

DAIANE FIGUEIREDO ROSA

**ÁLCOOL E DIETA HIPERCALÓRICA RETARDAM A CICATRIZAÇÃO
DE FERIDAS CUTÂNEAS DE SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R788a
2016
Rosa, Daiane Figueiredo, 1989-
Álcool e dieta hipercalórica retardam a cicatrização de
feridas cutâneas de segunda intenção em ratos Wistar / Daiane
Figueiredo Rosa. – Viçosa, MG, 2016.
viii, 96f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Reggiani Vilela Gonçalves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Feridas e lesões - Tratamento. 2. Cicatrização de feridas.
3. Álcool - Efeito fisiológico. 4. Rato como animal de
laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 617.14

DAIANE FIGUEIREDO ROSA

**ÁLCOOL E DIETA HIPERCALÓRICA RETARDAM A CICATRIZAÇÃO
DE FERIDAS CUTÂNEAS DE SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 04 de março de 2016.


João Paulo Viana Leite


Sérgio Luís Pinto da Matta


Reggiani Vilela Gonçalves
(Orientadora)

*Dedico ao Meu Pai, que de onde estiver
sei que estará orgulhoso de mim. A minha querida Mãe
pelo apoio e amor incondicional. A Deus.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fornecer força durante toda a minha trajetória acadêmica e principalmente durante estes dois anos.

A minha família pela motivação, apoio e amor. Especialmente a minha mãe Maristela por me ouvir e me ajudar nos momentos de difíceis e pelo imenso carinho que sempre me dedicou.

Ao meu companheiro e namorado Daniel, pela compreensão, apoio, amor e principalmente pela paciência durante esta caminhada.

Aos amigos que me ajudaram com seus conselhos e apoio em momentos de dúvidas.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, em especial, a toda equipe do Laboratório de Patologia Geral, Estéfanny, Alejandro, Mariaúrea, Mônica, Laura, Gabriela e Vanessa, pelo apoio durante o experimento, principalmente nos cuidados com os animais, sem vocês tudo seria mais difícil.

A minha Orientadora Reggiani Vilela Gonçalves, pela Orientação, suporte intelectual e dedicação durante estes dois anos.

A querida Jerusa e ao Laboratório de Ecofisiologia de Morcegos, pela ajuda durante as análises de estresse oxidativo.

Ao Laboratório de Imunovirologia Molecular e ao Laboratório de Bioquímica Nutricional pelo uso do espectrofotômetro.

Agradeço a Professora Maria do Carmo Gouveia do Departamento de Nutrição, por me auxiliar com a dieta de cafeteria e à Solange, pela ajuda nas análises sanguíneas.

A Todos do laboratório de Biologia Estrutural, em especial ao Prof. Sérgio da Matta pela co-orientação e ajuda no fornecimento de materiais para histologia, o técnico Matheus, ao Eduardo, Lidiane e Neila pela acolhida durante o processamento histológico, pela contribuição intelectual e pelos momentos de descontração.

Ao Biotério da Universidade Federal de Viçosa pelos animais.

Ao Laboratório de Nutrição Experimental, pelo espaço fornecido para a realização do experimento.

A Universidade Federal de Viçosa juntamente com o programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de cursar o mestrado e pela infraestrutura fornecida para a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivos gerais:	2
2.2 Objetivos específicos:	2
3. REFERENCIAS	3
ARTIGO 1	6
High-Fat Diet and Alcohol in the Cutaneous and Bone Tissue Repair: A Systematic Review of Murine Models.	6
Abstract	6
1. Introduction	7
2. Material and Methods	9
2.1 Search for articles	9
2.2 Study characteristics and Qualitative data	13
2.3 ARRIVE Analysis	13
3. Results	23
3.1 PRISMA Guideline	23
3.2 Qualitative data	23
3.3 Bias Analysis	26
4. Discussion	37
5. Conclusion	40
6. Acknowledgements	40
7. References	40
ARTIGO 2	50
Álcool e Dieta Gorda retardam a cicatrização de Feridas Cutâneas de Segunda Intenção em Ratos Wistar	50
Resumo	50
Abstract	52
1. Introdução	53
2. Material e Métodos	55
2.1 Animais	55

2.2	Delineamento experimental e realização das feridas	56
2.3	Processamento e análise do material histológico	58
2.4	Análises de expressão de citocinas	59
2.5	Análises Bioquímicas.....	59
2.5.1	Marcadores de Estresse Oxidativo	59
2.6	Marcadores Sanguíneos	60
2.7	Progressões do fechamento da ferida.....	61
2.8	Parâmetros Biométricos (CEA, TEP e IMC)	61
2.9	Análise estatística	62
3.	Resultados	63
4.	Discussão	76
5.	Conclusão:.....	82
6.	Agradecimentos.....	82
7.	Referencias.....	83
4.	CONCLUSÕES GERAIS	91
5.	MATERIAL SUPLEMENTAR	92

RESUMO

ROSA, Daiane Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Álcool e dieta hipercalórica retardam a cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção em ratos Wistar.** Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves.

Existem poucos estudos demonstram efeito do álcool ou da dieta hipercalórica no reparo cutâneo, sendo que nenhum relata o efeito do álcool e da dieta hipercalórica, associados durante a cicatrização. Para iniciar o estudo foi realizada uma revisão sistemática de todos os artigos relevantes sobre o efeito do álcool e da dieta hipercalórica sobre o processo de reparo cutâneo. A partir da revisão sistemática obtiveram-se informações que serviram como base para o presente estudo. Dessa forma, investigou os danos oxidativos, histológicos e bioquímicos do álcool e da dieta hipercalórica, isolados ou associados, durante o processo de reparo cutâneo em ratos wistar. Cinco grupos experimentais foram analisados: G1: controle, dieta comercial e água com gavagem, G2: controle, dieta comercial e água sem gavagem, G3: dieta comercial e álcool, G4: dieta hipercalórica, G5: dieta hipercalórica e álcool. Os animais foram tratados com álcool e dieta hipercalórica durante 61 dias. Após 40 dias de tratamento foram realizadas 3 feridas cutâneas de segunda intenção no dorso dos animais por meio de incisão cirurgia e a cada 7 dias foram retirados fragmentos totalizando 21 dias. Todos os grupos que receberam álcool e dieta hipercalórica apresentaram um retardo no processo de cura, principalmente em relação à alta celularidade, retardo na angiogênese e na deposição de colágeno I, caracterizando o atraso no remodelamento da matriz extracelular. Esses resultados estão condizentes com o aumento do estresse oxidativo pela elevação dos níveis de TBARS, PCN e das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST). Além disto, observaram-se alterações sorológicas e biométricas que tem efeito direto no processo de reparo, além do aumento da expressão de TGF- β contribuindo para o processo de inflamação crônica. Assim, baseado em todos os parâmetros analisados, conclui-se que o álcool e a dieta hipercalórica causa um retardo na cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção.

ABSTRACT

ROSA, Daiane Figueiredo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Alcohol and high calorie diet slows the healing of wounds of second intention in Wistar rats.** Adviser: Reggiani Vilela Gonçalves.

There are few studies that demonstrate the influence of alcohol or high calorie diet in skin repair, and none of them reports the effect of alcohol and the association of high calorie diet during healing. To start the study was conducted a systematic review of all relevant articles on the effect of alcohol and high calorie diet on the skin repair process. From the systematic review we got information that served as the basis for this study. Thus, we investigated the oxidative damage, histological and biochemical alcohol and calorie diet alone or in combination during the skin healing process in rats. Five experimental groups were analyzed: G1: control, commercial diet and water gavage, G2: control, commercial diet and water without gavage, G3: Commercial diet and alcohol, G4: calorie diet, G5: calorie diet and alcohol. The animals were treated with alcohol and calorie diet for 61 days. After 40 days of treatment we made three wounds of second intention on the back of the animals by incision surgery and every 7 days were taken fragments totaling 21 days. All groups that received alcohol and high calorie diet showed not only a delay in the healing process, especially in relation to high cellularity, but also a delay in angiogenesis and collagen deposition I, featuring the delay in remodeling of the extracellular matrix. These results are consistent with increased oxidative stress by the increase in TBARS, PCN and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST). In addition, there were serological and biometric changes that have direct effect in the repair process, besides the increase in TGF- β expression contributes to the chronic inflammation process. So, based on all parameters, it is concluded that alcohol and high calorie diet causes a delay in healing of skin wounds of ulterior motive.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cicatrização de feridas cutâneas é um evento importante que envolve a liberação de uma série de mediadores químicos que são extremamente importantes para eventos que ocorrem no início da reparação. Inicialmente ocorre a inflamação tecidual e este processo é seguido por eventos que culminam com a proliferação celular e remodelação cutânea^(1,2,3). Existem vários estudos descrevendo diferentes momentos para análise do tecido cicatricial em murinos, sendo que normalmente os dias 3, 5, 7, 14 e 21 após a lesão são os mais avaliados, geralmente com a finalidade de analisar as fases inflamatória, de proliferação e de maturação tecidual^(2,4,5). Todas estas fases precisam estar em homeostase para garantir uma cicatrização completa e eficaz e desta forma, evitar a inflamação crônica da ferida⁽⁵⁾. Uma inflamação crônica é caracterizada por um retardo no fechamento da lesão cutânea, principalmente devido ao aumento na quantidade de proteases liberadas no tecido derivadas de neutrófilos e macrófagos que migram atraídos por patógenos, uma vez que, a presença de infecções também é uma característica comum nas inflamações crônicas⁽⁶⁾.

As principais células envolvidas no processo de reparo cutâneo são fibroblastos, queratinócitos, leucócitos e células endoteliais⁽⁷⁾. Estas células, quando ativadas, desencadeiam a formação de tecido de granulação pela formação de fibras colágenas do tipo III e neovascularização tecidual, ao mesmo tempo em que promovem a reconstrução da barreira epidérmica⁽⁸⁾. Além disso, à medida que o processo progride, uma série de mediadores químicos são liberados estimulando a produção de colágeno tipo I, que torna o tecido mais forte e resistente⁽¹⁰⁾.

Atualmente o estilo de vida, incluindo os hábitos alimentares, tem contribuído muito para piorar a qualidade de vida e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de uma série de doenças. O consumo de álcool já vem sendo considerado um problema de saúde pública⁽¹¹⁾. A exposição ao agente pode ter efeito negativo na reparação dos tecidos, principalmente durante a inflamação, atuando nas células endoteliais prejudicando a sinalização celular e retardando o processo de proliferação endotelial e conseqüentemente a formação de novos vasos⁽²⁾. Por ser uma molécula solúvel e pequena, o etanol atinge facilmente todos os tecidos do organismo⁽¹²⁾. Ele interage diretamente com os componentes celulares, alterando a

função biológica, pois tem efeito direto no metabolismo oxidativo sistêmico e no processo inflamatório. Desta forma, entender a ação do etanol na caracterização dos processos celulares e moleculares que são afetados ou interrompidos após a exposição do mesmo, é um fator importante que auxiliará no tratamento e prevenção de lesões que alteram a fisiologia do organismo^(7,13).

O consumo de uma dieta rica em gorduras está diretamente relacionado com diversas doenças metabólicas que causa prejuízos sistêmicos⁽¹⁴⁾ O aumento da massa adiposa leva à obesidade e desencadeia muitos componentes clássicos da resposta inflamatória, como citocinas inflamatórias, TNF- alfa e IL-1beta⁽¹⁵⁾. Além de todos os malefícios da dieta hipercalórica ela pode afetar a célula a nível molecular, pois interfere a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glutathione, dos ácidos graxos, fosforilação oxidativa e nas respostas imunes⁽¹⁶⁾.

Em geral o que podemos observar é que as pessoas quando ingerem álcool associam ao consumo de uma dieta rica em gordura e estes dois fatores podem retardar o processo de cura de lesões cutâneas, uma vez que, geralmente, estão associados à doenças como dislipidemias e diabetes, responsáveis pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio levando à um estresse tecidual. Além disto, ocorre diminuição na vascularização e aumento no desenvolvimento de infecções, levando ao aumento da ferida e, conseqüentemente, a formação de úlceras mais profundas que afetam os tecidos adjacentes^(17,18,19).

Existem alguns trabalhos que mostram o efeito do álcool e da dieta hipercalórica em fraturas ósseas e lesões cutâneas, porém estudos analisando a ação destes dois fatores sobre o retardo do processo de reparo cutâneo de segunda intenção ainda são escassos ou inexistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Investigar o efeito do álcool e da dieta gorda no processo de cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar, através de uma revisão sistemática os estudos existentes sobre o efeito do álcool e dieta hipercalórica no processo de reparo cutâneo e ósseo

em modelos murinos, após busca criteriosa em duas bases de dados: PUBMED e SCOPUS.

- Avaliar o efeito da dieta hipercalórica sobre os componentes celulares e extracelulares do tecido cutâneo, destacando fibras colágenas, elásticas, fibroblastos, mastócitos e vasos sanguíneos em feridas de segunda intenção de ratos Wistar.
- Avaliar do efeito do consumo de álcool sobre a quantidade de fibras colágenas, elástica, fibroblastos, mastócitos e vasos sanguíneos no tecido cicatricial de feridas cutâneas de ratos Wistar.
- Avaliar o efeito da interação entre o consumo de dieta hipercalórica e álcool sobre a quantidade de fibras colágenas, elásticas, fibroblastos, mastócitos e vasos sanguíneos no tecido cicatricial de feridas cutâneas de segunda intenção.
- Analisar o efeito da interação entre dieta hipercalórica e o consumo de álcool em marcadores bioquímicos do sangue, destacando triacilgliceróis, glicose, AST e ALT.
- Analisar o efeito do consumo da dieta hipercalórica e álcool em marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído e proteínas carboniladas.
- Avaliar a ação do consumo de dieta hipercalórica e álcool na atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e glutathione-s-transferase durante o reparo cutâneo.
- Avaliar a variação de peso, índice de massa corporal e a eficiência alimentar dos animais tratados com álcool e dieta hipercalórica.
- Avaliar os efeitos do consumo de álcool e dieta hipercalórica na produção da citocina pró-inflamatórias TGF- β no tecido cicatricial de feridas cutâneas de ratos.
- Correlacionar à quantidade de fibras colágenas, elásticas, fibroblastos e vasos sanguíneos, com os níveis teciduais de TGF- β no tecido cicatricial nos grupos que receberam álcool e dieta hipercalórica.

3. REFERENCIAS:

1. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 27-51. 2005.

2. Curtis BJ, Hlavin S, Brubaker AL, Kovacs EJ, Radek KA. Episodic Binge Ethanol Exposure Impairs Murine Macrophage Infiltration and Delays Wound Closure by Promoting Defects in Early Innate Immune Responses. *Alcoholism Clinical And Experimental Research*, 1347-1355. 2014.
3. Deshpande KT, Liu S, McCracken JM, Jiang L, Gaw TE, Kaydo LN, Richard ZC, O'Neil MF, Pritchard MT. Moderate (2%, v/v) Ethanol Feeding Alters Hepatic Wound Healing after Acute Carbon Tetrachloride Exposure in Mice. *Biomolecules*, 1-20. 2016.
4. Wang J, Zhao M, Liang R, Zhang Z, Zhao H, Zhang J, Li T, Li Y. Whey peptides improve wound healing following caesarean section in rats. *British Journal of Nutrition*, 1621-1627. 2010.
5. Pereira GG, Detoni CB, Balducci AG, Rondelli V, Colombo P, Guterres SS, Sonvico F. Hyaluronate nanoparticles included in polymer films for the prolonged release of vitamin E for the management of skin wounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-9. 2016.
6. Gantwerker EA and Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 441-453. 2011.
7. Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radk KA, Jons MK, Kovachs EJ. Alcohol Exposure and Mechanisms of Tissue Injury and Repair. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 392-399. 2011.
8. Su Y, and Richmond A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of skin Wounds, *Advances in Wound care*, 631-640. 2014.
9. Amar MB, and Wu M. Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing. *Journal of the Royal Society Interface*, 1-7. 2014.
10. Mendonça RJ, Netto JC. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 257-262. 2009.
11. Perreira LO, Francischi RP, Júnior AHL. Obesidade: Hábitos nutricionais, Sedentarismo e resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 111-127. 2009.

