, 21516 células e 312 genes foram usados para construir o gráfico de MOLA.

Análises Estatísticas e Apresentação dos Dados

Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão da média. Para a análise estatística, inicialmente aplicamos o teste de Levene para verificar as homogeneidades das variâncias. Para amostras independentes, aplicamos o teste t de *Student* e para mais de duas variáveis utilizamos análise de variância (ANOVA) e quando necessário teste de Tukey para comparação múltipla de médias. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5 % ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando os programas *Statistic for Windows*, versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) e *GraphPad Prism*, (GraphPad Software Inc, OSB Software, SP)

Aspectos Éticos

De acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, no inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, este projeto foi realizado mediante aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Uso Animal em Pesquisa (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – IB/UNICAMP. Aprovação sob o protocolo nº 4637-1/2017 com vigência no período de 01/09/2017 a 10/08/2019.

Todos os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios éticos e procedimentos de cuidado com o uso de animais experimentais de acordo com as diretrizes estabelecidas pelos órgãos supracitados.

Financiamento

Este projeto recebeu apoio financeiro da CAPES e da FAPESP, projeto CEPID/OCRC nº 2013/07607-8.

RESULTADOS

Os resultados desta Dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “A specific receptor agonist of Free Fatty Acid Receptor 4 modulates proteins and growth factor during wound healing in mice”.

Free Fatty Acid Receptor Agonist Modulates Protein and Growth Factor during Wound Healing in Mice

Thaís Paulino do Prado ^{1,2}, Carlos Poblete Jara ^{1,2}, Vanessa Cristina Dias Bóbbo ^{1,2}, Rodrigo Scarpari Carraro, Davi Sidarta Vitória Rodrigues de Oliveira ², Lício Augusto Velloso ², Eliana Pereira de Araujo ^{1,2}

School of Nursing, University of Campinas, Brazil ¹

Laboratory Cell Signaling, Obesity and Comorbidities Research Centre, University of Campinas, Brazil ²

Abstract

Background: The diabetes and its complications justify studies of new technologies for treatment of chronic wounds. Among possible therapeutic targets are signaling pathway proteins that involve Free Fat Acids receptors-4 and 1. Described as anti-inflammatory, they act on various organs; therefore synthetic agonists as a GW9508 have been developed in order to potentiate their effects.

Objective: To evaluate the effect of GW9508 on wound healing in healthy and diabetic mice.

Methods: Two 6 mm excision wounds were made in healthy and streptozotocin-induced diabetic C57/BL6J mice. The wound retraction was stabilized with prosthesis and treated topically with GW 100µM once a day until tissue extraction, that occurred on days 5 and 12 after injury. The wounds were analyzed by IMAGE J and the tissues by histology and real time PCR. In addition, we evaluated RNA sequencing published data by bioinformatics to determine in which cell clusters the genes involved in healing belong.

Results: GW9508 treatment showed that in healthy mice there were significant healing increase rates on days 6 and 8 post-injury, while in diabetic mice these effects were not observed, although there was negative genes modulation of f4/80, mmp-9, vegf and il-1β. The GW9508 altered tissue morphology in diabetic mice with the formation of dermal papillae when compared with vehicle. Bioinformatics evaluation shows that genes modulate during the GW9508 treatment were belongs to myeloid cells clusters mainly.

Conclusion: GW9508 modulates scar tissue morphology making it closer to intact tissue in diabetic animal wounds.

Key words: Wound healing; Free Fat Acids Receptor 1/4; fatty acids; inflammation;

Introduction

Diabetes is a metabolic disease mainly characterized by chronic hyperglycemia [www.who.int/diabetes/global-report]. The prevalence of diabetes has risen dramatically over the past years and becoming a worldwide problem with a great impacting in the health systems. Progression of diabetes has been associated with severe complications in different organs, such as retinopathy, nephropathy, neuropathy and vascular complication[1]. Among these complications are diabetic wounds, in which healing is impaired due to a wide range of factors, including nervous and vascular disorders. Diabetic wounds usually have a poor prognosis, become chronic, commonly developed infection which sometimes leads to amputations [2-6].

Skin has become one of the most intensively studied organs in the last few years. It is the largest organ of the body and the first line of defense against infections and injury. It's composed of two main layers: epidermis and dermis. The epidermis is composed of five stratum, sub layers responsible for continuously rebuilding the skin surface. The dermis is a vascularized tissue underlying the epidermis responsible for its nutritional support, as well as for immune response. In the dermis, mast, T and dendritic cells are responsible for coordinating this response, while macrophages play a role in debris cleaning and wound healing, partly due to its trans-differentiation in cutaneous cells. Therefore, skin repair requires intricate synchronization of different cell type activation and proliferation, a process that may result in either scar or regenerated tissue [7-10].

Scar generation is considered harmful for several skin functions – the tissue is less resistant than the regenerated skin, lacks elasticity and is virtually devoid of appendages. Finding ways to endogenously repair wounded skin is a key topic in the field, especially when it comes to diabetic patients. For this, a possible way is to test substances with therapeutic potential previously described for the treatment of metabolic diseases[7, 11].

Free Fatty Acid Receptor 4 (FFAR4), also known as GPR120, has recently emerged as a potential therapeutic target for several disorders [12, 13]. Recent publications have highlighted the potential use of these receptor agonists in metabolic diseases. However, the expression pattern of FFAR4 suggests that it might play a role in other disorders, such as cancer, lung function and skin wounds. FFAR4 is the well-studied of the FFAR receptors, which are G-protein-coupled receptors (GPCR) responsive to long-chain fatty acids. Intensive research is being conducted in the discovery of the molecular mechanisms underlying FFARs function in health and disease, and in the creation and testing of synthetic agonists [14, 15].

GW9508 is the first synthetic molecule initially described as FFAR1 selective agonists and currently characterized as a double agonist of both FFAR1 and FFAR4. Studies involving GW9508 administration have observed anti-inflammatory results through β -arrestin and TAB-1 association, known Ffar4 downstream signaling molecules [16].

In the present study, we evaluated the skin reepithelialization in healthy and diabetic wounds in mice after treatment with a topical formulation of GW9508 or vehicle. Therefore, we analyzed the formation of scar tissue and reepithelization, as well as genes expression of several proteins involved in healing. Finally, we confirm our results by bioinformatics analysis from published wound healing cellular RNA sequencing data.

Methods

Experimental Animals

All experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Campinas, under the protocol 4637-1/2017. Male mice C57/BL-6J/Unib were maintained in individual cages, in a regimen of 12 h dark and 12 h light cycles, a room temperature of 21°C, and fed with a standard rodent chow and filtered water available ad libitum. Body mass was measured throughout the experimental period.

Diabetes induction

Mice 8-week-old were diabetes induced by streptozotocin, 50 mg/Kg via IP, once a day for 5 consecutive days. Diabetes was confirmed by blood glucose $\geq 250\text{mg/dL}$ after six hours of food deprivation [17].

Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ipITT)

Intraperitoneal Insulin Tolerance Tests (ipITT) were performed on food-deprived (6h) non-anesthetized mice. Blood glucose levels were measured with an OPTIUMTM MINI (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, USA) handheld glucometer and appropriate test strips. Glucose blood levels were assessed 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min following intraperitoneal insulin injection (1,5 UI/kg body weight). Area Under Curve analysis for Glucose decay over time inferred Insulin tolerance.

Excisional wound

Four weeks after diabetes induction, mice were anesthetized by intraperitoneal infusion of KETAMINE/XYLAZINE HYDROCHLORIDE (100mg and 10mg/kg, respectively). Two excisional wounds were made with a 6.0-mm punch in the skin dorsal region. Skin retraction was prevented with rubber prosthetics fixed with four sutures and TEGADERM[®][18]. Mice were post-surgically treated with subcutaneous TRAMADOL HYDROCHLORIDE (5 mg/kg), once 30min after wound excision and then twice more in the following day.