12. Júnior AA, Chirrelo PG, Bernardes MSM. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, 434-449. 1998.
13. Teixeira FB, Santana LN, Bezerra FR, De Carvalho S, Fontes-Júnior EA, Prediger RD, Crespo-López ME, Maia CS, Lima RR. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *PLoS One*, 1-8. 2014.
14. Jakobsdottir G, Xu J, Molin G, Ahrne´ S, Nyman M. High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects. *PLoS One*, 1-16. 2013.
15. Xiumin Li, Li Z, Xue M, Ou Z, Liu M, et al. Fructus Xanthii Attenuates Hepatic Steatosis in Rats Fed on High-Fat Diet. *PLoS One*, 1-8. 2013.
16. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, Klaassen CD. Effect of Diet on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation in Mouse Liver Insights into Mechanisms of Hepatic Steatosis. *PLoS One*, 1-17. 2014.
17. Guo S and DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 219-229. 2010.
18. Ramadan G, E-Beih NM, Abd E-Kareem HF. Anti-metabolic syndrome and immunostimulant activities of Egyptian fenugreek seeds in diabetic/obese and immunosuppressive rat models. *British Journal of Nutrition*, 995-1004. 2011.
19. Leite SN, Leite MN and Caetano GF. Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. *Lasers in Medical Science*, 1481-1488. 2015.

ARTIGO 1:

High-Fat Diet and Alcohol in the Cutaneous and Bone Tissue Repair: A Systematic Review of Murine Models.

Abstract

The chronic alcohol intake, associated with an inappropriate diet can cause lesion in multiple organs and tissues, complicating the tissue repair process. On this work, we proceeded a review of the literature related to the effect of alcohol and high fat consumption on the cutaneous and bone tissue on mice and rats and, we compared the main utilized methodologies and the most important parameters to describe the cure. We selected reported studies using a MEDLINE/PubMed and Scopus databases on the literature search. We excluded studies related to other pathologies and other organs, as well as other experimental animals, the ones that did not present a full-text available and secondary studies and articles in Chinese, German and Russian. We assessed the quality of the included studies using the criteria in the ARRIVE guidelines for Reporting Animal Research. In general, the animals that received high fat diet and alcohol presented decreased cutaneous wound and bone fracture healing, reduced wound closure, delayed contraction, chronic inflammation and incomplete reepithelization. In future studies, standardized experimental design and reporting would help to establish comparable study groups and advance the overall knowledge base, facilitating the translatability of animal data to the human clinical condition.

1. Introduction

The cutaneous and bone repair process occurs through a complex interaction between cells, extracellular matrix, blood vessels and growth factor [1,2]. On both examples of tissue repair, we can highlight the homeostasis, inflammatory and proliferative phases, which, besides being analyzed as distinct phases, usually overlap each other in a natural process [3,4,5].

During each of the phases, the biological processes are regulated by signalization molecules that can be categorized into three groups: (1) pro-inflammatory cytokines, (2) member of the family of beta-transforming growth factor (TGF- β), and (3) angiogenic factors. All cytokine groups and other proteins perform important biological activities, which stimulate proliferation and interaction between different cell types [6,7].

Inflammation is an important phase of the cutaneous and bone cicatricial process, since cell recruitment from the immune system for the removal of microorganisms and dead cells from the injured area occurs at this stage. The main cells that develop these functions are macrophages and neutrophils, which release Reactive Oxygen Species (ROS), maintain asepsis and prevent infections [8]. These cells also release cytokines and chemokines, which function as intra-cellular, and signalize to attract others important cells to the repair process [6,7,9].

During the third phase of the cutaneous cicatrization process, named proliferative phase, angiogenesis takes place, so as to feed the new tissue [10,11,12]. The production of the new matrix, with the synthesis of III collagen, fibronectin, tenascin, laminin and glycosaminoglycans, which will form the granulation tissue, starts during the angiogenesis. Associated to that, the closing of the wound by the myofibroblasts and keratinocytes[12,13,14] also take place. The Macrophages that appear during the inflammatory stage play an important role in proliferation, since they become continuous sources of cytokines, which stimulates the proliferation of fibroblasts and other cells[15,16]. In relation to bone tissue, mesenchyme stem cells should be recruited. After proliferation, they differentiate in osteogenic cells. These cells are generally derived from the bone marrow and adjacent soft tissues [17,18]. Bone morphogenic protein -2 (BMP-2) plays a key role in this recruitment [19,20], Other proteins, such as BMP-7, also perform a significant function in the process [19].

The remodeling phase is the longest. In it, type III collagen is replaced by type I collagen by fibroblasts, which increases the force of the wound [5,14]. During this phase, the number of blood vessels decreases, the strength of the wound increases and it closes completely [21]. At this stage, the myofibroblasts remodel the injured area, thus organizing and aligning the collagen fibers, producing a new tissue similar to the original one [22,23]. In relation to the bone, the consolidation of the fracture consists in an intramembranous and endochondral ossification, characterized by the formation of cartilaginous callus, which will eventually lead to its mineralization and reabsorption. Then, a granulation tissue is formed, with high concentration of fibrin. The endochondral ossification between the limits of the fracture and the periosteal takes place within it [24,25].

In some animal models, the peak of the formation of soft callus occurs between 7-9 days after a trauma, with increased collagen, elastin and proteoglycans. At the same time, a sub periosteal response to the intramembranous ossification occurs directly adjacent to the edges of the fracture, forming a hard callus. The transition of the hard callus to the center of the fracture provides a semi rigid structure that reinforces the fracture, making it more resistant to weight [26].

Nowadays, it is known that life style and diet are conditions directly involved in the balance of the body, and excessive consumption of fat food and alcoholic beverages are directly related to several pathological conditions, such as obesity, type 2 diabetes, insulin resistance, coronary disease and fatty liver (Hepatic steatosis) [27,28]. A fat-rich diet can affect the tissues systematically and impair body functioning, once excess fat can induce the apoptosis of hypothalamus cells and change the homeostasis maintained by the regulation of this gland [29,30]. Therefore, the delay in the cutaneous and bone repair process can be highlighted, since high-fat diet consumption compromises tissue vascularization, promotes the production of free radicals, thus reducing protein synthesis, and favoring the development of inflammatory and degenerative processes [10,31,32,33].

Alcoholic beverage consumption is usually associated to poor nutritional habits. Nowadays, alcoholism is considered a public health problem, since it increases mortality rate worldwide [10,34]. Alcohol is considered a risk factor that compromises tissue repair by increasing susceptibility to infections and reducing the amount of cells of the inactive and adaptive immunological system [35,36,37]. Besides, its consumption is related to the formation of the reactive oxygen species

(ROS), which causes morphological and functional destruction of the cells [38]. A single exposure to alcohol can be harmful to the proliferative phase and reduce cell multiplication and angiogenesis, since it reduces the synthesis of proangiogenic factors [39]. Another evidence of alcohol toxicity is the increased production of metalloproteinase, MMP-9 and MMP-2 [40], and reduced proliferation of fibroblasts and collagen, which accelerate the wound closure process [11,41].

The present study is a systematic review of the pre-clinical works on skin and bone repair in mice and rats. This type of review is based on explicit and systematic method, strategy and specific intervention and is useful because it involves a thorough analysis of sets of studies relevant to a particular topic [42]. The selected works focused on the observation of the effect of fat diet and ethanol on important parameters of tissue repair, such as extracellular matrix, cell proliferation, generation of free radicals and glucose levels. Moreover, it aimed to analyze the main methodologies used to achieve these results and their main flaws.

2. Material and Methods.

2.1 Search for articles

The studies were selected through advanced search on the platforms PubMed and Scopus, on October 28, 2015 (12:45:04) (Table S1). Specific filters were used for the search on PubMed and Scopus platforms, and the terms “animal model”, “skin and bone tissue”, “alcohol” and “High-Fat Diet” were used for the search. The PRISMA guideline [43] was used in the conduct of this systematic review (Figure 1 and Figure 2). The researchers DRF, MMS and RVG independently searched PubMed and Scopus databases for all original articles about the applicability of High-fat-Diet, alcohol and skin and bone tissue repair in murine models. A search filter was initially developed for the PubMed according to the Medical Subject Headings (MeSH terms).

The commands [MeSH Terms] and [TIAB] were combined to expand the chances of finding relevant studies in the indexing process. A standardized animal filter was applied [44] to detect all animal studies in PubMed. The same search filters used for High-Fat Diet, Alcohol, regeneration tissue, Skin and bone were adapted to Scopus, along with another animal filter developed for this purpose.

The initial selection was performed by three independent investigators, who screened the abstract of all recovered papers. Duplicate studies were removed by comparing the authors, title, year and publication journal. In case doubt, the entire publication was recovered and evaluated. Only High-Fat Diet, Alcohol, regeneration tissue, Skin and bone were considered in animal models for potential inclusion in the systematic review. After initial screening, all potentially relevant studies were recovered in full-text and assessed for eligibility. Studies were excluded based on the following well-defined criteria : (I) studies exclusively investigating in vitro and human systems without the inclusion of experimental groups with other animal species, (II) studies testing the use of ethanol in extract plants, (III) full-text not available and secondary studies (i.e. literature reviews, editorials, commentaries, and letters to the editor), (IV) studies related to other pathologies and other organs, (V) Use of ethanol as a solvent for various reagents, (VI) Other experimental animals (horses, rabbits, monkeys), (VII) Use of subcutaneous sponges with polyvinyl alcohol, (VIII) Articles in Chinese, German and Russian and (IX) Cancer and full text unavailable. Eligibility was independently analyzed and disagreements were resolved by consensus. Considering a comprehensive search strategy, the reference lists of the selected relevant papers were manually screened in search for potentially relevant papers. The complete flowchart of the search strategy and the number of articles recovered in each step of the process is presented in Fig 1 (High-Fat-Diet) and Fig. 2 (Alcohol).

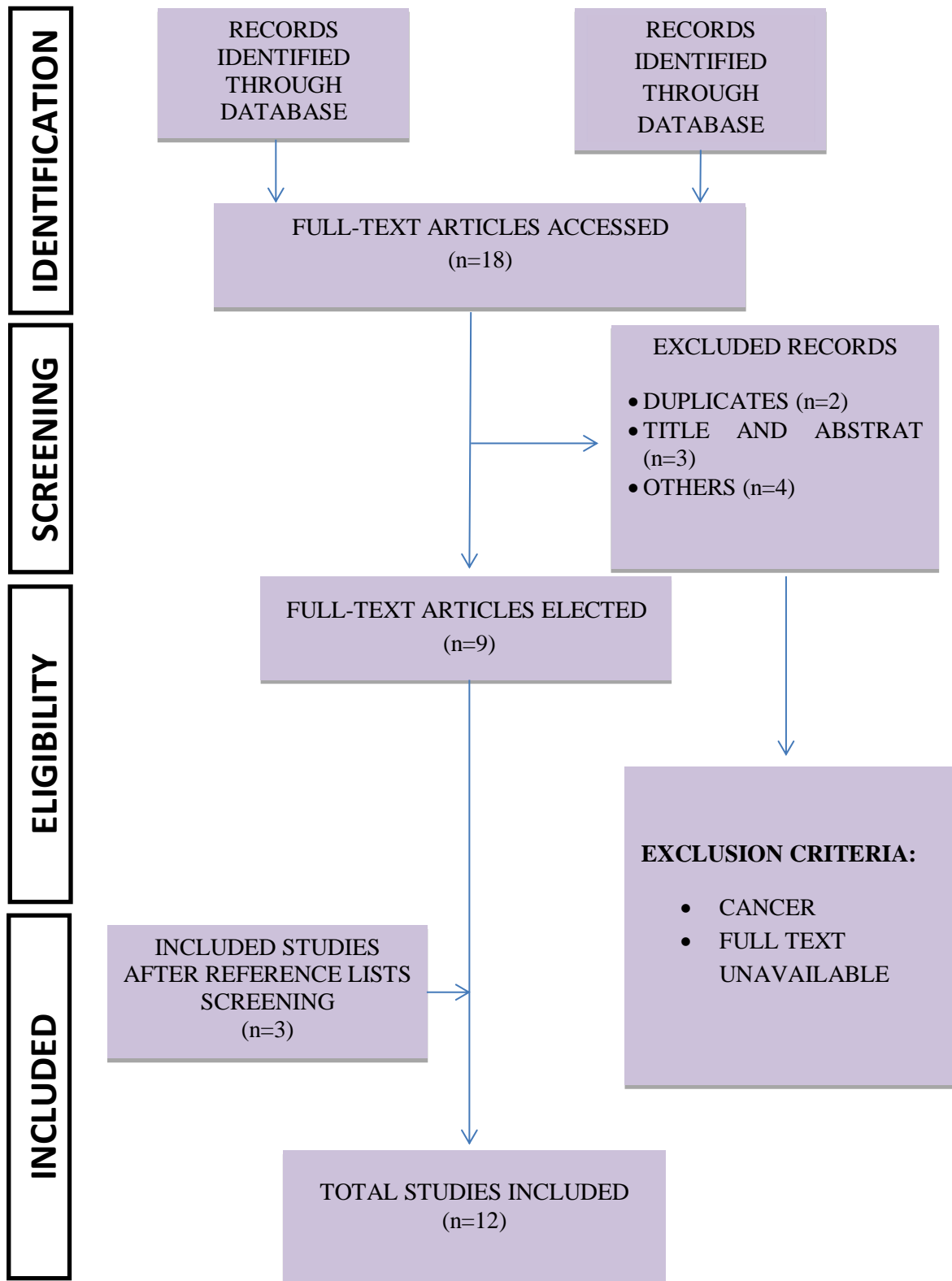


Figure 1: Items Related for Systematic Reviews (PRISMA), flow chart - High-Fat Diet.

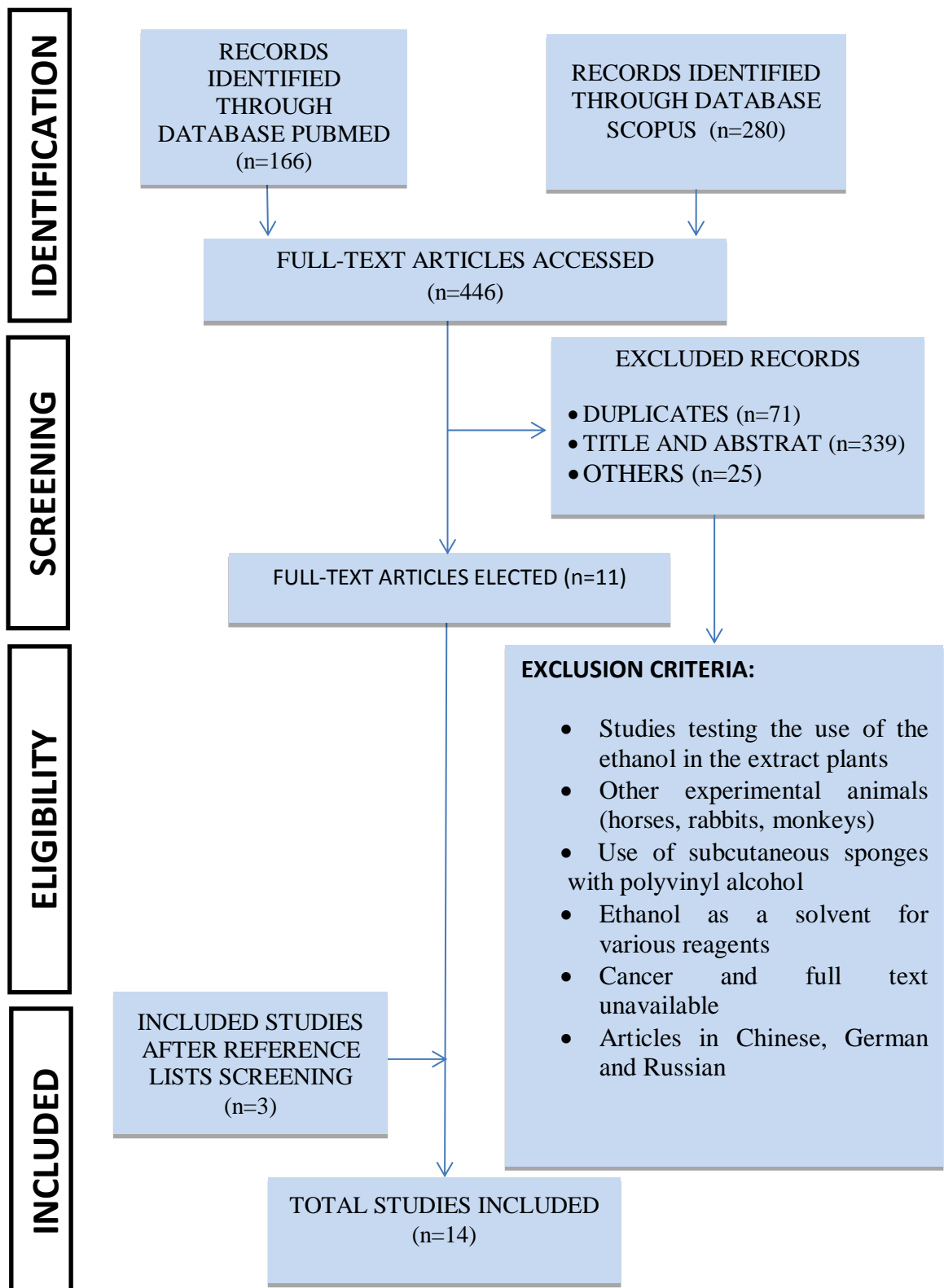


Figure 2: Items Related for Systematic Reviews (PRISMA), flow chart – Alcohol.

2.2 Study characteristics and Qualitative data

Qualitative data were extracted from all full-articles included. Data extraction was categorized as follows: (I) Publication characteristics: Author, year, journal and country; (II) Characteristics of the animal model: Species, sex, age, weight, acclimation period, accommodation of the animals, number of animals per cage, number of animals in each experimental group, (III) Characteristics of the disease model (Description of the lesions), (IV) dosimetry (dose, rout, frequency and duration of the treatment), (V) Fat-diet (composition), among other data (Table 1).

2.3 ARRIVE Analysis

We assessed the quality of the studies included using the criteria described in the ARRIVE guidelines for Reporting Animal Research. These criteria are based on the presence and short descriptions of relevant study characteristics, such as ethnical patterns, experimental procedures, sample size, animals' allocation, statistical methods, baseline data, generalizability, and funding, as described by [45]. Thus, considering the proposal of this systematic review and the specificity of the studies on this issue, a table is provided with the summary of all relevant and applicable aspects described in the ARRIVE guideline (Table 2). Four different reviewers (DRF, MMS, RVP and RDN) independently assessed the quality of all the studies, and the discrepancies were resolved by consensus. It should be noted that low assessment rates do not necessarily indicate that the experiment has not been efficiently carried out, it probably indicates inadequate reporting quality.

Table 1. Descriptors used for advanced search in PubMed and Scopus

HIGH- FAT-DIET																					
Title	Study Reference	Country	Animal model	Sex	Age	Initial Weight (g)	Frequency weight was measured	Acclimatization period	Housing of animals	Total Animal Number	Numbers of animals per box	Animal number in each experimental group	Grups experiments	Measured interval of Food intake	Time of intake of the diet	Related pathology	Randomization	Type of injury (fracture, skin incision)	Measurement interval of the lesions	Anesthesia (mg/Kg)	Significant results (p<0,05)
Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes Mellitus	Brown, et al., 2014 [46]	EUA	C57BL/6 mice	M	5 wk	?	?	?	cage	10	5	5	2	?	35 days	Diabetes mellitus	?	Tibia Fracture	?	isoflurane	Yes
Exercise Speeds Cutaneous Wound Healing in High-Fat Diet-Induced Obese Mice	Pence, et al., 2012 [47]	Urbana	C57BL/6 mice	F	6 wk	?	1,3,5 days	1 wk	cages	20	?	5	4	every 2 wk	10 days	?	?	Skin wound 6.0-mm	Daily	isoflurane in oxygen	Yes

Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice	Hiebert, et al., 2013 [48]	Canada	C57BL/6 mice	M	7 wk & 37 wk	?	?	?	cages	?	1	?	6	N	16 days	?	?	Skin wound 1cm	Daily	isofluorane/oxygen	Yes
Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice	Otranto, et al., 2012 [49]	Brazil	C57BL/6 mice	M	6 wk	23-25	?	?	?	20	?	10	2	weekly	30 wk	Diabetes mellitus	Yes	Skin wound 1 cm ²	0, 7 and 14 days	ketamine and xylazine	Yes
Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing	Nascimento & Costa, 2006 [50]	Brazil	Wistar rat	M	?	120-150	weekly	?	cages	20	1	5 and 15	2	weekly	21 days	?	Yes	Skin wound 4 cm ²	7, 14 and 21	ketamine and Xylazine	Yes
Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet	Leite, et al., 2014 [33]	Brazil	Wistar rat	M	?	180-200	?	?	polyethylene cages	12	1	3	4	0 and 45 day	59 days	?	Yes	Skin wound 15-mm	0, 2, 7 e 14 days	Tribromoethanol	Yes
Topical fentanyl stimulates healing of ischemic wounds in diabetic rats	Gupta, et al., 2015 [51]	EUA	ZDF Rats and Sprague - Dawley rats	?	11 wk	?	?	?	?	32	?	8	4	?	36 days	Diabetes mellitus	?	Skin wound 8 mm	2 every 2 days	isofluorane	Yes

Wound Healing in Mice with High-Fat Diet- or ob Gene- Induced Diabetes- Obesity Syndromes: A Comparative Study	Seitz, et al., 2015 [52]	Germany	C57Bl/6 (wild-type) and C57Bl/6 ob/ob	F	6 wk & 12 wk	15-50	?	?	cage	12	1	4	3	?	190 days	Diabetes mellitus	?	Skin wound 3-5mm	1,3,5,7 and 11 days	ketamine and Xylazine	Yes
Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity	Slavkovsky, et al., 2011 [53]	Czech Republic	ZDF rats	F & M	18-20 wk	218-366	?	?	cage	?	1	Males: 9-12; females: 8-10	4	?	30 days	Diabetes mellitus	?	Skin wound 20mm	0, 2 and 3 day	?	Yes
Obesity Impairs Wound Healing in Ovariectomized Female Mice	Holcomb, et al., 2009 [54]	USA	C57BL/6 mice	F	6 wk	?	twice weekly	?	cage	36	1	12	3	twice weekly	23 wk	Ovariectomized Mice	yes	Skin wound 6mm	every two days	ketamine and Xylazine	Yes
High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury	Mooney, et al., 2011 [55]	USA	C57BL/6 mice	M	5 wk	?	?	?	cage	?	5	4 and 9	2	?	4 months	Diabetes mellitus	?	?	monthly	ketamine and Xylazine	Yes
Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing	Nascimento & Costa, 2011 [56]	Brasil	Wistar rat	M	After weaning	30 & 60	weekly	?	?	50	?	17, 16, 17	3	Daily	22 wk	Obesity	Yes	Skin wound 1 cm ²	weekly	ketamine and Xylazine	Yes

ALCOHOL																							
Title	Study Reference	Country	Animal model	Sex	Age	Initial Weight (g)	Toxicity test	Acclimatization period	Housing of animals	Total Animal Number	Numbers of animals per box	Animal number in each experimental group	Groups experiments	Animal feed	Treatment time	Related pathology	Randomization	Type of injury (fracture, surgical incision)	Measurement interval of the lesions	Anesthesia (mg/Kg)	Significant results (p<0,05)	Dose	Administration (Vehicle)
Melatonin promotes fracture healing in the rat model	Halıcı et al., 2010 [57]	Turkey	Sprague-Dawley rats	M	?	287 - 332	?	?	cages	80	1	40	2	fed standard chow	28 days	?	yes	Tibiae Fracture	1, 3, 7, 14, 28 days	ketamine-xylazine	yes	1% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Exogenous Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Attenuates Binge Alcohol-Induced Deficient Bone Fracture Healing	Lauiing et al.,2014 [1]	USA	C57BL/6 mice	M	6-7 wk	?	?	?	cages	?	?	?	4	diet and water <i>ad libitum</i>	7 days	?	?	Tibiae Fracture	?	ketamine-xylazine	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Fracture Healing and Bone Mass in Rats Fed on Liquid Diet Containing Ethanol	Elmali et al., 2002 [58]	Turkey	Wistar rats	M	Adult	218 - 280	?	?	?	20	1	10	2	?	8 wk	?	?	Skin wound 1mm	?	Chloral hydrate	yes	2.4%, 4.8% and 7.2% (v/v)	Orally (in diet)
Effect of Acute Ethanol Exposure on the Dermal Response Inflammatory After Burn Injury	Faunce et al. 2003 [36]	USA	B6D2F1 mice	M	8–10 wk	25–30	?	?	?	?	?	?	?	water <i>ad libitum</i>	?	Bacterial infection	?	Skin wound 12 cm ²	?	?	yes	20%(v/v)	intraperitoneal (saline)

Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing	Radek et al., 2005 [39]	USA	BALB/c mice	F	8-9 wk	17-21	?	?	?	10	?	4 and 6	2	?	21 days	?	?	Skin wound 12-cm ²	7 days	Nembutal	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Alcohol Inhibits Osteopontin-dependent Transforming Growth Factor-1 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells	Driver et al., 2015 [59]	USA	C57BL/6 mice	M	6-7 wk	?	?	1 wk	cages	?	?	?	2	Feed and water <i>ad libitum</i>	10 days	?	?	Tibiae fracture	7 days	ketamine-xylazine	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Acute Alcohol Exposure Impairs Fracture Healing and deregulates b-Catenin Signaling in the Fracture Callus	Lauing et al., 2012 [6]	USA	C57BL/6 mice	M	6-7 wk	?	?	1 wk	cages	?	?	?	2	Feed and water <i>ad libitum</i>		?	?	Tibiae fracture	6,9,14 days	ketamine-xylazine	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Mesenchymal Stem Cells Facilitate Fracture Repair in an Alcohol-Induced Impaired Healing Model	Obermeyer et al., 2012 [61]	USA	C57BL/6 mice	M	6-7 wk	?	?	?	cages	?	?	?	2	?	2 wk	?	?	Tibiae fracture	?	buprenorphine	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Fibroblast Function and Wound Breaking Strength is Impaired by Acute Ethanol Intoxication	Ranzer et al., 2011 [11]	USA	BALB/c mice	F	6-8 wk	17 & 21	?	?	?	?	?	?	2	?	35 days	?	?	Skin wound 3-mm	5, 7, 10, 14, 21, 28, 35 days	ketamine-xylazine	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)

Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption	Chakkalaka et al., 2005 [62]	USA	Wistar rats	M	11 - 12 wk	327 - 387	Yes	3-day	cages	44	1	4 and 5	9	Feed and water between 8 and 11 am. surgery	7 wk	?	?	fibula fracture	end of the experiment	ketamine-xylazine	yes	26% and 36% (v/v)	orally (in diet)
Ethanol exacerbates T cell dysfunction after thermal injury	Choudhry et al., 2000 [63]	USA	C57BL/6 mice	M	8 - 10 wk	?	?	?	?	?	?	?	4	?	?	?	yes	Skin wound 15% of the total body surface area	?	sodium pentobarbital	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)
Effects of Acute Ethanol Exposure on the Early Inflammatory Response After Excisional Injury	Fitzgerald et al., 2007 [20]	USA	BALB/c mice	F	8-9 wk	?	Yes	?	?	8	?	3 and 5	2	?	24 hours	?	?	Skin wound 3-mm	6, 12, 24 hours	Nembutal	yes	?	intraperitoneal (saline)
A Role for ethanol-Induced Oxidative Stress in Controlling Lineage Commitment of Mesenchymal Stromal Cells Through Inhibition of Wnt/b -Catenin Signaling	Chen et al., 2009 [64]	USA	Sprague-Dawley rats	M	Recen born	250 - 300	?	?	cages	16	?	8	2	?	4 wk	?	?	left tibiae, and left femur	?	?	yes	?	intragastric cannula (water)
Identification of Novel Bone-Specific Molecular Targets of Binge Alcohol and Ibandronate by Transcriptome Analysis	Himes et al., 2009 [65]	USA	Sprague Dawley rats	M	6 wk	375 - 399	?	1 wk	cages	72	2	12	6	?	4 wk	?	yes	adjacent lumbar vertebrae	?	Ibandronate	yes	20% (v/v)	intraperitoneal (saline)

Table 2. Table Arrive

Study Quality																											
Title	Brown, 2014 [46]	Pence, 2012 [47]	Hiebert, 2013 [48]	Orranto, 2012 [49]	Nascimento, 2006 [50]	Leite, 2014 [33]	Gupta, 2015 [51]	Seitz, 2010 [52]	Slavkovsky, 2011 [53]	Holcomb, 2009 [54]	Mooney, 2011 [55]	Nascimento & Costa, 2011 [56]	Haltci, 2010 [57]	Lauing, 2014 [1]	Elmali, 2002. [58]	Faunce, 2003 [36]	Radek, 2005 [39]	Driver,2012 [59]	Lauing, 2012 [60]	Obermeyer, 2012 [61]	Ranzer, 2011 [11]	Chakkalakala, 2005 [62]	Choudhrya, 2000 [63]	Fitzgerald, 2007. [20]	Chen, 2009 [64]	Himes, 2009 [65]	
Accurate and concise description of the content of the article	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	96,1%
Abstract																											
Summary of the background, research objectives, methods, principal findings, and conclusions		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓			76,9%
Introduction																											
Sufficient scientific background	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	92,3%
Explanation of the experimental approach and rationale	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	84,6%
Objectives																											
Clear primary and second objectives	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓	✓	✓	88,4%
Materials and Methods																											
Nature of the ethical review permissions, relevant licenes and national or institutional guidelines for the care and use of animals	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	96,1%
Study design																											
Number of animals per group	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓				✓				✓	✓		✓	✓	✓	61,5%
Information on whether the experimental was performed as a blind controlled study		✓					✓						✓	✓	✓			✓	✓		✓			✓		✓	34,6%
Experimental procedures																											
Description of the Treatment (Diet or Etanol)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100%
Dosage of treatment	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	96,1%
Duration of treatment	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	92,3%
Time of day of administration of treatment	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓					✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	73,0%

Experimental animals																								
Information regarding animal species	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	96,1%
Strain of the animals	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100%
Sex of the animals	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	96,1%
Weigth range of the animals		✓			✓			✓		✓	✓		✓	✓	✓				✓			✓	✓	46,1%
Age of the animals	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	80,7%
Description of genetic modification status (Knock-out, transgenic, SPF)				✓			✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	53,8%
Information related to previous procedures performed on the animals		✓					✓	✓	✓				✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	53,8%
Housing and husbandry																								
Housing of experimental animals (type of facility, type of cage or housing, material, number of cage companions)	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓		✓		✓	✓	69,2%
Husbandry conditions (breeding programme, lighth/dark cycle, temperature, of water)	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓		61,5%
Welfare-related assesements and interventions that were carried out before, during, or after the experiment		✓											✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	38,4%
Sample size																								
Total number of animals used in each experimental and the number of animals in each experimental group	✓	✓		✓			✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓		✓	✓	65,3%
Explanation regarding the decision of the number of animals and details of sample size calculation																								0,00%
Allocating animals to experimental groups																								
Full details of how animals were allocated to experimental groups (including randomisation or matching)				✓	✓	✓			✓		✓	✓		✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	50,0%
Order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed										✓														
Experimental outcomes																								
Clear experimental outcomes assessed	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	88,4%
Statistical methods																								
Statistical methods used for each analysis	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100%
Specification of the unit of analysis for each dataset	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓			✓	✓			✓	✓			✓	57,6%

3. Results

3.1 PRISMA Guideline

The search strategy applied to all databases provided 464 abstracts from potentially relevant studies. From this total, 339 studies addressed alcohol, while 3 on High-Fat-Diet were excluded due to no compliance with the subject investigated (Title and abstract). Thus, 73 studies were screened for the discard of duplicated registers and the full texts were recovered and subjected to eligibility analysis. Twenty studies were included in the systematic review, and their reference lists were screened to identify additional relevant studies that were not recovered in the initial search strategy. Three studies on alcohol and three on High-Fat-Diet were included in the systematic review, after the screening of the reference lists and account for 23% (n=6) of all relevant studies. Thus, 26 pre-clinical relevant studies using animal models on high-fat diet and alcohol effect on skin and bone repair, conducted from 2000 to 2015, were included in this review and used for data collection. The general characteristics of these studies are shown in Figures 1 and 2.