Treatment

Thereafter, mice were randomly assigned to either the vehicle group or GW9508 group. The vehicle group received a topical application containing ETOH absolute and CARBOPOL[®] gel, whereas the GW9508 group received one GW9508 dissolved in ETOH and incorporated in a formulation of CARBOPOL[®] gel. Both groups were treated with 20 μL of the topical application once a day for 12 days, beginning on the day of wound generation.

Photo documentation and macroscopic wound size measurement

Wound area was quantified for each wound using Image J® analysis from days 0, 4, 6, 8, 10 and 12 after surgery with a D3100 Nikon digital camera (NIKON SYSTEMS INC., Tokyo, Japan), using a tripod to assure the same distance from camera to wound in all experiments. These values were normalized by their size on day 0 and then transformed to express wound healing (%) and remaining wound area (%).

Microscopy

Skin samples were dissected and then fixed by immersion in paraformaldehyde, increasing concentrations of ethanol (70, 80, 95, and 100%), followed by xylol and paraffin. Samples were later embedded in paraffin blocks, sectioned at 5.0 µm, and then placed on microscope slides pretreated with poly-L-lysine. Wound sections were stained with hematoxylin and eosin for evaluation of cells and extracellular matrix morphology. The slides were mounted with ENTELLAN® and then analyzed; digital images were captured under bright field microscopy. To evaluate collagen fibers, we performed Picrosirius red staining, 5.0 µm wound sections were processed in 100% xylene, followed by progressive hydration in 100, 95, and 70% ethanol. The sections were incubated in 0.1% Picrosirius red (EASYPATH, Brazil) for 1h, rinsed in water, and incubated in Carazzi's Hematoxylin for 4 min at room temperature. The birefringence patterns were examined by microscopy ZEISS WEST GERMANY- AXIOPHOT equipped with C-PL polarized filters. TRUECHROME METRICS® acquired the images. Collagen fibers staining and distribution was analyzed with the software OLLYMPUS CELL SUNS® using the color spectrum between bright green (type III collagen-like) and red (type I collagen-like).

RNA Extraction

Total wound healing RNA was obtained using 6 mm punches in the scars places. The samples were homogenized in 1mL of Trizol reagent (INVITROGEN, CARLSBAD, CA, USA) and RNA was obtained following manufacturer's protocol. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LIFE TECHNOLOGIES,

CARLSBAD, CA, USA) was used to reverse transcribe two micrograms of total mRNA.

Real-time PCR

PCR reactions was carried out in duplicate in reactions containing 5,0 µl of TAQMAN UNIVERSAL PCR MASTER MIX 2X, 0.25 µl of primers and probe solution, 0,75 µl of water and 4.0 µl of cDNA. The negative control used 4.0 µl of water in place of cDNA. The cycling conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. GAPDH gene (4352339E - APPLIED BIOSYSTEMS) was employed as reference gene. Primers for the target genes were purchased from APPLIED BIOSYSTEMS: IL-1β (Mm00434228_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), IL-10 (Mm01288386_m1), TNF-α (Mm00443258_m1), F480 (Mm00802529), SDF-1 (Mm00445553_m1), GPR40 (Mm00809442) and GPR120 (Mm00725193); and IDT DNA Technology: α-SMA (Mm157808773), FGF-1 (Mm.PT.56a.41158563), IGF-1 (Mm.PT.58.5811533), ITGα-5 (Mm164148797), SOX-2 (Mm.PT.58.12958650.g), TGF-1β (Mm.PT.58.43.479940), VEGF-α (Mm. PT.58.14200306). The relative gene expression values were obtained by analyzing the results in the program 7500 SYSTEM SDS SOFTWARE (APPLIED BIOSYSTEMS).

Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) analysis

Raw counts data from Guerrero-Juarez et al were obtained from SRA[19]. The data was preprocessed and analyzed in Seurat v3 for quality control[20]. We analyzed for number of expressed genes, number of counts and mitochondrial fraction. We set these thresholds to 300-2500, 800-6000 and 0-0.06.

Cells within desired threshold quality metrics were then embedded in a *k-nearest-neighbours* force-directed layout, as previously described by Weinreb et al, 2018[21]. Genes expressed in at least 10 cells and with at least 10 counts were kept for downstream analyses. Genes were also filtered by variability percentile (80%). Number of PCs was set at 90, *k* to 2 nearest neighbors, and

number of force layout iterations to 1000. In total, 21516 cells and 312 genes were used to build the SPRING plot.

Results

Determination of GW9508 concentration and characterization of streptozotocin-induced diabetic mice

Previous studies on wound healing have shown that treatment with DHA an agonist of FFAR1 and 4 has improved the healing quality in healthy rats [22]. Here, we treat healthy and diabetic mice wounds with topical GW9508, which is a synthetic specific double agonist for FFAR1 and FFAR4. However, to assess the dose used in our treatments, first we tested in healthy animals exponentially different doses of GW9508 (10, 100 and 1000 μ M). Concentration of 100 μ M was associated to highest-quality wound healing at days 6 and 8 post wounded. Therefore, the dose of 100 μ M was chosen for further treatments (Fig1 A-B).

Next, we characterize the animal model of streptozotocin (STZ). STZ is classically used to induce a diabetic phenotype in animal models. It works by damaging the beta cells of the pancreas, damaging insulin production, but there is criticism as to the similarity with type 2 diabetes which, in order to present the characteristic complications, requires a longer time of chronicity. Thus, we used lower doses of STZ injection, as previously described as a reliable mechanism to induce diabetic metabolic status without extensive pancreatic damage. Here, we induced a diabetic phenotype in mice by daily injection of low dose of STZ (50mg / kg) for 5 days. Blood glucose was measured 4 weeks later after a 6-hour fasting period. Mean Glycemia was 223.2mg/dL before STZ treatment and 448.5mg/dL after treatment.

Hyperglycemic phenotype was confirmed via ipITT (intraperitoneal Insulin Tolerance Test), in which non-diabetic mice presented with regular insulin sensitivity in response to the insulin injection, while diabetic mice presented with increased insulin resistance. Mean AUC (Area Under Curve) was 153.0 mg/dL/min and 353.4mg/dL/min for the control and the diabetic group, respectively. Furthermore, diabetes induction, wound excision and related metabolic changes were not observed to interfere with weight gain (Fig. 1C-F).

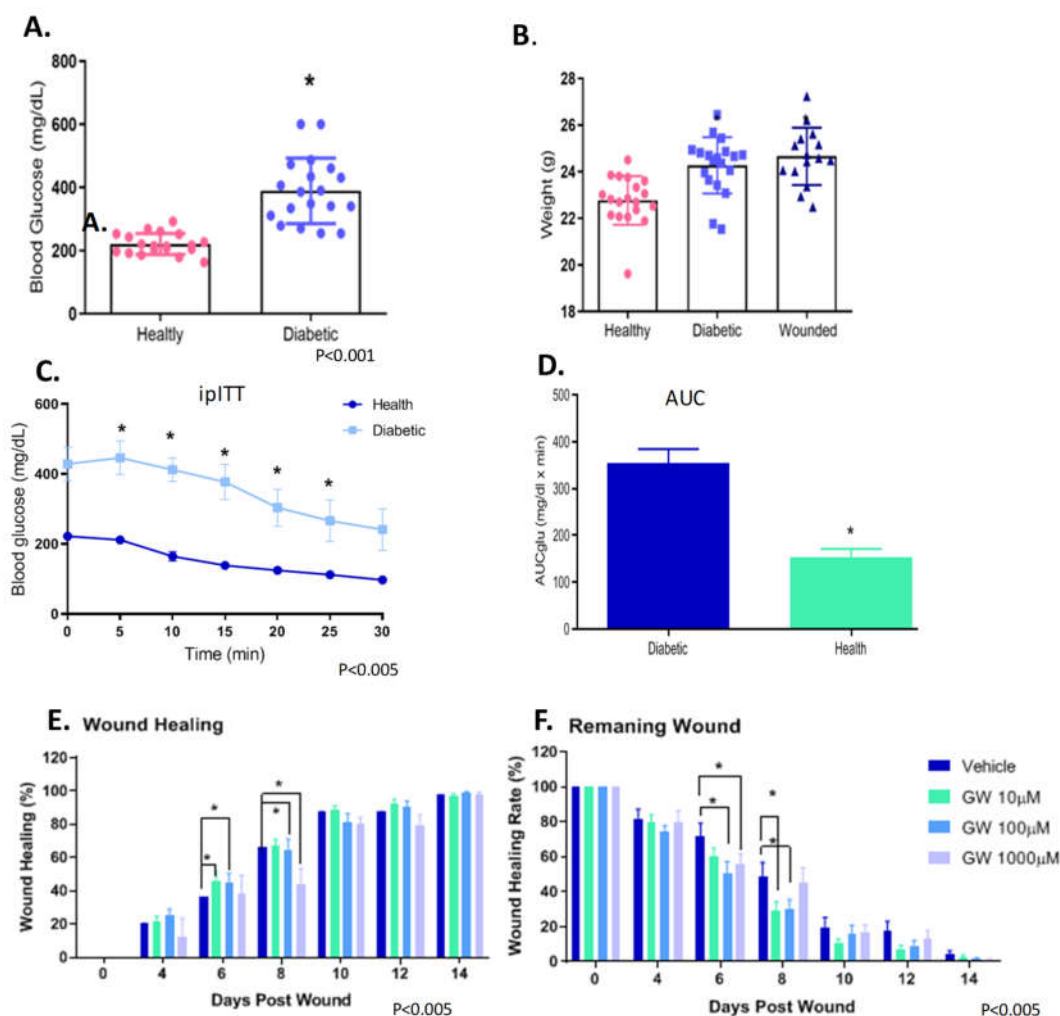


Figure 1. Determination of topical GW9508 concentration in healthy animals and characterization of diabetic animal model. **A and B** - Dose response experiment for GW9508. The wound healing area and remaining area expressed as percentage in healthy and diabetic animals on days 4, 6, 8, 10, 12 and 14, treated with topic 10 μ M, 100 μ M and 1000 μ M. ETOH vehicle for control. **C**- Blood glucose (mg/dL) of healthy control and post injection of STZ 50mg/Kg mice $n=6$. **D**- Weight body (g) in adult mice healthy, Diabetic and post wounded $n=19$. **E**- Insulin Tolerance Test. 1,5UI/Kg/lp. Blood glucose measured at time 0, 5, 10,15,20,25 and 30 minutes post injection, $n=5$. **F**- Insulin Tolerance Test Area under curve (AUC), $n=5$. **A and B**- Data are expressed as mean value $\pm$ standard

deviation of the mean (SD); analyzed by ANOVA and posttest Bonferroni, $n=5$. In all experiments $*p < 0.05$.

Topical GW9508 accelerate wound healing in healthy but not in DM animals

Wound healing is a complex phenomenon involving different cells types. Here we show that GW9508 was able to improve wound healing in healthy animals on days 6 and 8 post-injury, a specific time when, during wound healing, the cells proliferate faster. However, this did not happen in diabetic mice known to present an impaired wound healing (Fig. 2A-D)

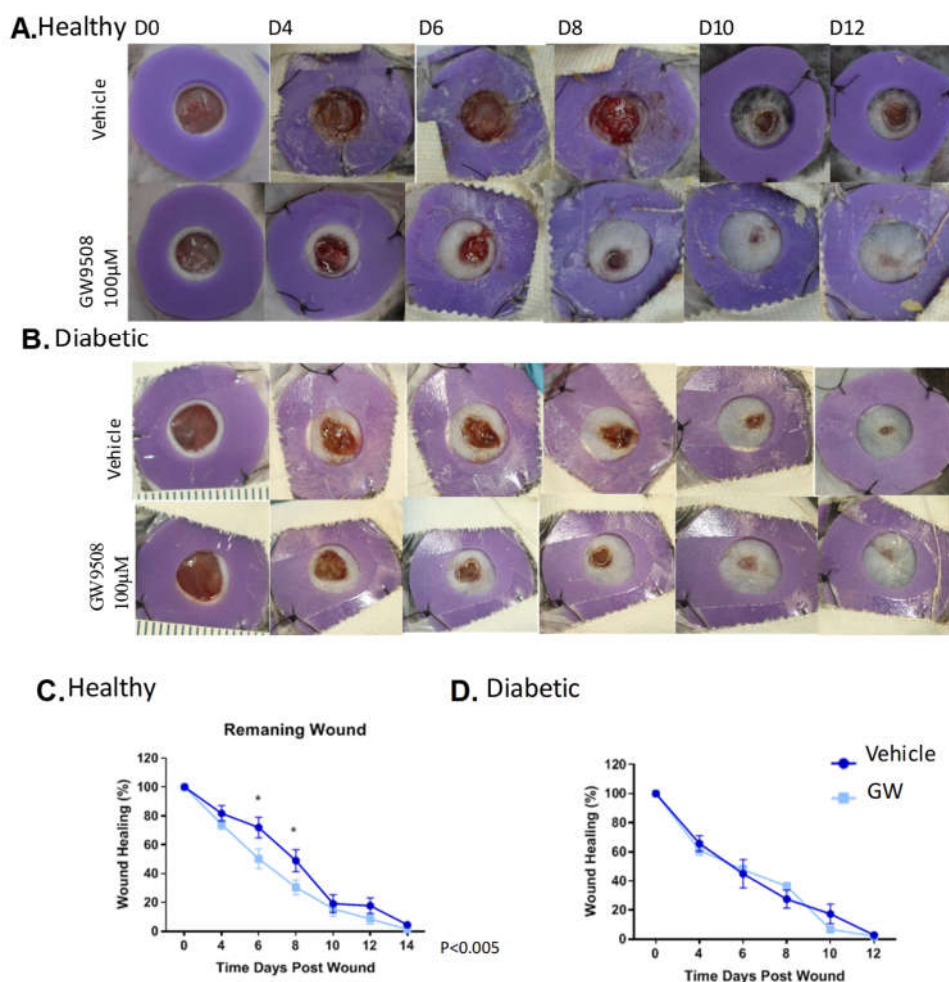


Figure 2. Wound healing macroscopy. **A-B.** Healthy and DM animals respectively. The pictures are from 0 to 12 days post wound in topic GW9508 100 μ M and ETOH vehicle treatment. **C-D-** Wound healing percentage of Healthy and DM animals respectively. Data are expressed as mean value $\pm$ standard deviation

of the mean (SD); analyzed by Test t unimpaired and posttest Bonferroni, $n=5$, $*p < 0.05$.