3.2 Qualitative data

The studies obtained were conducted in 7 different countries, mainly the United States of America (EUA), 61,5% (n= 16), followed by Brazil 15,4%, (n= 4) and Turkey 7,7%, (n=2). The other studies were from Canada, 3,8%, Germany and Czech Republic, 3,8% (n=1) from each country. Rats 38,4% (n=10), and mice 61,6% (n=16) were mainly used as experimental models. . The main mice strains cited were C57BL/6, which accounted for 46,2% (n=12); BALB/c, 11,5% (n=3); and B6D2F1, 3,8% (n=1) (Figure 3). Regarding the studies that used rats, Wistar rats accounted for 19,3% (n=5); Sprague-Dawley, 11,5% (n=3) and ZDF, 3,8% (n=1). Only one study used both Sprague-Dawley and ZDF (3,8%) rats. As for the sex of the animals used, 69,2% used male (n= 18); 23,1%, female (n= 6), and 3,8% male and female (n=1) animals. Only one study did not provide this information (3,8%). The age of the animals ranged from 5 to 37 weeks for the mice, and from newborn to 20 weeks of age for rats. This variable was neglected in three studies (11,5%). The body mass of the animals can be found in the 15-60g interval for mice, and 120-399g interval for rats. 46,1% of the studies (n=12) did not report weight. In relation to the diet, the higher the fat concentration, the smaller the time of administration. On verage, when

the diet contained 60% of saturated fat, its administration occurred for 12-77 weeks, while when the diet presented less fat (21,2% saturated fat), it was administrated on average for 30 weeks. In most studies (64,2%), the concentration of alcohol was 20% (vv), n=9, while other studies presented greater concentration variations. Regarding pathologies, 23% (n=6) of the studies indicated Diabetes mellitus as the pathology most associated with the repair process, while 65,5% (n=17) of the studies presented no associated pathologies (Figure 3).

Schematic representation of data obtained from the studies High-Fat-Diet and Alcohol

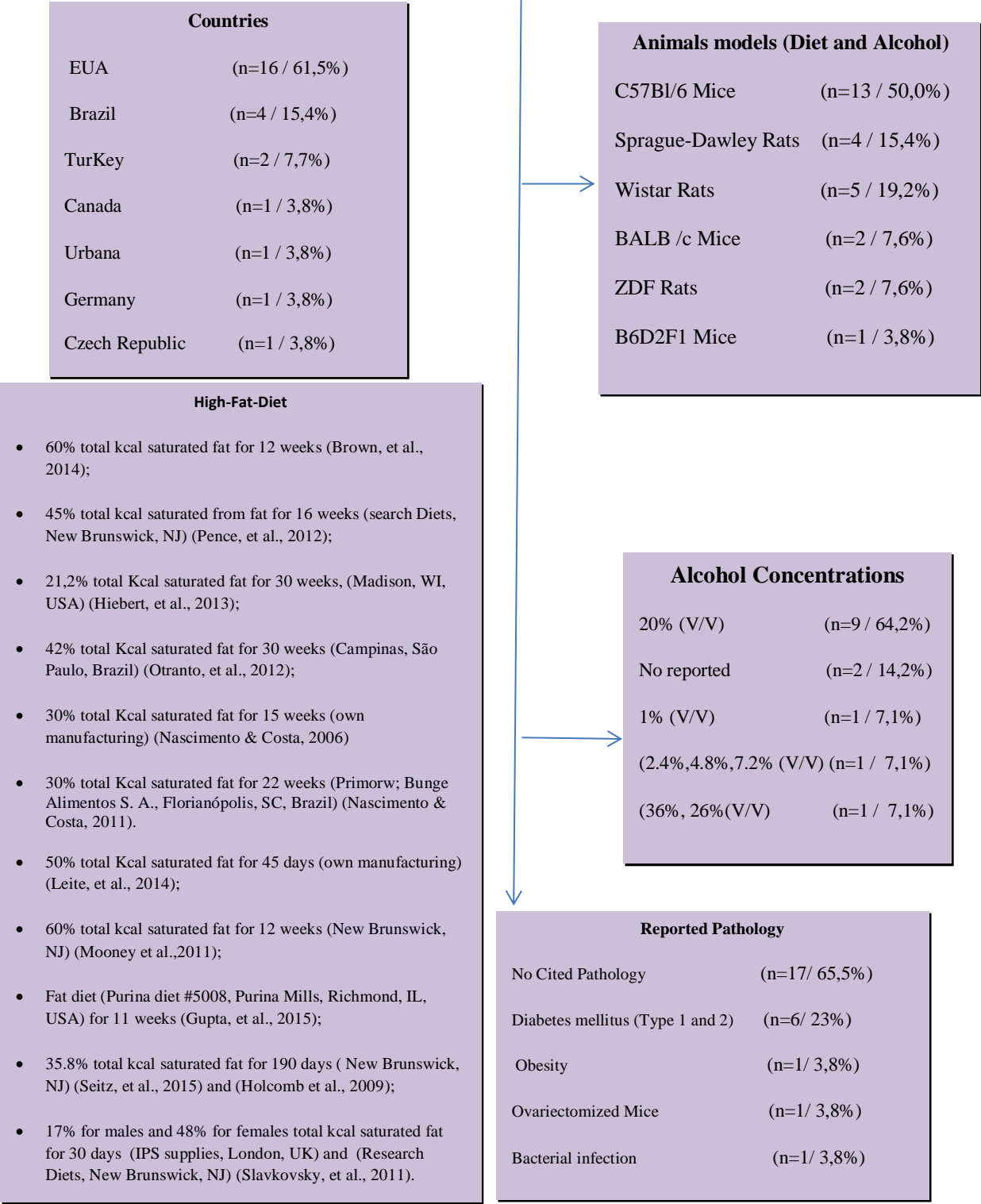


Figure 3: Summary all data obtained from reading the selected articles

Most studies mentioned that the animals were allocated in cages 65,4% (n=17) and the works that did not report the animals' housing account for 34,6% (n=9). The total number of animals of the experiment was not described by 38,5% (n=10) of the studies, and the number of animals per box was not mentioned in 53,8% (n=14). In relation to randomization, 69% (n=18) of the studies did not mention how the animals were distributed in the groups. The number of animals in each experimental group was not reported in 27% (n=7). As for the type of injury, fracture or skin incision, 65,5% (n=17) described skin injuries and 34,6% (n=9) reported bone lesions. Lesion measurement intervals were reported by 69,2% (n=18) of the studies. The anesthetics commonly used in the studies were ketamine and xylazine 46% (n=12) and Isoflurane 15,3% (n=4). The food intake measurement interval of the groups treated with the high fat diet were described in 42% (n=5) of the studies. In the groups that received alcohol, it was mainly conducted intraperitoneally, 78,6% (n=11) and orally, 14,2% (n=2) (Table 1).

3.3 Bias Analysis.

The ARRIVE guidelines were used to analyze the main weaknesses of the work. The results showed that the selected works generally presented an accurate title (96,2%), abstracts containing objectives, methods, main findings and conclusions (76,9%) and introduction with sufficient scientific background (92,3%). In the experimental procedures, all studies reported the type of treatment, Diet or Alcohol, (100%), dosage (96,2%) and duration of treatment (92,30%). However, only 46,2% informed the weight range of the animals, and 53,8% informed the genetic modification status and provided information related to previous procedures performed in the animals. In relation to housing and husbandry, 69,2% of the studies related the type of cage, number of cages, light-dark cycles, temperature and water. None of the studies reported the details of the sample size calculation. Full details about the allocation of the animals in experimental groups, including randomization or matching, were described in only 50% of the studies. The statistical methods used for each analysis were described in all of the studies, but only 57,6% specified the unit of analysis for each dataset. Only 27% of the studies explained the criteria for the exclusion of animals or data. Information about the mean and standard deviation was given in 62,5% of the studies.

Modifications in the experimental protocols, aiming to reduce adverse events and information regarding the mortality of experimental animals were described in only 15,3% of the studies. Comments on study limitations, such as sources of bias, limitations of the animal model and inaccurate results found in only 23% of the studies. Comments on how the findings are likely to benefit other species or systems, including relevance to human biology, were observed only in 31% of the works (Table 2). In general, the animals that received high-fat-diet presented decreased wound and bone fracture healing, reduced wound closure, delayed contraction, chronic inflammation and incomplete reepithelization. Besides, the collagen fibers were less organized and less dense and the hydroxyproline content was reduced. In relation to the bone, increased occurrence of osteophytes and reduced bone callus were observed, and 33,3% of the studies did not analyze extracellular matrix compounds. The groups treated with high-fat-diet also presented increased body weight and blood glucose and 25% of the studies did not analyze blood glucose levels. In relation to alcohol, the main results demonstrate that alcohol consumption decreases bone callus and reduces biomechanical strength, endochondral ossification and bone mineral density. The rates of reepithelization, fibroblast proliferation, neutrophil infiltration and macrophage inflammatory protein 2 were lower in the groups treated with high fat diet when compared to the controls. Among the extracellular matrix compounds, reduction was observed in myeloperoxidase activity, hydroxyproline and hyaluronic acid contents, callus formation and tissue mineral density.

The use of alcohol also affected the chemical mediators released in the tissue. The production of TNF- α , FGF-2, IL-2 and Lysyl oxidase decreased in groups treated with alcohol. The levels of Wnt, β -catenin and bone signalizes were also reduced after treatment with alcohol. 28,5% of the selected studies did not perform the analysis of extracellular matrix components and cytokines. The oxidative stress parameters were analyzed only in 14,3% of the studies, and the main results showed increased levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and protein carbonyl contents after alcohol consumption (Table 3). The main results were schematized and demonstrate that high-fat-diet promotes delays the wounds healing, wounds healing reduction (46-51,53,54), reduced extracellular Matrix components with reduction in the collagen synthesis (33,48,49,50,51,53,54), weight increase (46-50,53,54) and high glucose levels in blood vessels (33,47,50,52-54). Similarly it was

observed that the alcohol consumption decrease wound healing, biomechanical strength, reepithelization and fibroblast proliferation (1,11,20,39,57,60,62-64).

Decrease myeloperoxidase activity, hydroxyproline, hyaluronic acid and tissue mineral density (1,11,39,57,59,61-64), reduction of the chemical mediators: TNF α , FGF-2, IL-2 and Lysyl oxidase, Wnt, β -catenin signaling in the bone (1,11,20,39,59,60,63-65) and increase of the Malondyaldeido, Superoxide dismutase, protein carbonyl and Weight gain (54,57,62,65) (Figure 4).

Table 3. Representation of the principal results found in the articles.

HIGH-FAT-DIET				
Study Reference	Rate of Wound Healing	Extracellular matrix components analyzed	Weight	Glucose test
Brown et al., 2014 [46]	HFD-fed mice with tibia fractures showed decreased woven bone at day 28 by histomorphometry and decreased callus bone volume at day 21 by microcomputer tomography.	?	HFD-fed mice presented increased body weight.	The HFD group exhibited elevated levels of blood glucose.
Pence et al., 2012 [47]	The HFD-fed mice impaired wound healing, with larger wound sizes. However, wound size was significantly smaller in obese mice exercised compared with other groups.	?	HFD, body weight was significantly higher than those of the control group.	The HFD group exhibited elevated levels of blood glucose, when compared to others groups.
Hiebert et al., 2013 [48]	HFD exhibited reduced wound closure, the delayed contraction; chronic inflammation compared with the others groups.	The HFD-fed mice demonstrated less collagen and decorin, and reduction of the closing wounds compared with the controls. Animals treated with the Granzime B and HFD presented increases the fibronectin and vitronectin compared with the Wild-type animals.	ApoE knockout (AKO) mice and fed a HFD presented weight increase when compared to AKO mice not fed HFD.	?

Otranto et al., 2012 [49]	The wound area was 27% greater in the high-fat chow (HFC) group 7 days, and 110% greater in the 14 days after wounding when compared with the standard chow (SC) group.	The collagen fibers were less organized and less dense in the HFC group. Hydroxyproline levels were lower in the high-fat chow (HFC) group.	Starting from the 8th week, the HFC group had a higher body weight.	The blood glucose of the HFC group was higher than the SC group.
Nascimento & Costa, 2006 [50]	21 days after wounding, the wound area in the fat diet group was 32% higher, indicating less contraction.	The density of collagen fibers was higher in the control group than in the fat diet group.	The body weight gain, in the fat diet group, was significantly greater than in the control group.	Blood concentration of glucose was not different between the groups throughout the experiment.
Leite et al., 2014 [33]	The wound healing rate were reduced in animals treated with hyperlipidic diet and laser off, when compared to the others groups.	The hydroxyproline content was reduced in the groups treated with the hyperlipidic diet and laser off among groups.	There was no difference in the body mass of the animals after 45 days on a high-fat diet.	A higher serum glucose level, were observed in hyperlipidic group.
Gupta et al., 2015 [51]	Fentanyl treatment resulted in complete reepithelialization and dense granulation tissue in the wound scars on day 36 in diabetic rats treated with high fat diet.	Masson's trichrome staining demonstrated increased collagen content in fentanyl treated wounds as compared to PBS in diabetic rats treated high fat diet.	?	?
Seitz et al., 2015 [52]	The rats HFD-fed showed an area of greater and wound epithelialization incomplete in the end of the experiment, compared with the other groups.	?	The uptake of the HFD caused a significant increase in body weight.	The HFD group exhibited elevated levels of blood glucose.

Slavkovsky et al., 2011 [53]	Scar size in fed high-fat diet animals was significantly increased: by 40% in males and by 140% in females.	The hydroxyproline, tropoelastin and procollagen content were reduced in diabetic groups (HFD). MMP3 and MMP13 (matrix metalloproteinase) and MPO (myeloperoxidase) were increased in animals with the fed HFD.	The body weight in animals fed HFD was increased in both sexes and the difference was more pronounced in females, being twice that of the control.	The high-fat diet animals group, presented elevated glucose levels, when compared to control.
Holcomb et al., 2009 [54]	HDF fed animals and ovariectomized (OVX) presented 61% of the wound open, when compared to NOVX and HFD fed mice that presented 34% of the wound open.	?	OVX mice treated with high-fat diet presented higher final body weights than NOVX mice treated with HFD.	?
Mooney et al., 2011 [55]	The HFD was associated with accelerated osteoarthritis (OA), and with major loss of cartilage relative to the control groups.	Large progressive meniscal calcification, and a increased presence of osteophytes in both HFD groups relative to the diet controls.	Mice on the HFD weighed 29% more than those on the lean diet.	Blood glucose levels were increase in the diabetic treated with the HFD group.
Nascimento & Costa 2011 [56]	The diet-induced obesity (DIO) group, showed no sign of re-epithelialisation. The percentage of the re-epithelialised wound area was lower in the DIO groups compared with the control group.	In the diet-induced obesity (DIO) and diet-resistant (DR) groups, hydroxyproline levels were lower 7 d after wounding and increased slightly 14 d after wounding.	The diet-induced obesity (DIO) group presented a higher average body weight, than the diet-resistant (DR) group.	The blood glucose level of the diet-resistant (DR) group was lower than the glucose levels of the control and diet-induced obesity (DIO) groups.