Topical GW9508 modulates tissue morphology in the diabetic group

In our study, at the end of the wound healing process, a complete re-epithelization was observed by H/E staining with a restructured epidermis that did not differ between groups and treatments (Fig.3 A-H). However, we observed in diabetic animals treated with GW9508 a more compact connective tissue with thicker and intertwined collagen fibers and the presence of dermal papillae, which gives more resistance to the scar (Fig.3 G, H). Nevertheless, there was no difference in quantitative analysis collagen fibers type in all groups evaluated by Picrosirius red (Fig.3 N, M)

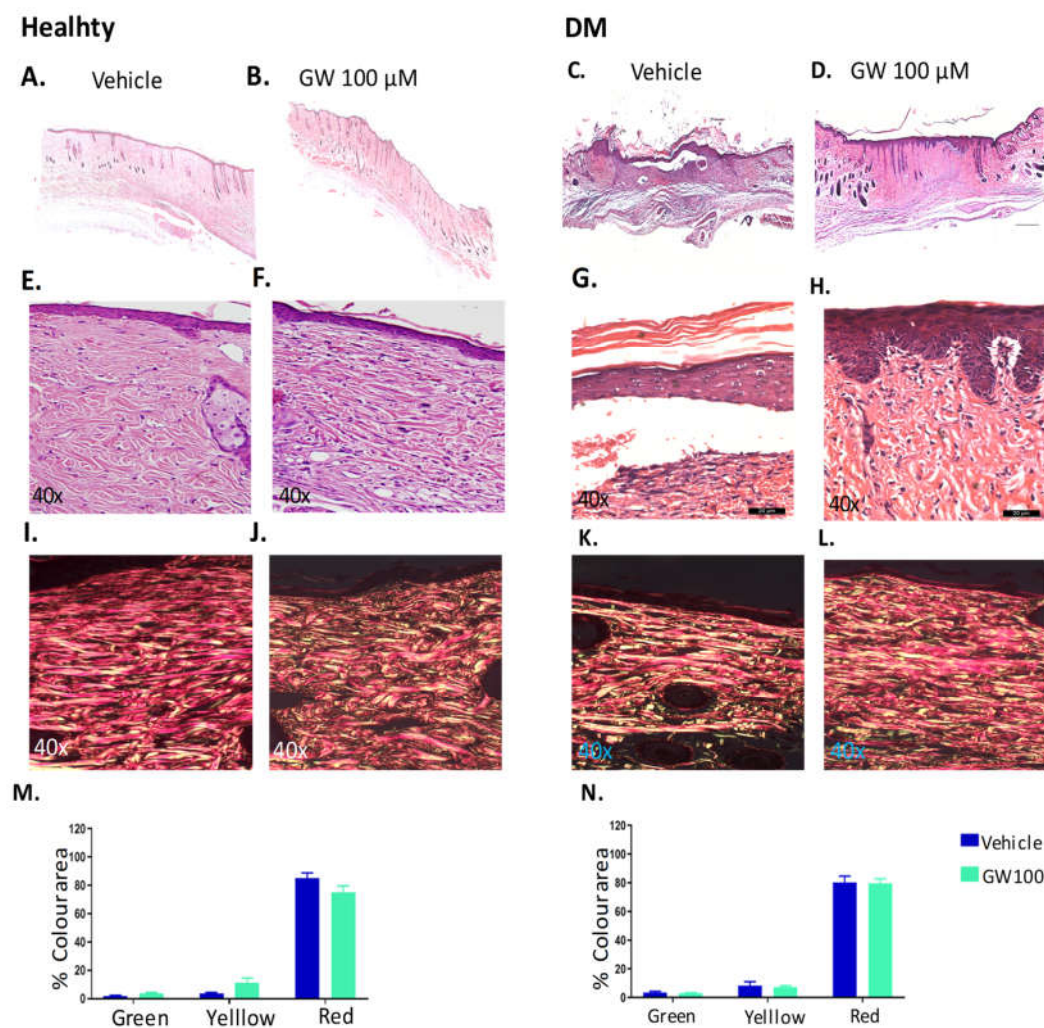


Figure 3. Microscopy of healthy and diabetic wound mice treated with GW9508 100 μ M and vehicle (**A-H**). The histological morphology of the wounds on day 12, panoramic reconstruction (**A-D**) and 40x sections stained with hematoxylin eosin (**E-H**). Picrosirius red-stained on day 14 (**I-L**). Percentage of collagen fibers type I (green), type II (yellow) and type III (red) collagen fibers in healthy and DM groups respectively (**M,N**). Data are expressed as mean value $\pm$ standard deviation of the mean (SD). In all experiments, n=3 per group.

Topical GW9508 modulates negatively gene expression of protein, enzyme and growth factor during the proliferate phase of wound-healing

Real-time PCR analysis of wound in showed modulation of different genes between the different groups. At day 5 post injury, in diabetic animals we observed that topical GW9508 leads to a decreased in gene expression of *mmp-9*, *f4/80*, *il-1 β* and *vegf* (Fig 4). Other genes as *tnf- α* , *il-10*, *il-6*, *igf-1*, *α -sma*, *ffar-4*, *ffar-1*, *tgf- β 1*, *sdf-1*, *itga-5*, *sox-2* have not undergone any significant changes (Fig. 4).

Day 5 post wound diabetic mice

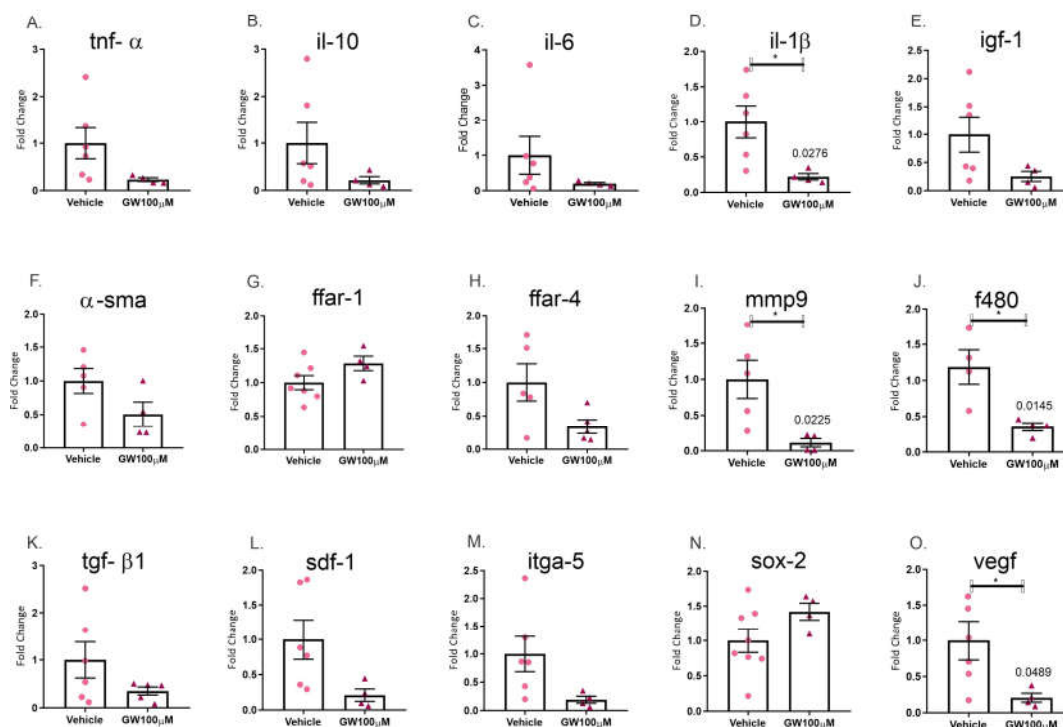


Figure 4. Expression of transcripts in the wounds from diabetic mice treated for 5 days with topical GW9508 100 μ M versus vehicle. Real time

polymerase chain reaction (PCR); **A–O** were employed to determine the expression of transcripts encoding for tumor necrosis factor (tnf- α) (A), interleukin-10 (il-10) (B), interleukin-6 (il-6) (C), interleukin-1 beta (il-1 β) (D), insulin growth factor-1 (igf-1) (E), alpha-smooth muscle actin (α -sma) (F), free fatty acid receptor 1 (ffa-1) (G), free fatty acid receptor 4 (ffa-4) (H), metalloproteinase 9 (mmp-9) (I), egf-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (f4/80) (J), transforming growth factor-beta 1 (tgf- β 1) (K), stromal cell-derived factor (sdf)-1 (L), integrin alpha-5 (itga-5) (M), sex-determining region Y-box 2 (sox-2) (N), vascular endothelial growth factor (vegf) (O). In all experiments $n = 6$ per group. $*p < 0.05$.

However, PCR analysis in healthy animals did not show significant modulation in the genes studied. On day 12 post-injury, we found no significant difference in the gene expression of tnf- α , il-10, il-6, il-1 β , igf-1, α -sma, ffa-1, ffa-4, mmp-9, f4 / 80, tgf- β 1 sdf-1, itga-5, sox-2 and vegf (Fig. 5).

Day 12 post wound healthy mice

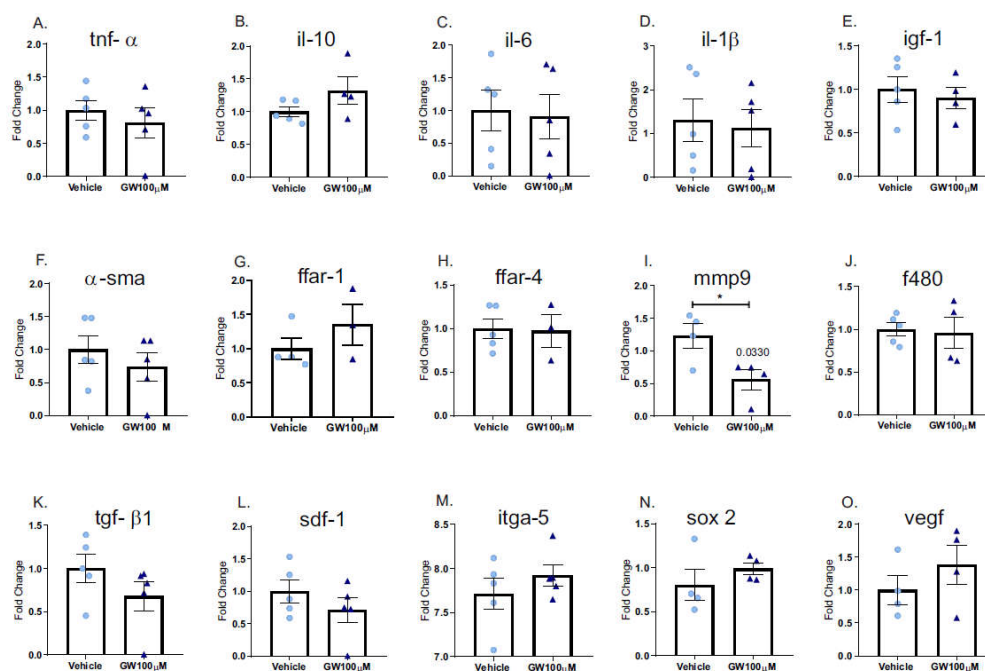


Figure 5. Expression of transcripts in the wounds from healthy mice treated for 12 days with topical GW9508 100 μ M versus vehicle. Real time polymerase chain reaction (PCR); **A–O** were employed to determine the

expression of transcripts encoding for tumor necrosis factor (tnf- α) (A), interleukin-10 (il-10) (B), interleukin-6 (il-6) (C), interleukin- 1 beta (il-1 β) (D), insulin growth factor-1 (igf-1) (E), alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (F), free fatty acid receptor 1(ffa-1) (G), free fatty acid receptor 4 (gpr-120) (H), metalloproteinase 9 (mmp-9) (I), egf-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (f4/80) (J), transforming growth factor-beta 1 (tgf- β 1) (K), stromal cell-derived factor (sdf)-1 (L), integrin alpha-5 (itga-5) (M), sex-determining region Y-box 2 (sox-2) (N), vascular endothelial growth factor (vegf) (O). In all experiments $n = 6$ per group. $*p < 0.05$.

The same occurred when we evaluated the expression of genes related to the healing process in diabetic animals at day 12 post-injury. There was no significant modulation in tnf- α , il-10, il-6, il-1 β , igf-1, α -sma, ffa-1, ffa-4, mmp-9, f4 / 80, tgf- β 1 sdf-1, itga-5, sox-2 and vegf (Fig 6 A-O).

Day 12 post wound diabetic mice

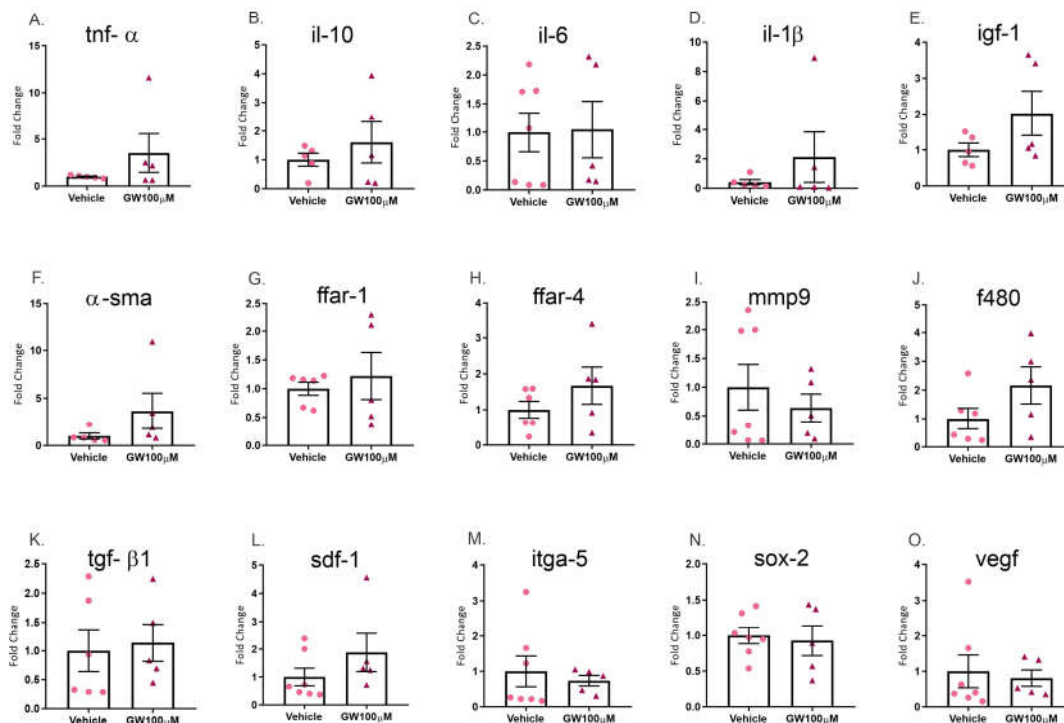


Figure 6. Expression of transcripts in the wounds from diabetic mice treated for 12 days with topical GW9508 100µM versus vehicle. Real time polymerase chain reaction (PCR); **A–O** were employed to determine the expression of transcripts encoding for tumor necrosis factor ($\text{tnf-}\alpha$) (A), interleukin-10 (il-10) (B), interleukin-6 (il-6) (C), interleukin-1 beta ($\text{il-1}\beta$) (D), insulin growth factor-1 (igf-1) (E), alpha-smooth muscle actin ($\alpha\text{-sma}$) (F), free fatty acid receptor 1 (ffar-1) (G), free fatty acid receptor 4 (ffar-4) (H), metalloproteinase 9 (mmp-9) (I), egf-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (f4/80) (J), transforming growth factor-beta 1 ($\text{tgf-}\beta 1$) (K), stromal cell-derived factor (sdf-1) (L), integrin alpha-5 (itga-5) (M), sex-determining region Y-box 2 (sox-2) (N), vascular endothelial growth factor (veg) (O). In all experiments $n = 6$ per group. $*p < 0.05$.