ALCOHOL

Study Reference	Histopathological evaluation	ECM components analyzed	Cytokines	Oxidative Stress	Weight
Halıcı et al., 2010 [57]	In the group treated with alcohol and Melatonin two animals with complete cartilaginous union, five with incomplete bony union and one with complete bony union.	Myeloperoxidase activity decreased in the group treated only with the alcohol, when compared with the melatonin group.	?	The groups treated only with ethanol presented increase of the Malondyaldeido (MDA) and superoxide dismutase (SOD), when compared with the melatonin group.	?
Lauing et al., 2014 [1]	Alcohol promotes decreased callus biomechanical strength, and reduced cartilaginous callus formation.	In the alcohol treatment group, there was smaller amount of external callus tissue and decreasing the cartilaginous component.	Alcohol-exposed mice exhibited a significant increase in the amount of callus-associated hyperphosphorylated β -catenin compared with saline controls.	?	?
Elmali et al., 2002 [58]	The group treated with ethanol had a lower fracture healing rate when compared with the control group.	Rats fed a liquid diet containing ethanol decreased bone density and mineral content.	?	?	There was no difference in weight between the group treated with alcohol and control group.

Faunce et al., 2003 [36]	The neutrophil content of the skin of mice after burn injury was not significantly difference with of ethanol treatment, when compared to others groups.	?	Myeloperoxidase (MPO) content was not different compared to other groups. The production of TNF from mice that received ethanol exposure was lower than other groups.	?	?
Radek et al., 2005 [39]	Reepithelization was lower in the groups treated with the Ethanol, when compared to the control groups, but does not inhibit keratinocyte migration across the wound bed.	Hydroxyproline, was significantly reduced at day 7, in wounds from ethanol-treated animals compared with control.	The level of FGF-2 was lower in wounds from ethanol-treated mice and VEGF levels were significantly higher in wounds from ethanol-treated mice compared with the control.	?	?
Driver et al., 2015 [59]	?	The fracture from Ethanol-treated mice, showed decrease in callus formation and reduced new bone deposition.	The exposure to Ethanol, reduced activity of the TGF- β 1.	?	?
Lauing et al., 2012 [60]	It was observed a significant 47% reduction in the volume of callus tissue formed at day 14 post-injury compared to the saline group.	The alcohol exposure reduced bone mineralization and osteoblasts activity	The levels of b-catenin are significantly decreased in the groups treated with ethanol, when compared to the control group.	?	?

Obermeyer et al., 2012 [61]	Alcohol exposure resulted in a significant loss in biomechanical strength and reduced bone callus volume, and presented absence of ossification endochondral.	Evaluation of callus tissue mineral density did not reveal any significant differences between any of the treatment groups.	?	?	?
Ranzer et al., 2011 [11]	Exposure to ethanol causes decrease in fibroblast proliferation when compared in basal medium alone, impairment on the regulatory function of fibroblasts.	The levels of collagen and hyaluronic acid (HA) of the wounds in mice exposed to ethanol were significantly reduced compared to control.	Lysyl Oxidase activity (LOX) in the wounds of the mice treated with ethanol decreased significantly compared to control groups.	?	?
Chakkalakala et al., 2005 [62]	Ethanol consumption caused a reduction in tissue repair and tissue resistance. The group with the highest consumption of ethanol, resulting in poor bone healing.	The tissue of the rats that received ethanol in the diet, presented reduced in the synthesis of bone matrix and decreasing in the bone mineralization.	?	?	There was a reducing of the final weight of 17g in the groups treated with high and moderate levels alcohol, when compared to control.
Choudhrya et al., 2000 [63]	The decrease in proliferation was observed in splenocytes derived from animals subjected to the combined insult of alcohol and burn injury.	?	IL-2 production by splenocytes derived from the burn plus alcohol group of animals was suppressed compared with the splenocytes obtained from the animals the other groups.	?	?

Fitzgerald et al., 2007 [20]	The histological examination of wounds by myeloperoxidase (MPO) reveals a reduction at 12 and 24hs of the neutrophil infiltration. The analysis of the macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) reveal a reduction at 12hs, post injury in the groups treated with the ethanol	?	TNF α levels were unchanged after injury in both groups ethanol and saline-treated. IL-1 β showed variables peak levels, with reduction at 6 and 12 hs and high after 24hs in the groups treated with the ethanol.	?	?
Chen et al.,2010 [64]	Ethanol induced reduction in bone mineral density (BMD) in females rats after lactation.	Ethanol induced reduction of the osteocalcin in the cellular culture.	Ethanol induced suppression of Wnt, β -catenin signaling in bone in postlactational female rats.	Ethanol promotes adipogenesis through accumulate oxidative stress and elevates protein carbonyl content in the cells.	?
Himes et al.,2009 [65]	An acute (1 week) the alcohol treatment did not decrease vertebral cancellous or cortical BMD (Bone Mineral Density). In contrast, a chronic (4-week) there was decreased vertebral cancellous BMD in alcohol treatment.	?	Acute binge alcohol treatment significantly affected genes associated with 4 pathways including integrin, chemokine, RAS and PDGF signaling, while chronic binge alcohol modulated angiogenesis and Wnt signaling gene expression.	?	After chronic (4-week) alcohol-treatment, rats showed an approximate 4% increase in body weight compared to their baseline weight, versus an 11% increase in their respective control groups.

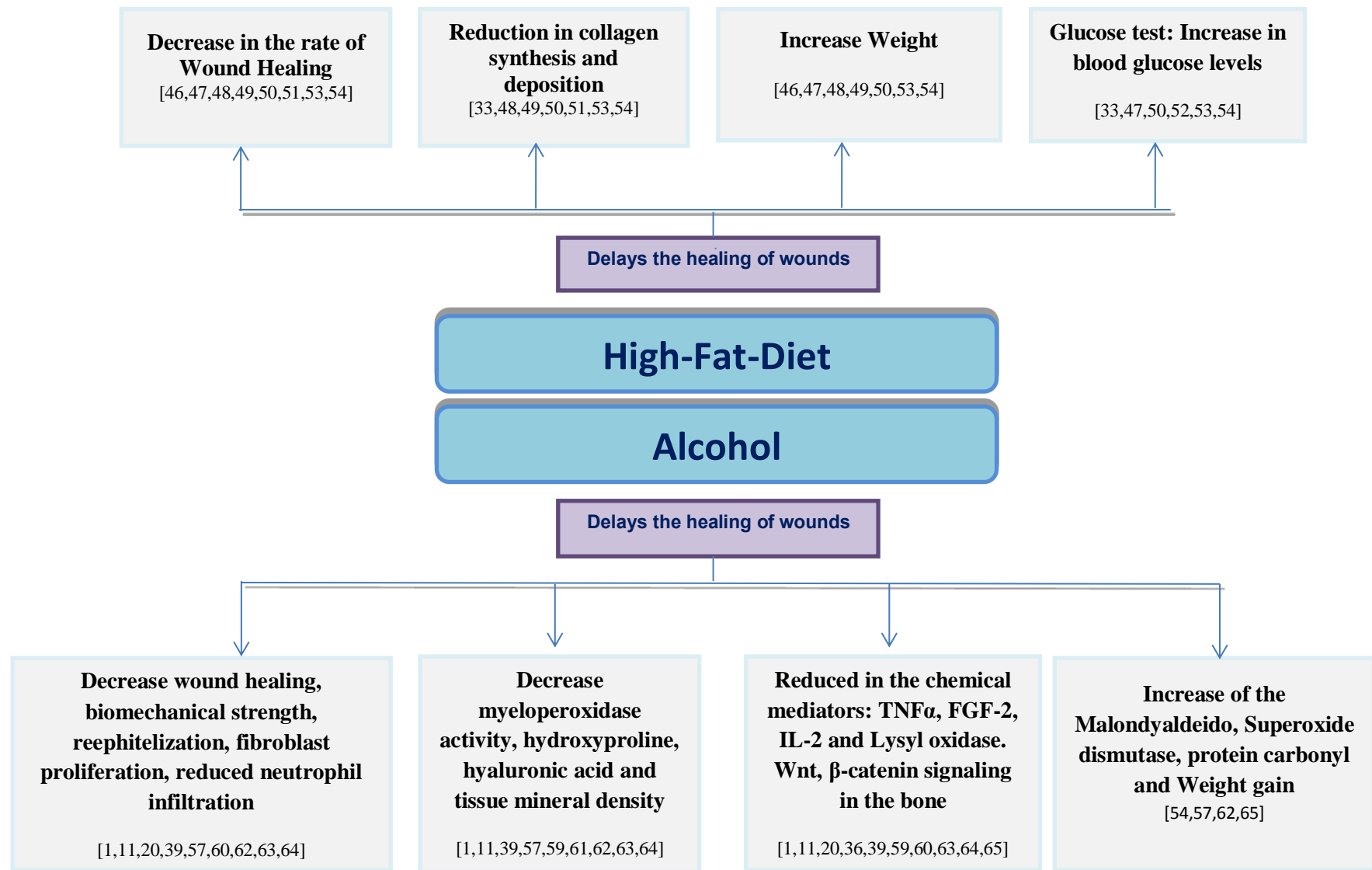


Figure 4: Flowchart of the main results of the high-fat-diet and alcohol studies.

4. Discussion

High fat diet and alcohol consumption are among the main external factors related to lifestyle that hinder the repair process of cutaneous and bone tissue. Tissue recovery becomes even more difficult when these two factors are associated [42,49]. In this study, we investigated through systematic review, the effect of high fat diet and alcohol consumption on cutaneous and bone tissue repair in pre-clinical studies, using mice and rats. 461 studies were analyzed and, after eligibility analysis, 26 were selected as relevant works, according to the proposed objective. The most important findings of the review showed the negative effects of high fat diet and alcohol consumption on the repair of cutaneous and bone wounds. These findings were defined after critical and descriptive analysis of the main parameters related to tissue repair, such as the production and organization of the extracellular matrix components, cellular proliferation, free radical production, main released cytokines and glucose levels, which are the main related parameters.

The use of the Prisma Guideline was fundamental to reach the expected results, once it allowed the selection of different works totally focused on the topic, by using a well-defined search strategy [66]. Although the difference between the species hampers the direct exploration of the applications for humans, the results of the study show the need for better controlled investigations. It is clear that the quality of the models and protocols used should be improved, mainly for the type and period of administration of the diet. Besides, the alcohol concentrations used also presented high variety and there was low specificity for the type of induced lesion. The types of wound models produced also varied widely, which hampers the selection of a model for reproduction in further works.

The general objective of systematic review works is mainly to develop means to bring together pieces of evidence from randomized clinical tests and experiments that evaluate the positive or negative effects of a certain intervention. This type of review, which is based on clinical evidence, has increased significantly in recent years. However, in the pre-clinical field, studies are still scarce and the data quality analysis of the works is still based on the criteria used in randomized clinical studies. In the present study, besides the descriptive analyses and flowcharts presenting the main findings of the papers, the ARRIVE guidelines were also used to analyze the main errors found in the description and development of the works. The evaluated

studies have two major limitations: Huge variety in the analysis parameters in the methodology and low specificity in important details, including age and weight of the animals, type and size of the wounds, diet components, alcohol concentration, among others. In the results, it was difficult to understand the description, once the studies reported different markers to present their findings. In most articles, mice were the most used animal model, probably because of their size and easy handling. Besides, it is the cheapest murine model and it is easy to take care during long experimental periods, which generally occurs in high fat diet models [67]. We observed that most studied animals were males, probably because the males present lower hormonal interference, when compared to females [40]. The hormonal problem becomes more relevant when the repair process is evaluated, once it is known that feminine hormones have a positive effect on reepithelization and tissue wound closure [68].

In relation to age and weight, there was wide variation among the studies. The age ranged from 5 to 37 weeks and the weight, from 15 to 60g for mice and from 120 to 399g for rats. This weight and age range has been commonly used in murine models, mainly because the data are related to young and healthy animals [69,70,71]. Several articles did not inform the age of the animals, the number of animals per group, period of acclimatization, or light and darkness cycles, etc. The absence of important information on the methodology may compromise the understanding of the study and restrain research reproduction. Thus, it is a limiting factor that leads to relevant methodological flaws [11].

This study showed that 67% of the studies that administered a fatty diet did not report weighting frequency, while 21,5% did not inform the time of alcohol administration. These variables are important because they affect animal physiology, which may explain the body weight gain or loss and thus the metabolic conditions [40,72]. We also observed the predominance of saturated fat in the diet and discrepant time intervals between the administrations. Such discrepancy may be associated to the different murine models used. This may jeopardize the development of further research requiring protocols that use high fat diet in the induction of metabolic problems. In our review, we found papers that induce tissue lesion using the diet for only 4 weeks, while other works needed to administer the diet for more than 25 weeks to reach similar results. The start of an adequate tissue repair process demands animals in a state of homeostasis, thus guaranteeing that

tissue nutrition and vascularization are adequate for cell and vascular proliferation [69,73].

In general, overweight animals present reduced wound closure and reduced matrix synthesis [28,55,56]. Simultaneously, our results showed that most works (64,2%) use alcohol at the concentration of 20% (vv), which can be justified by some well succeeded models described in the literature, mainly for the use in humans [1,65]. The effects of alcohol consumption on tissue destruction are well described, especially for hepatic tissues [74,75]. However, the papers analyzed are inaccurate and provide little information on cutaneous repair process, mainly because there was no trustable protocol reporting drug concentration or a pattern to analyze important parameters of cutaneous and bone repair.

The type and the size of lesions were other parameters also analyzed. Alcohol or the diet generally reduced the rate of wound closure or accentuated histopathological modifications. The analysis of these parameters pointed out the great difference between the wounds, whose incisions ranged from 3mm to 12cm. Therefore, wounds presented different sizes and forms. These are important considerations in studies on wound healing, because there are effects on concentration strength and cell quality (myofibroblasts) [76].

In relation to the time interval considered to measure the wounded area, total closure was not observed in most works, once the investigators decided to adopt long intervals (0, 2, 3, 7, 14 and 21 days), instead of carrying out the measurements on the area every day. This may have been a deterministic factor for the results found in animals. Such works differed from studies conducted with humans, who usually present wound closure rate of 100% [77]. This fact may indicate a methodological flaw, compromise the reliability of the results, and prevent many works from having their results extrapolated to human clinical conditions. Great variation was also found in studies that report bone lesions, once they use different bones, such as the tibia, fibula, femur and lumbar vertebra. The greatest flaws of the studies were disclosed in our work through the ARRIVE Guidelines (Animals in Research: Reporting in Vivo Experiments). Open-access journals have changed the publication process, by increasing research data availability. However, there is plenty of evidence that, in several areas of study, research report is insufficient, which demonstrates that, in many cases, even when there is high quality science, publications do not provide enough information for the reproduction of the works

[78]. The instructions found in the ARRIVE Guidelines (Animals in Research: Reporting in Vivo Experiments) describe the information required from all scientific publications using animals as the experimental model [45]. Therefore this may become an important tool to standardize the presentation of the methodology and results.