Single-cell RNA sequencing analysis of wound tissue reveals complex lineage structures underlying skin regeneration

Data from single-cell RNA sequencing (scRNAseq) from mice skin wounds on day 12 after injury. The data was generated and published by Guerrero-Juarez et al were reanalyzed [19]. We describe 20 cell clusters, mainly organized in 4

lineages/trajectories comprised of fibroblasts, myofibroblasts, myeloid cells and endothelial cells (Fig 7A-C). Clusters containing dendritic, endolymphatic and Schwann cells were also identified. Several genes found to be differentially expressed in our samples presented interesting expression patterns within this data re-analysis. *Acta2* (alpha-SMA) and *Il6* were differentially expressed in myofibroblasts, which are cells that play important role in scar formation. *Acta2* expression pattern strongly suggests this gene is upregulated during myofibroblast maturation. *Il1b*, *tnf- α* , *adgre1* (F4/80) and *tgfb1* were differentially expressed in myeloid cells. *Il1b* was mainly expressed in myeloid cells and it was downregulated during differentiation trajectories. *Arrb2*, a gene encoding beta Arrestin, which plays a key role during *ffar4* signaling, was also expressed exclusively in myeloid cells. Finally, we could detect low levels *ffar4* expression, this was probably due to the sequencing depth; nevertheless, out of the few cells expressing *ffar4*, most were myeloid [19, 20, 23].

Fig 7

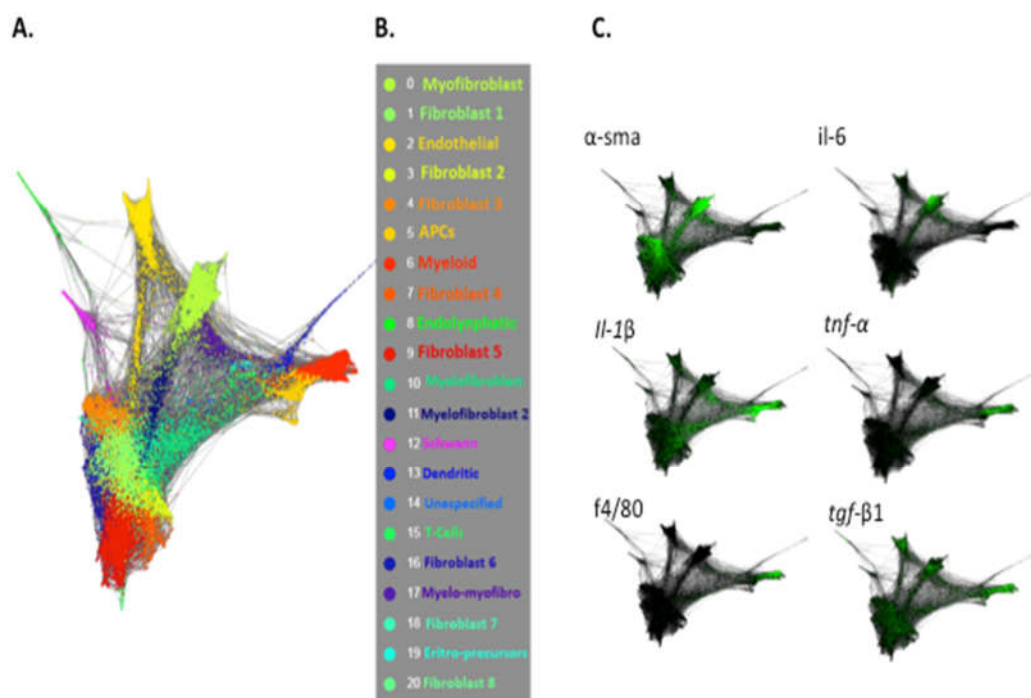


Figure 7. Bioinformatic data from single-cell RNA sequencing (scRNAseq) of mice wound healing on day 12 post injury. **A-** Representation of SPRING force-directed layout plot of scRNAseq. **B-** List of the subclusters identified; cells where filtered according to QC metrics in Seurat v3 in the R Programming Language. **C-** Specific transcript-expressing cell clusters as visualized by the SPRING layout.

Discussion

Here we hypothesized that the FFAR-4/1 agonist could lead to an improvement in wound healing in diabetic animals, decreasing the inflammatory process that remains stuck under these conditions. For this, we used streptozotocin (STZ) induced diabetes and healthy mice model. The low dose model of STZ has led to hyperglycemia and insulin resistance. The presence of insulin resistance demonstrates that this model is closer to what happens during the spontaneous development of type 2 diabetes [24]. Also, another important factor for this animal model is that they did not present weight loss during all

experiment process. Therefore, we believe that this is a more trustworthy model that mimics what happens during the healing process in diabetics (Fig 1 C-F).

In 2016, study in our group verified that FFAR-4 is expressed in cutaneous wounds and topical treatment with docosahexaenoic fatty acid (DHA) leads to a more rapid healing probably through the activation of these receptors [22]. Thus, we used a specific synthetic agonist for FFAR-4, the GW9508.

We identified that in healthy animals, 100 μ M GW9508, surprisingly led to an increase in wound retraction between days 6 and 8 post-injury (Fig 1A-B). At this time of healing the cells are in a state of increased proliferation, so we expected the treatment to modulate the retraction rate in the first day's post-injury when the wounds are in the inflammatory phase [9, 11]. However, the results may be repercussions of modulations in the inflammatory phase, since they overlap and the end of the inflammation is a determining event for the beginning of the next phase [2, 9, 19]. Based on the conducted dose response experiments we initiated treatment with this agonist in the concentration of 100 μ M (Fig 1A-B).

Hereafter, we evaluated the retraction of the wounds post topical GW9508 treatment comparing their effect in diabetic animals and healthy animals. We verified that there was no significant difference between days of healing in the diabetic animals. This was an unexpected result because according to our hypothesis the GW9508 could be able to heal faster taking the wound out of the chronic inflammation present in diabetes (Fig. 2A-D).

Together with these studies, we evaluated the morphology of newly formed tissue on day 12 post-injury and we could observe that topical GW9508 did not alter lesion closure when compared to vehicle groups, both in healthy and diabetic animals (Fig. A-H). However, we observed that GW9508 in the diabetic group led to the formation of better quality of scar tissue than in the vehicle treated animal. The neo tissue formed in the animal GW9508 exhibits better connective tissue organization, and dermal papillae formation, which allowed an improved adhesion between dermis and epidermis. Arantes et al observed the same phenomenon when treat rats with DHA [22]. However, we did not observe any difference in collagen deposition between vehicle and GW9508 in all treated groups (Fig.3I-N).

Next, we verify the gene expression of important proteins involved the healing process. For this purpose, we collected healing tissues in the diabetic group on day 5 postoperative, when probably the tissue is in proliferative phase. We observed negative gene modulation in mmp-9, f4/80 and vegf. The other cytokines, chemokines and growth factors analyzed were not modulated.

It has already been described in the literature that high concentrations of metalloproteinases are detrimental to healing. Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes capable of degrading components of the extra cellular matrix (ECM) involved in tissue remodeling [27, 28]. The harmful effects of MMPs on scar tissue are attributed to the rapid turnover of growth factors, receptors and the newly formed ECM, which are essential for wound healing [29, 30]. Elevated levels of MMP-9 are present in several chronic wounds, including diabetic ulcers [31]. In our study, we observed a lower gene expression of MMP-9 and possibly this has improved the connective tissue formation observed in diabetic animals due to the lower degradation that can be attributed to these enzymes.

F4/80 is a mouse cell surface glycoprotein expressed at high levels in various macrophages including: Kupffer cells, Langerhans cells in the skin and macrophages of connective tissue systems [32-34] demonstrated that mice expressing large amounts of the f4/80 protein has the prolonged inflammatory phase and a slower healing rate. Here, we observed a decrease in the gene expression of f4/80 on day 5 after injury which may suggest that this decrease contributed to better healing in diabetic mice treated with topical GW9508 when compared to the vehicle, probably modulating the inflammatory phase.