5. Conclusion

The results of this review showed consistently that alcohol consumption and high fat diet slow tissue repair processes in murine models. However, a wide variety was observed in the description of the methodology and results, which reveals the lack of a well-defined standard aiming at the reproduction of the work, in most cases. This broad variety of models limited the comparison of the papers, and hampered the extrapolation of the results for humans. Thus, we conclude that the questions related to the quality and amount of details in the description of the works should be analyzed during the development of further research on the area.

6. Acknowledgements

On the Coordination of Higher Education Personnel (CAPES) by scholarship granted.

7. References

- [1] K.L. Lauing, S. Sundaramurthy, R.K. Nauer and J.J. Callaci, “Exogenous Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Attenuates Binge Alcohol-Induced Deficient Bone Fracture Healing,” *Alcohol and Alcoholism*, vol.49, no.27, pp. 399–408, 2014.
- [2] C. Isaac, P.R.S. Ladeira, F.M.P. Rêgo, J.C.B. Aldunate and M.C. Ferreira, “Processo de cura de ferida: cicatrização fisiológica,” *Revista de Medicina*, vol.89, no 3/4, pp. 125-131, 2010.
- [3] D. Nassar, E. Letavernier, L. Baud, S. Aractingi, S. Aractingi and K. Khosrotehrani, “Calpain Activity Is Essential in Skin Wound Healing and Contributes to Scar Formation,” *PLoS One*, vol.7, no.5, pp.1-10, 2012.

- [4] J. Ding and E.E. Tredget, "The Role of Chemokines in Fibrotic Wound Healing," *Advances in Wound Care*, vol.4, no.11, pp. 673-686, 2014.
- [5] J.A. Flegg, S.M. Menon, P.K. Maini and D.S.L. McElwain, "On the mathematical modeling of wound healing angiogenesis in skin as a reaction-transport process," *Frontiers in Physiology*, vol.6, no.1, pp. 1-17, 2015.
- [6] S.A. Eming, T. Krieg and J.M. Davidson, "Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms," *Journal of Investigative Dermatology*, vol.127, no. 1, pp.514-525, 2007.
- [7] E.A. Gantwerker and D.B. Hom, "Skin: histology and physiology of wound healing," *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol.19, no.3, pp. 441-453, 2011.
- [8] J. Wang, C. Zhang, Z. Zhang, Q. Chen, X. Lu, M. Shao, L. Chen, H. Yang, F. Zhang, P. Cheng, Y. Tan, K. Kim, K.H. Kim, B. Wang and Y.H. Kim, "BL153 Partially Prevents High-Fat Diet Induced Liver Damage Probably via Inhibition of Lipid Accumulation, Inflammation, and Oxidative Stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol.2014, no.1, pp. 1-10, 2014.
- [9] Y. Su and A. Richmond, "Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of skin Wounds," *Advances in Wound care*, vol.4, no.11, pp. 631-640, 2014.
- [10] H.J. Renaud, J.Y. Cui, H. Lu and C.D. Klaassen "Effect of Diet on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation in Mouse Liver Insights into Mechanisms of Hepatic Steatosis," *PLoS ONE*, vol.9, no.2, pp.1-17. 2014.
- [11] M.J. Ranzer, L. Chen and L.A. DiPietro, "Fibroblast Function and Wound Breaking Strength Is Impaired by Acute Ethanol Intoxication," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.35, no.1, pp.83-90, 2011.
- [12] R.J. Mendonça and J.C. Netto, "Aspectos celulares da cicatrização," *Anais Brasileiro de Dermatologia*, vol.84, no.3, pp. 257-262, 2009.

- [13] N. Siebert, W. Xu, E. Grambow, D. Zechner and B. Vollmar, "Erythroprotein improves skin wound healing and activates the TGF- β signaling pathway," *Laboratory Investigation*, vol.91, no.12, pp.1753-1765, 2011.
- [14] S.H. Mandelbaum, E.P. Santis and M.H.S. Mandelbaum, "Cicatrização conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte 1," *Anais Brasileiro de Dermatologia*, vol.78, no.4, pp.393-410, 2003.
- [15] M.G. Tonnesen, X. Feng and R.A.F. Clark, "Angiogenesis in Wound Healing," *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol.5,no.2, pp.40-46, 2000.
- [16] F.B. Teixeira, L.N.S. Santana, F.R. Bezerra, S. Carvalho, E.A. Fontes-Júnior, R.D. Prediger, M.E. Crespo-Lopez, C.S.F. Maia and R.R. Lima, "Chronic Ethanol Exposure during Adolescence in Rats Induces Motor Impairments and Cerebral Cortex Damage Associated with Oxidative Stress," *PLoS One*, vol.9, no.6, 1-14, 2014.
- [17] F. Granero-Molto, J.A. Weis, M.I. Miga, B. Landis, T.J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E.D. Jansen, D.P. Mortlock and A. Spagnoli, "Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing," *Stem Cells*, vol.27, no.8, pp. 1887-1898, 2009.
- [18] T. Kitaori, E.M. Schawarz, R. Tsutsumi, H. Yoshitomi, S. Oishi, M. Nakano, T. Nagasawa and T. Nakamura, "Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model," *Arthritis Rheumatology*, vol.60, no.3, pp. 813-823, 2009.
- [19] M. Bais, J. Mclean, P. Sebastiani, M. young, T. Smith, D.N. Kotton, T.A. Einhorn and L.C. Gerstenfeld, "Transcriptional analysis of fracture healing and the induction of embryonic stem cell-related genes," *PLoS One*, vol.4, no.5, pp.1-8, 2009.
- [20] D.J. Fitzgerald, K.A. Radek, M. Chaar, D.E. Faunce, L.A. DiPietro and E. Kovacs, "Effects of Acute Ethanol Exposure on the Early Inflammatory Response

After Excisional Injury,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.31, no.2, pp. 317-323, 2007.

[21] M.B. Amar and M. Wu, “Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol.11, no.6, pp. 1-7, 2014.

[22] A.B. Tepole and E. Kuhl, “Systems-based approaches toward wound healing,” *Pediatric Research*, vol. 73, no.0, pp.553-563, 2012.

[23] C.A. Balbino, L.M. Pereira and R. Curi, “Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão,” *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol.41, no.1, pp. 27-51, 2005.

[24] B.A. Rahn, “Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman GE,” *Bone in clinical orthopedics*. Thieme; Stuttgart, vol.10, no.1. pp.287–326, 2002.

[25] A.G. Andrade, C.F. Lima and A.K.B. Albuquerque, “Efeito do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica,” *Revista Brasileira de queimaduras*, vol.9, no.1, pp.21-30, 2010.

[26] L.C.G. Gerstenfeld, Y. M. Alkhiary, E.A. Krall, F.H. Nicholls, S.N. Stapleton, J.L. Fitch, M. Bauer, R. Kayal, D.T. Graves, K.J. Jepsen and A. Einhorn, “Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis,” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 54, no.11, pp.1215-1228, 2006.

[27] G. Jakobsdottir, J. Xu and G. Molin, “High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects,” *PLoS One*, vol.8, no.11, pp.1-12, 2013.

[28] L.H. Bogl, K.H. Pietilainen and A. Rissanen, “Association between habitual dietary intake and lipoprotein subclass profile in healthy young adults,” *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol.23, no.11, pp.1071-1078, 2013.

[29] J.C. Moraes, A. Coope and J. Morari, “High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons,” *PLoS One*, vol.4, no.4, pp.1-11, 2009.

- [30] K.S. Blum, S. Karaman, S.T. Proulx, A.M. Ochsenbein and P. Luciani, "Chronic High-Fat Diet Impairs Collecting Lymphatic Vessel Function in Mice," *PLoS One*, vol.9, no.4, pp.1-9, 2014.
- [31] L.V. Yuzefovych, S.I. Musiyenko, G.L. Wilson and L.I. Rachek, "Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice," *PLoS One*, vol.8, no.1, pp.1-10, 2013.
- [32] B.P. Sampey, A.M. Vanhoose, H.M. Winfield, A.J. Freerman, M.J. Muehlbauer, P.T. Fueger, C.B. Newgard and L. Makowski, "Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet," *Obesity*, vol.19, no.1, pp.1109-1117, 2011.
- [33] S.N. Leite, M.N. Leite and G.F. Caetano, "Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet," *Lasers in Medical Science*, vol.30, no.1, pp.1481-1488, 2015.
- [34] L.O. Pereira, R.P. Francischi and A.H.L. Júnior, "Obesidade: Hábitos nutricionais, Sedentarismo e resistência à insulina," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol.47, no.2, pp.111-127, 2009.
- [35] L.N. Gentilello, R.A. Cobean, A.P. Walker, E.E. Moore, M.J. Wertz and E.P. Dellinger, "Acute Ethanol Intoxication Increase the Risk of Infection Following Penetrating Abdominal Trauma," *The Journal of Trauma*, vol.34, no.5, pp.669-674, 1993.
- [36] D.F. Faunce, J.L. Garner and J.N. Llanas, "Effect of Acute Ethanol Exposure on the Dermal Inflammatory Response After Burn Injury," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.27, no.7, pp.1199-1206, 2003.
- [37] G. Szabo and P. Mandrekar, "A recent perspective on alcohol, immunity and host defense," *Alcohol Clin Exp Res*, vol.33, no.2, pp.220-232, 2013.
- [38] G. Villafuerte, A. Miguel-Puga, E.M. Rodríguez, S. Machado, E. Manjarrez and Oscar Arias-Carrión, "Sleep Deprivation and Oxidative Stress in Animal

Models: A Systematic Review,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol.2015, no.1, pp.1-15, 2015.

[39] K.A. Radek, A.M. Matthies and A.L. Burns, “Acute ethanol exposure impairs phase of wound healing,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol.86, no.5, pp.1125–1134, 2009.

[40] S.K. Das and S. Mukherjee, “Long-Term Ethanol Consumption Leads to Lung Tissue Oxidative Stress and Injury,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol.3, no.6, pp.414-420, 2010.

[41] P. Stephens, T. Al-Khateeb and K.J. Davies, “An investigation of the interaction between alcohol and fibroblasts in wound healing,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol.25, no.2, pp.161–164, 1996.

[42] R.F. Sampaio and M.C. Mancini, “Estudo de revisão sistemática: Um Guia para a síntese criteriosa da evidência científica,” *Revista Brasileira de Fisioterapia*, vol.11, no.1, pp.83-89, 2007.

[43] D. Moher, A. Liberati and J. Tetzlaff, “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement,” *Annals of Internal Medicine*, vol.151, no.4, pp.264-269, 2009.

[44] C.R. Hoojmans, A. Tilema, M. Leenaars and M. Ritskes-Hoitinga, “Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation,” *Laboratory Animals*, vol.44, no.3, pp.170-175, 2010.

[45] C. Kilkeny, W. Browne and I.C. Cuthill, “Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research,” *PLoS Biol*, vol.8, no.6, pp.1-11, 2010.

[46] M.M.L. Brown, K. Yukata and G.W. Farnsworth, “Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes,” *Plos One*, vol.9, no.6, pp.1-8, 2014.

[47] D.B. Pence, A.L. Dipietro and J.A. Woods, “Exercise Speeds Cutaneous Wound Healing in High-Fat Diet-Induced Obese Mice,” *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol.44, no.10, pp.1846-1854, 2012.

- [48] P.R. Hiebert, D. Wu¹ and D.J. Granville, “Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice,” *Cell Death and Differentiation*, vol.20, no.10, pp.1404–1414, 2013.
- [49] M. Otranto, A.P. Nascimento and A.M.A. Costa, “Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice,” *Wound Repair Regeneration*, vol.21, no.3, pp.464–473, 2013.
- [50] A.P. Nascimento and A.M.A. Costa, “Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing,” *British Journal of Nutrition*, vol. 96, no.6, pp.1069–1077, 2006.
- [51] M. Gupta, T. Poonawala, M. Farooqui, M.E. Ericson and K. Gupta, “Topical fentanyl stimulates healing of ischemic wounds in diabetic rats,” *Journal of Diabetes*, vol.7, no.4, pp.573–583, 2015.
- [52] O. Seitz, C. Schurmann, N. Hermes, E. Müller, J. Pfeilschifter, S. Frank and I. Goren, “Wound Healing in Mice with High-Fat Diet- or ob Gene-Induced Diabetes-Obesity Syndromes: A Comparative Study”, *Experimental Diabetes Research*, vol.2010, no.1, pp.1-15, 2010.
- [53] R. Slavkovsky, R. Kohlerova and V. Tkacova, “Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity,” *Wound Repair Regeneration*, vol.19, no.4, pp.515–525, 2011.
- [54] V.B. Holcomb, V.A. Keck, J. Barrett, J. H.ong, S.K. Libutti and N.P. Nunez, “Obesity Impairs Wound Healing in Ovariectomized Female Mice,” *In Vivo*, vol.23, no.4, pp.515-518, 2009.
- [55] R.A. Mooney, E.R. Sampson, J. Lerea, R.N. Rosier and M.J. Zuscik, “High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury,” *Arthritis Research & Therapy*, vol.13, no.6, pp.1-10, 2011.
- [56] A.P. Nascimento and A.M.A. Costa, “Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing,” *British Journal of Nutrition*, vol.106, no.4, pp.603–611, 2011.

- [57] M. Halıcı, M. Öner, A. Güney, Ö. Canöz, F. Narin and C. Halıcı, “Melatonin promotes fracture healing in the rat model,” *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*, vol.21, no.3, pp.172-177, 2010.
- [58] N. Elmali, K. Ertem, S. Ozen, M. Inan, T. Baysal, G. Güner and A. Bora, “Fracture Healing and Bone Mass in Rats Fed on Liquid Diet Containing Ethanol,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.26, no.4, pp.509–513, 2012.
- [59] J. Driver, C.E. Weber, J.J. Callaci, A.N. Kothari, M.A. Zapf, P.M. Roper, D. Borys, C.A. Franzen, G.N. Gupta, P.Y. Wai, J. Zhang, M.F. Denning, P.C. Kuo and Z. Mi, “Alcohol Inhibits Osteopontin-dependent Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol.290, no.16, pp.9959–9973, 2015.
- [60] K.L. Lauing, P.M. Roper, R.K. Nauer and J.J. Callaci, “Acute Alcohol Exposure Impairs Fracture Healing and Deregulates β -Catenin Signaling in the Fracture Callus,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.36, no.12, pp.2095–2103, 2012.
- [61] T. Obermeyer, D. Yonick, K. Lauing, S.R. Stock, R. Nauer, P. Strotman, R. Shankar, R. Gamelli, M. Stover and J.J. Callaci, “Mesenchymal Stem Cells Facilitate Fracture Repair in an Alcohol-Induced Impaired Healing Model,” *Journal of Orthopaedic Trauma*, vol.26, no.12, pp.712–718, 2012.
- [62] D.A. Chakkalakala, J.R. Novaka, E.D. Fritz, T.J. Mollner, D.L. McVicker, K.L. Garvin, M.H. McGuire and T.M. Donohue, “Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption,” *Alcohol*, vol.36, no.6, pp.201–214, 2005.
- [63] M.A. Choudhry, C.V. Fontanilla and L.A. Duffinera, “Ethanol exacerbates T cell dysfunction after thermal injury,” *Alcohol*, vol.21, no.3, pp.239-243, 2000.
- [64] J.R. Chen, O.P. Lazarenko, K. Shankar, M.L. Blackburn, T.M. Badger and M.J. Ronis, “A role for Ethanol-induced Oxidative Stress in Controlling Lineage Commitment of Mesenchymal Stromal Cells Through Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol.25, no.5, pp.1117–1127, 2009.

- [65] R. Himes, F.H. Wezeman and J.J. Callaci, "Identification of Novel Bone-Specific Molecular Targets of Binge Alcohol and Ibandronate by Transcriptome Analysis," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol.32, no.7, pp.1167–1180, 2008.
- [66] W.J. Chang, N.E.O. O'Connell, E. Burns, L.S. Chipchase, M.L. Liston and S.M. Schabrun, "Organisation and function of the primary motor cortex in chronic pain: protocol for a systematic review and meta-analysis," *BJM Open*, vol.5, no.1, pp.1-5, 2015.
- [67] M. Chorilli, D.C. Michelin and H.R.N. Salgado, "Animais de laboratório: o camundongo," *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol.28, no.1, pp.11-23, 2007.
- [68] S. Guo and L.A. DiPietro, "Factors Affecting Wound Healing," *Journal of Dental Research*, vol.89, no.3, pp.219-229, 2010.
- [69] H. Wang, J. Sun and Z. Jia, "Nitrooleic Acid Attenuates Lipid Metabolic Disorders and Liver Steatosis in DOCA-Salt Hypertensive Mice," *Hindawi Publishing Corporation PPAR Research*, vol.2015, no.2, pp.1-9, 2015.
- [70] S.S. Martins, O.J.M. Torres, O.J. dos Santos, F.A. Limeira Júnior, E.N.S. Filho, S.P.C. Melo, R.H.P. Santos and V.B. Silva, "Analysis of the healing process of the wounds occurring in rats using laser therapy in association with hydrocolloid," *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol.30, no.10, pp.681-689, 2015.
- [71] A. Atiba, T. Wasfy, W. Abdo, A. Ghoneim, T. Kamal and M. Shukry, "Aloe Vera gel facilitates re-epithelialization of corneal alkali burn in normal and diabetic rats," *Clinical Ophthalmology*, vol.2015, no.9, pp.2019–2026, 2015.
- [72] M. Sozio and D.W. Crabb, "Alcohol and lipid metabolism," *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, vol.295, no.1, pp.E10 –E16, 2008.
- [73] K. Funjio, O. Tomahisa, S. Sumitomo and T. Yamamoto, "Therapeutic potential of regulatory cytokines that target B cells," *International Immunology*, vol.215, no.1, pp.1-7, 2015.

- [74] R.V. Gonçalves, R.D. Novaes, M.C. Cupertino, B. Araújo, E.F. Vilela, A.T Machado, J.P.V. Leite and S.L.P. Matta, "Bathysa cuspidata Extract Modulates the Morphological Reorganization of the Scar Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Rats: A Time-Dependent Study," *Cells Tissues Organs*, vol.199, no.4, pp.266-277, 2014.
- [75] R.D. Novaes, R.V. Gonçalves, J.P.V. Leite, E.F. Vilela, M.C. Cupertino, L.G. Nunes and S.L.P. Matta, "Hepatoprotective effect of Bathysa cuspidata in a murine model of severe toxic liver injury," *International Journal of Experimental Pathology*, vol.93, no.5, pp. 370-376, 2012.
- [76] G. Gabbiani, "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases," *Journal Pathology*, vol.200, no.4, pp.500-503, 2003.
- [77] L.Yonehiro, G. Burleson and V.Sauer, "Use of a New Acellular Dermal Matrix for Treatment of Nonhealing Wounds in the Lower Extremities of Patients With Diabetes," *Wounds*, vol.26, no.5, pp.E39-E47, 2014.
- [78] D.G. Altman and I. Simera, "Responsible reporting of health research studies: transparent, complete, accurate and timely," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.65, no.1, pp.1-3, 2010.

ARTIGO 2

Álcool e Dieta Gorda retardam a cicatrização de Feridas Cutâneas de Segunda Intenção em Ratos Wistar

Resumo

Alguns trabalhos têm relatado que o álcool e a dieta hipercalórica prejudicam o processo de reparo cutâneo, no entanto, não existem estudos que contemplam o efeito do álcool associado à dieta hipercalórica no reparo de feridas cutâneas de segunda intenção. Deste modo, o nosso objetivo foi avaliar o efeito do álcool e dieta hipercalórica nas principais etapas do processo cicatricial em ratos Wistar. Assim os animais foram divididos em cinco grupos, G1: controle, dieta comercial e água com gavagem, G2: controle, dieta comercial e água sem gavagem, G3: dieta comercial e Álcool, G4: dieta hipercalórica, G5: dieta hipercalórica e álcool. Os animais foram tratados com álcool e dieta hipercalórica durante 61 dias. Após 40 dias de tratamento foram realizadas 3 feridas cutâneas de segunda intenção no dorso dos animais por meio de incisão cirurgia e a cada 7 dias foram retirados fragmentos totalizando 21 dias. Os fragmentos foram coletados para análises morfométricas, bioquímicas e de citocinas. Além disto, avaliamos durante todo o experimento o ganho de peso total (TEP), índice de massa corporal (IMC) e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA). A partir das análises morfométricas, observamos um aumento da celularidade e uma redução da vascularização nos grupos tratados com álcool e dieta hipercalórica, da mesma forma houve um aumento dos níveis de TGF- β indicando uma fase inflamatória prorrogada durante a cicatrização. Foram encontrados depósitos de hemossiderina na pele de animais tratados com álcool e dieta hipercalórica, o que pode ser explicado pelo dano hepático causado pelo tratamento, uma vez que os níveis de ALT e AST também encontravam-se alterados. Nossos resultados demonstraram também uma redução na quantidade colágeno do tipo I e III em G3, G4 e G5 o que pode ser resultado do estresse oxidativo causado pelo álcool e dieta hipercalórica, uma vez que os níveis de TBARS, PCN e das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) estavam elevados. Baseado nisto, concluímos que o consumo de álcool e dieta hipercalórica retardam a cicatrização de feridas pelo aumento da fase

inflamatória e do estresse oxidativo, causando alterações morfológicas e bioquímicas que impedem o remodelamento correto da matriz.

Palavras-chave: álcool, dieta rica em gordura, tecido cicatricial, ratos Wistar.

Abstract

Some studies have reported that alcohol and fat diet damage the skin repair process; however, there are no studies that address the influence of alcohol associated with fat diet in the repair of cutaneous wounds secondary intention. Thus, our objective was to evaluate the influence of alcohol and fat diet in the main steps of the healing process. Thus the animals were divided into five groups, G1: control, commercial diet and water gavage, G2: control, commercial diet and water without gavage, G3: Commercial diet and alcohol G4: Fat Diet, G5: Fat Diet and alcohol. The animals were treated with alcohol and fat diet for 61 days. After 40 days were performed three wounds on the dorsum of second intention of the animal by incision surgery and every 7 days were taken fragments totaling 21 days. The fragments were collected for morphometric analysis, biochemical and cytokines. In addition, we evaluated throughout the total weight gain experiment, body mass index (BMI) and feed efficiency coefficient (CFE). From the morphometric analysis, we observed an increase in cellularity and vascularity decrease in the groups treated with alcohol and fat diet, just as an increase in TGF- β levels indicating a prolonged inflammatory phase during healing. hemosiderin deposits were found in the skin of animals treated with alcohol and fat diet, which can be explained by the hepatic damage caused by the treatment, since ALT and AST levels are also found to be modified. Our results also demonstrated a reduction in collagen quantity of type I and III G3, G4 and G5, which may be a result of oxidative stress caused by alcohol and fat diet, as TBARS, PCN and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) were elevated. Based on this, we conclude that the consumption of alcohol and fat diet retard wound healing by increasing the inflammatory phase and oxidative stress, causing morphological and biochemical changes that prevent the proper remodeling of the matrix.

Key words: alcohol, fat diet, scar tissue, Wistar rat.

1. Introdução

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico, composto basicamente por 3 etapas que envolvem a liberação de uma série de mediadores químicos como citocinas e quimiocinas, importantes em todas as fases do processo^(1,2). Na primeira fase, conhecida como inflamatória, ocorre a migração celular e a liberação de grande quantidade de mediadores sendo este processo seguido por eventos que culminam com a proliferação celular e vascular e consequente remodelação tecidual⁽¹⁻³⁾. As fases do processo cicatricial são dependentes entre si e tendem a se sobrepor^(4,5). Dessa forma qualquer alteração que ocorrer em alguma etapa pode comprometer todo o processo, levando à cronificação da lesão cutânea⁽⁶⁾.

A pele é o maior órgão do corpo e é considerada uma barreira física contra patógenos e microorganismos diversos^(7,8). No processo de reparo cutâneo as principais células que compõe a pele são recrutadas para o fechamento da ferida, destacando-se os fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais vasculares^(9,10). Quando estas células são ativadas formam o tecido de granulação, rico em colágeno III e vasos sanguíneos, além de promoverem a reconstrução da barreira epidérmica⁽⁶⁾. Os fibroblastos são as principais células responsáveis pela produção de matriz extracelular (MEC), formada por colágeno, fibronectina, fibras elásticas, tenascina e laminina, que irão dar suporte para migração celular e para a formação de novos vasos sanguíneos^(10,11). A liberação de quimiocinas e citocinas pelas células do tecido é importante para modular a formação de novas células, vasos e os constituintes da MEC^(4,11). Dentre os principais mediadores liberados durante o processo de reparo podemos destacar: fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) entre outros. O TGF- β exerce importante papel durante o processo cicatricial, devido sua atividade quimioatrativa para macrófagos, queratinócitos e fibroblastos, além de estimular a liberação de outros fatores de crescimento, a angiogênese e inibir a ação de enzimas com atividade proteolítica⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Recentemente alguns estudos têm mostrado grande interesse na análise de biomarcadores de estresse oxidativo e de defesas antioxidantes no processo de reparo cutâneo⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Existem relatos de que a exposição do tecido a agentes lesivos estimula

o transporte de elétrons, levando ao aumento na formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Além disto, tem sido observado que no processo de cicatrização normal, existe um aumento na quantidade de ERO's, assim quanto mais rápida for a recuperação do tecido melhor será a qualidade da cicatriz, uma vez que será menor a geração de radicais livres e, conseqüentemente, menor será a ocorrência de danos oxidativos ao tecido^(17,19). A produção de radicais livres em pequenas quantidades é considerada um processo fisiológico. No entanto, existem fatores relacionados aos hábitos de vida que interferem diretamente no aumento das ERO's e comprometem a função celular e tecidual, podendo-se destacar o alcoolismo e o consumo de dietas ricas em gorduras⁽²⁰⁾.

Atualmente o alcoolismo é considerado um problema de saúde pública e o consumo do álcool em excesso pode causar uma série de alterações no tecido através da geração de processos inflamatórios e da produção aumentada de ERO's^(20,21). O consumo elevado de álcool pode comprometer o bom funcionamento do organismo e levar à conseqüências irreversíveis, destacando-se disfunções hepáticas e renais, além de retardar o processo de cura das feridas, uma vez que inibe os sistemas de defesas antioxidantes⁽²²⁾ e altera a resposta imune diminuindo a liberação de mediadores⁽²⁾. Além disto, pode ocorrer alteração celular, causada pela desestruturação do DNA, RNA e proteínas, levando a um processo de degeneração que pode evoluir para necrose tecidual⁽¹⁹⁾.

Assim como no alcoolismo os efeitos do consumo de uma dieta inadequada também podem trazer grandes prejuízos para o processo cicatricial. A ingestão de dietas hipercalóricas, como a dieta de cafeteria, tem se mostrado um modelo interessante para indução de dislipidemia, uma vez que representa um padrão semelhante à alimentação rica em gordura que vem sendo consumido pela sociedade moderna⁽²³⁾. O consumo de dieta hipercalórica está associado à uma grande variedade de doenças, podendo destacar entre elas obesidade, diabetes, resistência a insulina, doenças coronarianas, câncer, acidentes vascular cerebral e esteatose não alcoólica do fígado⁽²⁴⁻²⁷⁾. Em geral todas estas doenças apresentam um denominador comum; um quadro de inflamação crônica que, após sua evolução, pode causar alterações teciduais irreversíveis e estabelecer o desenvolvimento de uma doença.

Geralmente uma alimentação rica em gorduras está associada ao consumo de álcool e esta combinação tem se mostrado uma realidade cada vez mais comum em

nossa sociedade ⁽²¹⁾. Os danos causados por esta associação são os mais variados possíveis, mas no geral levam ao desenvolvimento de degenerações, devido ao aumento na produção de radicais livres, desestruturação das membranas celulares e acúmulo de proteínas no interior das células. Além disto, o consumo crônico pode ativar várias vias importantes relacionadas à morte celular ^(21,28). Vale ressaltar que este modelo de lesão utilizando a ingestão de dieta hipercalórica e álcool em estudos pré-clínicos tem grande aplicabilidade em modelos clínicos e apresenta potencial utilidade para investigar o efeito do perfil dietético sobre o metabolismo e estrutura de múltiplos órgãos ^(29,30).

Desta forma, assim como o consumo de álcool e de uma dieta rica em gorduras pode interferir no metabolismo de vários órgãos e alterar várias vias metabólicas, nós acreditamos que o processo de reparo de feridas cutâneas de segunda intenção também pode ser comprometido quando está associado ao consumo destes dois produtos. Baseado nisto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do consumo do álcool e da dieta gorda na cicatrização de feridas cutâneas de segunda intenção. Para isso avaliamos a ação destes produtos isolados e associados na proliferação celular, vascular, nos constituintes da MEC, na produção de ERO's, nos parâmetros sanguíneos e na quantidade de TGF- β produzida pelo tecido.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com peso médio de 320g, dez semanas de vida, sadios, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa foram alocados em gaiolas individuais, diariamente higienizadas e mantidas em ambiente com temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). O fotoperíodo foi estabelecido em ciclos de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética institucional (CEUA/UFV - 213/2014).

2.2 Delineamento experimental e realização das feridas

Trinta animais foram randomizados em 5 grupos de 6 animais sendo: G1= controle, dieta comercial⁽³¹⁾, e água por gavagem, G2= controle, dieta comercial e água sem gavagem; G3= dieta comercial e álcool, G4= dieta hipercalórica (cafeteria), G5= Dieta hipercalórica (cafeteria) e álcool. Os animais foram tratados com álcool e dieta hipercalórica durante 61 dias. Durante este período os animais receberam álcool 40% (etanol absoluto (Dinâmica®) diluído em água a 40%, 4g/kg do peso corporal⁽³²⁾, uma vez por dia por gavagem. Os componentes da dieta hipercalórica estão descritos na tabela 1, e totalizaram 50% de gordura, 20% de proteína, e 30% de carboidratos⁽³⁰⁾.

Tabela 1: Composição da dieta hipercalórica (cafeteria) (g/1000g de dieta).

Ingredientes	Quantidade (g)
Patê de presunto	223
Batata frita palha	111
Bacon	111
Biscoito maisena	111
Achocolatado em pó sabor chocolate	111
Leite integral em pó	111
Ração comercial	111

As dietas foram preparadas em ambiente asséptico usando misturador industrial para homogeneização. Todas as dietas e água foram oferecidas *ad libitum*. Durante o experimento os animais foram pesados a cada sete dias. O cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi obtido pela análise do peso total do alimento oferecido menos o peso do alimento que permanecia após o período de 24hs. Após 40 dias de administração do álcool e da dieta (indução do consumo crônico do álcool e dieta hipercalórica) os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (50 mg/kg) e xylazina (20 mg/kg) e três feridas circulares de 12mm diâmetro, foram criadas por incisão cirúrgica até a exposição da fáscia muscular dorsal utilizando-se bisturi com lâmina número 15. A área das feridas foi previamente demarcada com a utilização de cristal violeta e aferida com a utilização de paquímetro analógico (Mitutoyo Sul Americana Ltda®, São Paulo, Brasil). Para

realização das feridas os animais tiveram o dorso depilado e a área foi desengordurada com éter etílico (Merck ®, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida foi usado etanol a 70% e iodopovidona 10% para assepsia do local⁽¹⁷⁾. Em todos os grupos as feridas foram limpas com solução salina 0,9% durante 21 dias. Ao final do experimento os animais foram eutanaziados por punção cardíaca sob anestesia intraperitoneal com Ibuprofeno (10mg/Kg). Os detalhes do modelo experimental estão descritos na Figura 1.