We also observed in the diabetic animals treated with GW9508 on day 5 post injury a decrease in the gene expression of vascular endothelial growth factor (vegf). The process of formation of new blood vessels, known as "angiogenesis", is initiated by growth factors such as VEGF, mainly in the induction of cell migration and proliferation [35, 36]. However, there are cases that too much proliferation leads to an anomalous scar [37, 38]. The molecular mechanism responsible for the most proportional vascular response during healing remains unclear. Shi et al demonstrate that blocking vascularization with the use of anti-VEGF antibody promotes a reduction in scar size and the formation of a more

interlace collagen architecture characteristic of uninjured dermis [39]. Here we observe a decrease in vegf gene expression suggesting that this may have led to an improvement in the formation of dermal tissue in diabetic animals treated with GW9508.

However, we did not observe significant modulations in other important genes of the healing process, both on day 5 post-injury and on day 12. We concluded that on day 12 we did not find significant differences between treatments in both healthy and diabetic groups since the healing process is finished.

As GW9508 treatment resulted in only a few differences in gene expression, we decided to employ a public dataset to determine the cell-specific landscape of the transcripts of interest. The evaluation of the scRNAseq data from Guerrero-Juarez et al [19] provided a broad view of the cell types expressing the proteins evaluated in this study. We embedded the raw counts data after quality-control filtering in a k-nearest-neighbors force-directed layout [21, 23]. This dimensionality reduction method conveniently allows for simultaneously normalization, clustering, visualization and trajectory inference of cell types and lineages. We describe 20 cell clusters, mainly organized in 4 lineages/trajectories comprised of fibroblasts, myofibroblasts, myeloid cells and endothelial cells. Even though *ffar4* was expressed at low levels in the sample, the analysis provided evidence that it predominates on cells of the myeloid lineage, supporting its potential involvement on immunoregulation.

Among the transcripts undergoing modulation in response to GW9508, only *f4/80* was detected using the scRNAseq analysis approach. As expected, *f4/80* was predominantly expressed in cells of the myeloid lineage which are essential for the immune response. The immune system is a key element throughout the wound healing process, actively participating in the restoration of homeostasis after tissue injury through multiple mechanisms [40]. Dermal fibrosis resulting from increased ECM deposition and hyperproliferation of keratinocytes represent clinical pathologies of healing. Not unexpectedly, chronic wounds and scars represent opposite extremes of uncontrolled inflammation and immune response to injury. However, many of the mechanisms by which the cells of the

immune system act to regulate the wound healing response are still unknown. Here we note that f4/80 is decreased after treatment with GW9508 and this may be positive for cure because of its ability to control exaggerated inflammation.

Our goal was to activate FFAR-4 through GW9508, these data suggest important modulations in an animal model of diabetes whose wounds are stuck. When we evaluated the ffar-4 transcripts we could verify that although in small quantities they are also present. Therefore, we believe that even without having a major difference in wound healing the FFAR-4 receptor agonist was able to do this better.

New studies explaining the processes of cell differentiation and characterization of cellular clusters present in healing in animals models can be done to collaborate to better understand the phenomenon and the description of possible therapeutic targets.

Conclusion

The topical GW9508 treatment improved the formation of dermal matrix during the wound healing in diabetic animals and accelerate wound healing in healthy animals.

Study Limitations

Failure to investigate the activation of FFAR-4 after GW9508 treatment is an important limitation of the work, as well as the investigation of the gene modulations in the early stages of the healing process. It could provide more information on the effect of the agonist on healing. We also believe that perhaps the way to deliver the product to the wound was not the best. An encapsulated product, which did not undergo oxidation from external effects, would be the ideal.

Acknowledgements: Many thanks go to Dr. E. Roman, Joseane Morari, G. Ferraz, and M. Cruz for technical assistance.

Source of funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES. The authors belong to the Obesity and Comorbidities Research Center, Brazil.

Conflicts of Interest: No conflicts of interest are present for the authors of the present article.

1. Adeshara, K.A. et al. (2016) Diabetes and Complications: Cellular Signaling Pathways, Current Understanding and Targeted Therapies. *Curr Drug Targets* 17 (11), 1309-28.
2. Blakytyn, R. and Jude, E. (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 23 (6), 594-608.
3. Falanga, V. (2005) Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366 (9498), 1736-43.
4. Baltzis, D. et al. (2014) Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther* 31 (8), 817-36.
5. Berlanga-Acosta, J. et al. (2013) Glucose toxic effects on granulation tissue productive cells: the diabetics' impaired healing. *Biomed Res Int* 2013, 256043.
6. Peppas, M. et al. (2009) Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen* 17 (4), 461-72.
7. Willyard, C. (2018) Unlocking the secrets of scar-free skin healing. *Nature* 563 (7732), S86-S88.
8. Gould, J. (2018) Superpowered skin. *Nature* 563 (7732), S84-S85.
9. Gurtner, G.C. et al. (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453 (7193), 314-21.
10. Byrd, A.L. et al. (2018) The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 16 (3), 143-155.
11. Martin, P. and Nunan, R. (2015) Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 173 (2), 370-8.
12. Oh, D.Y. et al. (2014) A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med* 20 (8), 942-7.
13. Lu, J. et al. (2017) Structural basis for the cooperative allosteric activation of the free fatty acid receptor GPR40. *Nat Struct Mol Biol* 24 (7), 570-577.
14. Moonwiryakit, A. et al. (2018) GPR40 receptor activation promotes tight junction assembly in airway epithelial cells via AMPK-dependent mechanisms. *Tissue Barriers* 6 (2), 1-12.
15. Fujita, T. et al. (2011) A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. *J Invest Dermatol* 131 (8), 1660-7.
16. Liu, Y. et al. (2014) The fish oil ingredient, docosahexaenoic acid, activates cytosolic phospholipase A(2) via GPR120 receptor to produce prostaglandin E(2) and plays an anti-inflammatory role in macrophages. *Immunology* 143 (1), 81-95.
17. Chaudhry, Z.Z. et al. (2013) Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim* 47 (4), 257-65.
18. Wang, X. et al. (2013) The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc* 8 (2), 302-9.
19. Guerrero-Juarez, C.F. et al. (2019) Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. *Nat Commun* 10 (1), 650.
20. Butler, A. et al. (2018) Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 36 (5), 411-420.

21. Weinreb, C. et al. (2018) SPRING: a kinetic interface for visualizing high dimensional single-cell expression data. *Bioinformatics* 34 (7), 1246-1248.
22. Arantes, E.L. et al. (2016) Topical Docosahexaenoic Acid (DHA) Accelerates Skin Wound Healing in Rats and Activates GPR120. *Biol Res Nurs* 18 (4), 411-9.
23. Wagner, D.E. et al. (2018) Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. *Science* 360 (6392), 981-987.
24. Velander, P. et al. (2008) Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* 16 (2), 288-93.
25. Rodrigues, M. et al. (2019) Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* 99 (1), 665-706.
26. Shook, B.A. et al. (2018) Myofibroblast proliferation and heterogeneity are supported by macrophages during skin repair. *Science* 362 (6417).
27. Jobin, P.G. et al. (2017) New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864 (11 Pt A), 2043-2055.
28. Stevens, L.J. and Page-McCaw, A. (2012) A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol Biol Cell* 23 (6), 1068-79.
29. Kyriakides, T.R. et al. (2009) Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 28 (2), 65-73.
30. Wilgus, T.A. (2012) Growth Factor-Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1 (6), 249-254.
31. Muller, M. et al. (2008) Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 25 (4), 419-26.
32. Sadiq, A. et al. (2018) 5-HT_{1A} Receptor Function Makes Wound Healing a Happier Process. *Front Pharmacol* 9, 1406.
33. Dixon, L.J. et al. (2013) Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol* 3 (2), 785-97.
34. Chintala, H. et al. (2012) Connective tissue growth factor regulates retinal neovascularization through p53 protein-dependent transactivation of the matrix metalloproteinase (MMP)-2 gene. *J Biol Chem* 287 (48), 40570-85.
35. Olsson, A.K. et al. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5), 359-71.
36. Simons, M. et al. (2016) Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (10), 611-25.
37. Van Putte, L. et al. (2016) The effects of advanced glycation end products (AGEs) on dermal wound healing and scar formation: a systematic review. *Scars Burn Heal* 2, 2059513116676828.
38. Yannas, I.V. et al. (2017) Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound Repair Regen* 25 (2), 177-191.
39. Shi, J. et al. (2019) The efficacy of anti-VEGF antibody-modified liposomes loaded with paeonol in the prevention and treatment of hypertrophic scars. *Drug Dev Ind Pharm* 45 (3), 439-455.
40. Larouche, J. et al. (2018) Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 7 (7), 209-231.

CONCLUSÃO

O modelo experimental apresentou hiperglicemia e resistência à insulina após o tratamento com estreptozotocina e a confecção das feridas não impediu que os camundongos mantivessem um ganho de peso. O tratamento tópico com GW9508 melhorou a cicatrização em camundongos diabéticos pela formação de um tecido conjuntivo mais compacto com disposição de fibras colágenas interlaçadas e presença de papilas dérmicas que conferem maior aderência entre derme e epiderme e maior resistência à cicatriz. E por fim, as análises de sequenciamento de RNA unicelular do tecido da ferida revelaram a presença de genes importantes modulados pelo tratamento de GW9508.

REFERÊNCIAS

1. Diabetes [Internet]. 2018 [cited 2019 Dec 5]. Available from: www.who.int/diabetes/global-report
2. A. Adeshara K, G. Diwan A, S. Tupe R. Diabetes and Complications: Cellular Signaling Pathways, Current Understanding and Targeted Therapies. *Curr Drug Targets*. 2016;17(11):1309–28.
3. Kendall AC, Kiezel-Tsugunova M, Brownbridge LC, Harwood JL, Nicolaou A. Lipid functions in skin: Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2017;
4. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* [Internet]. 2008 May 14;453(7193):314–21. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07039>
5. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2019 Feb 4];16(3):143–55. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro.2017.157>
6. Gould J. Superpowered skin. *Nature* [Internet]. 2018;563(7732):S84–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/d41586-018-07429-3>
7. Peres CM, Otton R, Curi R. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. *Cell Biochem Funct*. 2005;
8. Willyard C. Unlocking the secrets of scar-free skin healing. *Nature* [Internet]. 2018;563(7732):S86–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/d41586-018-07430-w>
9. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine*. 2006.
10. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Apr 15];99(1):665–706. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00067.2017>
11. Ruthig DJ, Meckling-Gill KA. Biochemical and Molecular Action of Nutrients Both (n-3) and (n-6) Fatty Acids Stimulate Wound Healing in the Rat Intestinal Epithelial Cell Line, IEC-6. Vol. 129, *J. Nutr*. 1999.
12. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr*. 2002;
13. Cardoso CRB, Souza MA, Ferro EAV, Favoreto S, Pena JDO. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen*. 2004;
14. Pieper B, Larcher Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound, Ostomy Cont Nurs*. 2003;30(4):175–83.

15. Schäffer M. Lymphocyte function in wound healing and following injury. Vol. 85, British Journal of Surgery. 1998.
16. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet [Internet]. 2005 Nov 12 [cited 2019 May 29];366(9498):1736–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291068>
17. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. Adv Ther [Internet]. 2014 Aug 29 [cited 2019 May 12];31(8):817–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12325-014-0140-x>
18. Nagaraja S, Wallqvist A, Reifman J, Mitrophanov AY. Computational Approach To Characterize Causative Factors and Molecular Indicators of Chronic Wound Inflammation. J Immunol [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2019 May 12];192(4):1824–34. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/192/4/1824>
19. Mitrophanov AY, Nagaraja S, Wallqvist A, Reifman J. of Chronic Wound Inflammation Causative Factors and Molecular Indicators Computational Approach To Characterize. 2014 [cited 2019 May 12]; Available from: <http://www.jimmunol.org/content/192/4/1824>
20. Berlanga-Acosta J, Schultz GS, López-Mola E, Guillen-Nieto G, García-Siverio M, Herrera-Martínez L. Glucose toxic effects on granulation tissue productive cells: the diabetics' impaired healing. Biomed Res Int [Internet]. 2013 Dec 26 [cited 2019 May 12];2013:256043. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484099>
21. Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA. Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. Wound Repair Regen [Internet]. 2009 Jul [cited 2019 May 12];17(4):461–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614910>
22. Ministério da saúde D de atenção básica. Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica [Internet]. 2016 [cited 2019 May 12]. p. 62. Available from: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual_do_pe_diabetico.pdf
23. Garwood CS, Steinberg JS, Kim PJ. Bioengineered Alternative Tissues in Diabetic Wound Healing. Clin Podiatr Med Surg [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 May 12];32(1):121–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891842214000779?via%3Dihub>
24. Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. Progress in Lipid Research. 2013.
25. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WQ, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. Cell. 2010;
26. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner

- AR, et al. A Gpr120 Selective Agonist Improves Insulin Resistance and Chronic Inflammation *Da. Nat Med.* 2014;20(8):942–7.
27. Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* 2003;
 28. Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, et al. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;
 29. Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, et al. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. Vol. 28, *Biomedical Research.* 2007.
 30. Boneva NB, Yamashima T. New insights into “GPR40-CREB interaction in adult neurogenesis” specific for primates. *Hippocampus.* 2012;
 31. Milligan G, Alvarez-Curto E, Hudson BD, Prihandoko R, Tobin AB. FFA4/GPR120: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2017.
 32. Oh DY, Olefsky JM. Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab.* 2012;
 33. Burant CF. Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;
 34. Moonwiryakit A, Wattanaphichet P, Chatsudthipong V, Muanprasat C. GPR40 receptor activation promotes tight junction assembly in airway epithelial cells via AMPK-dependent mechanisms. *Tissue Barriers* [Internet]. 2018 Apr 3 [cited 2018 Dec 16];6(2):1–12. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21688370.2018.1480741>
 35. Fujita T, Matsuoka T, Honda T, Kabashima K, Hirata T, Narumiya S. A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. *J Invest Dermatol.* 2011;
 36. Arantes EL, Dragano N, Ramalho A, Vitorino D, de-Souza GF, Lima MHM, et al. Topical Docosahexaenoic Acid (DHA) Accelerates Skin Wound Healing in Rats and Activates GPR120. *Biol Res Nurs.* 2016;
 37. Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse).
 38. Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc* [Internet]. 2013;8(2):302–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.002>
 39. Lachapelle JM. Efficacy of Protective Creams and / or Gels. 1996;25:182–92.
 40. Urban C, Hamacher A, Partke HJ, Roden M, Schinner S, Christiansen E, et al. In vitro and mouse in vivo characterization of the potent free fatty acid 1 receptor agonist TUG-469. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2013;

41. Guerrero-Juarez CF, Dedhia PH, Jin S, Ruiz-Vega R, Ma D, Liu Y, et al. Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. [cited 2019 May 12]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08247-x>

ANEXOS



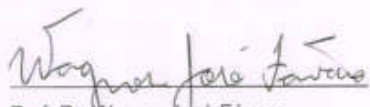
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AGONISTA DOS RECEPTORES GPR120 E GPR40 SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**, registrada com o nº **4637-1/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo e Thais Paulino Do Prado**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **24 de agosto de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/09/2017-10/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/09/2017-10/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	144
Peso / Idade:	09 semanas / 21g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 24 de agosto de 2017.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.