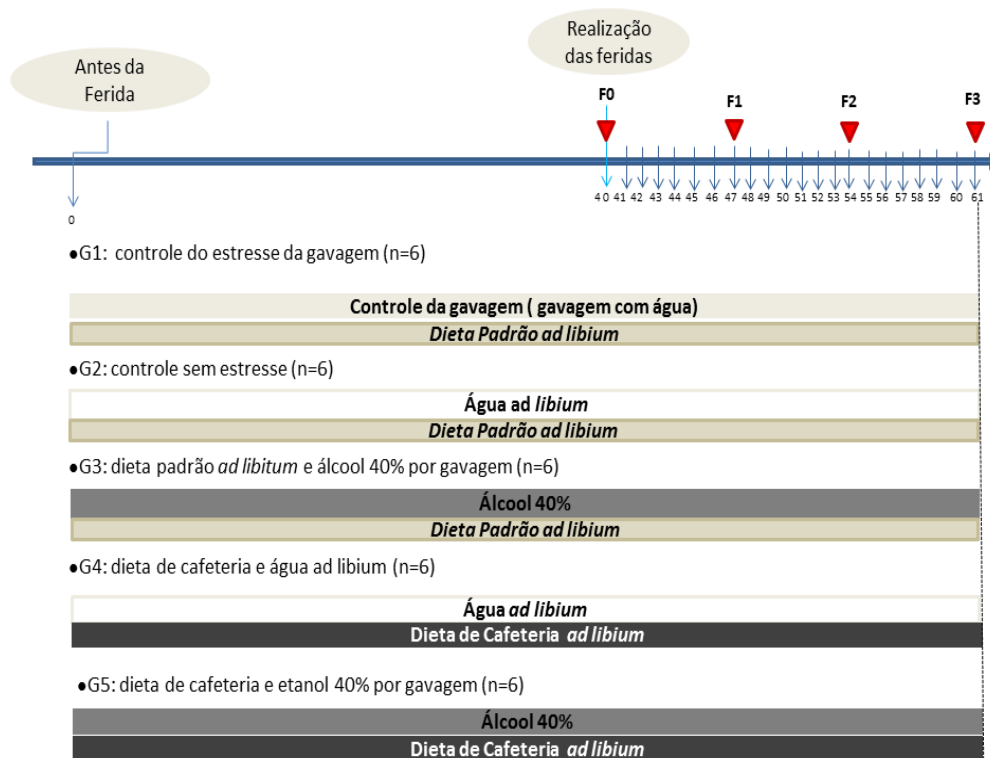


Figura 1: Fluxograma do delineamento experimental com a distribuição dos animais nos grupos, tempo de tratamento (linha cronológica, azul), realização das feridas e coleta de fragmentos (cabeça da seta em vermelho). Trinta ratos Wistar foram randomizados em cinco grupos experimentais: G1: controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool (40%), G4: Dieta gorda (cafeteria) e água *ad libitum*, G5: Dieta gorda (cafeteria), água *ad libitum* e álcool. Os animais foram tratados por quarenta dias antes da realização das feridas, para simular o consumo crônico de etanol e dieta. F0: ferida zero (pele íntegra), F1: ferida 1, fragmento recolhido após 7 dias de realização das feridas, F2: ferida 2, fragmento recolhido após 14 dias e F3: Ferida 3, fragmento recolhido após 21 dias.

2.3 Processamento e análise do material histológico

Fragmentos de tecidos foram coletados de cada animal em uma das três feridas a cada 7 dias, utilizando um bisturi e o mesmo procedimento anestésico descrito anteriormente. Os fragmentos retirados para análise histológica foram preservados em solução de Karnovsky, desidratados em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de espessura de 4 μm foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045®, Reichert-Jung, Jena, Alemanha), utilizando-se 1 em cada 20 seções para evitar a repetição da análise da mesma área histológica. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise dos fibroblastos e vasos sanguíneos, e Sirius red (Sirius F3B vermelho, Mobay Chemical Co., Union, NJ, EUA) para analisar as fibras colágenas do tipo I e III sob microscopia de polarização (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA)⁽³³⁾. A coloração para hemossiderina foi realizada pela marcação do ferro pela corante de Perls⁽³⁴⁾ e vermelho neutro 1%. Para evidenciar as fibras elásticas as seções do tecido foram coradas pelo método de Verhoeff⁽³⁵⁾. Os cortes foram analisados e as imagens capturadas com microscópio de campo claro BX53® (Olympus, Tokyo, Japão) no software CellSens Dimensions, Câmera - Olympus DP73, e analisadas pelo software Image Pro Plus®. Usando uma lente objetiva de 20X, 10 campos histológicos foram amostrados aleatoriamente em cada seção de pele, e uma área de tecido total de $1.53 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ foi submetida à análise. Para isto, foi realizada uma contagem de todas as estruturas de interesse numa área de teste padrão (AT) de $153 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. As estruturas analisadas foram: vasos sanguíneos, células, fibras colágenas tipo I e tipo III, fibras elásticas e depósitos de hemossiderina. As fibras de colágeno foram analisadas de acordo com a propriedade de birrefringência, uma vez que, sob polarização, as fibras grossas de colágeno tipo I aparecem em tons de cores brilhantes que vão do vermelho ao amarelo, enquanto que as fibras reticulares finas (colágeno tipo III) aparecem em verde brilhante⁽³³⁾. Para análise de mastócitos, seções de tecido cicatricial foram corados com azul de toluidina⁽³⁶⁾. A especificidade deste método baseia-se nas propriedades de metacromasia dos grânulos de mastócitos, que são ricos em porções químicas aniônicas que modificam o azul do corante inicial, e adquirem uma cor roxa escura. Usando uma lente objetiva de 40X, 10 campos histológicos foram analisados totalizando uma área de $1,96 \text{mm}^2$ em microscópio de luz CX40® (Olympus, Tokyo, Japão). Cada seção histológica apresentou uma área de

0,196mm². Esta área foi calculada a partir do número de campo=20/40 e em seguida foi utilizada a fórmula $A=\pi r^2$.

2.4 Análises de expressão de citocinas

Amostras de tecido cicatricial, coletadas nos dia 7 e 14, foram congeladas a -80° C e homogeneizadas em PBS, tampão pH: 7.4 contendo 0,05% de Tween e centrifugado a 3.500G por 30 minutos. Os níveis de TGF- β no sobrenadante foram analisados utilizando-se kits de imunoenensaio pelo método de ELISA (Boster Biological Technology Ltd, China), seguindo o protocolo do fabricante. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning, New York, USA) foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de anticorpos monoclonais específicos para o componente a ser dosado (anticorpo de captura), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6) por 12 horas à 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com solução de PBS acrescido com 10% de soro bovino fetal inativado (Sigma) durante 1 hora em temperatura ambiente. Nos poços foram adicionados, em duplicata, compostos recombinantes (curva-padrão) e as amostras do homogenato de tecido cicatricial. As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante 2 horas e em seguida lavadas cinco vezes com PBS-Tween e adicionados os anticorpos secundários específicos para cada componente de interesse conjugados com biotina (anticorpo de detecção) associada à avidina-peroxidase. A reação foi revelada com tetrametilbenzidina (TMB) e bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2M, sendo a leitura realizada em leitor de microplacas em 450 nm (Power Wave X-BioTekInstruments, Inc. Winooski, Vermont, USA).

2.5 Análises Bioquímicas

2.5.1 Marcadores de Estresse Oxidativo

Fragments de tecido foram coletados de cada ferida e rapidamente congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e estocados em freezer -80°C. Amostras destes fragmentos foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas a 5°C em uma velocidade de 3.500G por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise de Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona-S-Transferase (GST), substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e Proteínas carboniladas (PCN). A atividade de CAT foi avaliada usando o método de Aebi

(1984)⁽³⁷⁾, pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A mensuração de TBARS foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Gutteridge e Halliwell (1990)⁽³⁸⁾. A atividade da SOD foi realizada em leitor de Elisa 570 nm e baseou-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido (O₂⁻) e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol⁽³⁹⁾. GST foi mensurada através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorvância em 340 nm por 60s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1mol do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB 340= 9,6 mM⁻¹ Cm⁻¹ foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1976)⁽⁴⁰⁾ e os resultados expressos em μmol min⁻¹ g⁻¹. Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados pelo método adaptado de Lens (1989)⁽⁴¹⁾. Os tecidos armazenados a -80°C foram transferidos para nitrogênio líquido para serem pesados e homogeneizados em ácido tricloroacético 10%. Os homogenatos (500 μL) foram transferidos para tubos (1 tubo para o branco e 1 tubo para amostra) e centrifugados por 10 min a 3.500G. O sobrenadante foi incubado por 15 minutos com 500 μL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH 10mM preparado em HCl 2 M) (os brancos foram incubados com 500 μL de HCl 2 M) agitando-se de 15 em 15 minutos. Após a incubação, as proteínas foram precipitadas com 500 μL de ácido tricloroacético 10%, centrifugadas por 10 min a 3.500G, os sobrenadantes descartados e, em seguida lavadas duas vezes com 1 mL de etanol e acetato de etila (1v:1v). O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de solução de SDS 6% e centrifugado por 10 min a 5.000G. Os sobrenadantes foram coletados para a leitura. As proteínas carboniladas foram quantificadas, espectrofotometricamente, pela leitura da absorvância em 340 nm. Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteínas totais do sobrenadante de acordo com o protocolo de Bradford (1976)⁽⁴²⁾.

2.6 Marcadores Sanguíneos

O sangue foi coletado durante a eutanásia, após jejum de 12 horas, por punção cardíaca utilizando seringa heparinizada. Em seguida, foi centrifugado à

velocidade de 1000G por 10 minutos e o soro reservado para as análises dos níveis séricos de triacilglicerol, glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os kits diagnósticos utilizados para esta análise foram adquiridos da Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brazil). O soro foi analisado no Laboratório de Análises Clínicas, Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, utilizando o Analisador clínico BS-200 da marca Mindray® (China).

2.7 Progressões do fechamento da ferida

A resposta de cura de fechamento das feridas foi avaliada medindo a área da ferida a cada 7 dias em imagens digitalizadas com a dimensões de 320×240 pixels (24 bits / pixel) obtido usando um câmera de vídeo digital (DSC-W610 ®, Sony, Tóquio, Japão). A ferida áreas foram calculados por planimetria computadorizada utilizando a Imagem Pro-Plus versão do programa 4.5 ® (Media Cybernetics, Silver Spring, Md., EUA), previamente calibrado. O índice de contração da ferida foi calculado usando a seguinte proporção: área inicial da ferida (A_0) - área no dia da medição (A_i) / área inicial do ferida (A_0) $\times 100$ ⁽³³⁾. A terceira ferida era selecionado para a análise do processo de cura, porque foi recolhido no último dia da experiência.

2.8 Parâmetros Biométricos (CEA, TEP e IMC)

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi estimado pela relação entre o ganho de peso por quantidade de alimento consumido: $CEA = (\text{massa final do animal (g)} - \text{massa (g) inicial do animal}) / \text{quantidade total de alimento ingerido no período (g)}$ ⁽⁴³⁾. A massa corporal foi aferida por pesagem direta e os parâmetros de comprimento determinados com a utilização de fita métrica. O índice de massa corporal (IMC) foi determinado a partir da relação entre peso corporal (g) /comprimento nasoanal (cm). A taxa específica de ganho de peso (TEP) foi estimada por meio da relação entre: dM/Mdt , em que dM representa o ganho de massa corporal durante dt (massa final – massa inicial) e M é a massa corporal dos ratos em t_1 (data inicial do período)⁽⁴⁴⁾.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância unifatorial (one-way ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram avaliados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

3. Resultados

No dia 7, quantidade de células foi maior em G3, G4 e G5, quando comparado à G1 e G2. No dia 14 os grupos que receberam álcool 40% (G3) e álcool associado à dieta hipercalórica (G5) apresentaram maior número de células quando comparado aos outros grupos. No dia 21 a quantidade de células foi maior em G5 quando comparado aos demais. Em relação à quantidade de mastócitos nos dia 7, 14 e 21 houve maior número de células em G5 quando comparado aos demais grupos (Figura 2 e 3A e B).

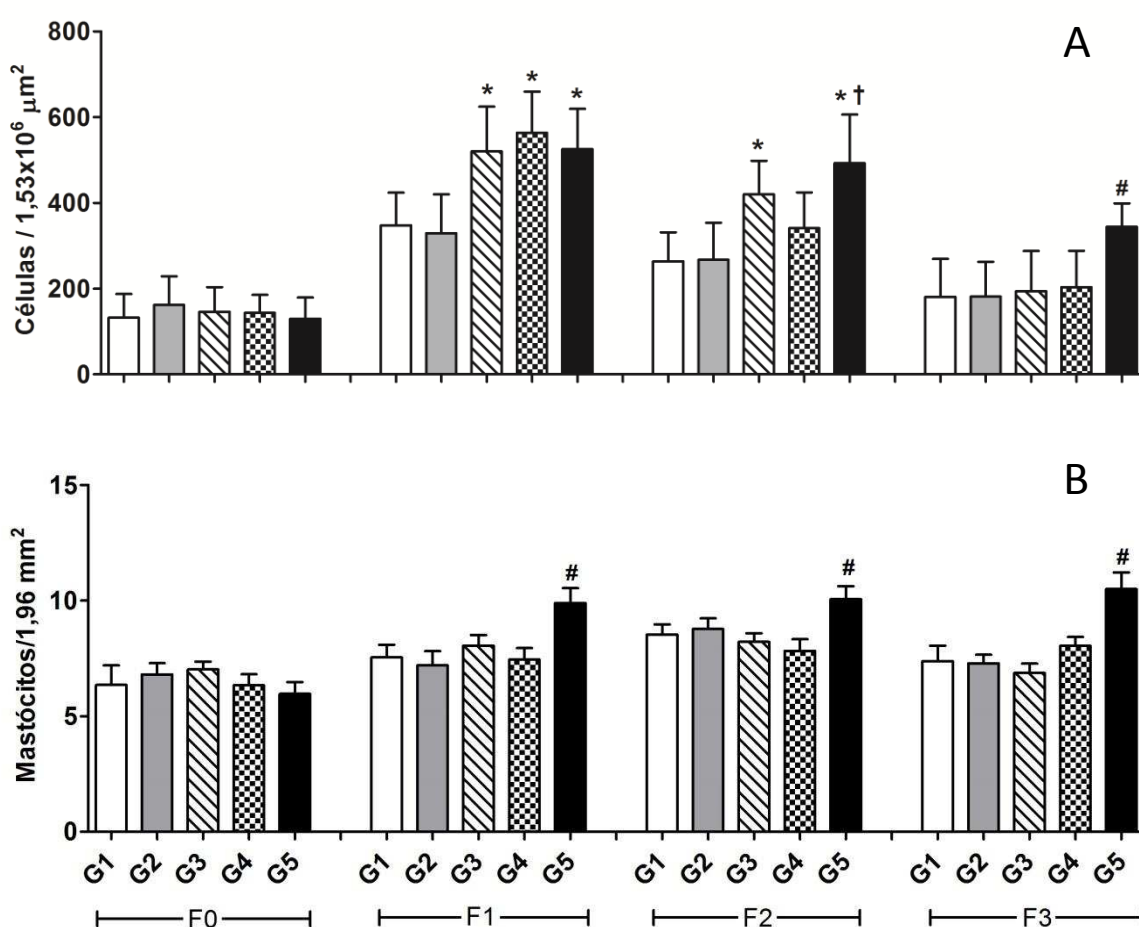


Figura 2: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica na quantidade total de células (A) e número de mastócitos (B) em feridas cutâneas de ratos Wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, dieta comercial e água por gavagem, G2: Controle, dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta Hipercalórica, G5: Dieta Hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,#,† diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); *comparado ao G1 e G2, # comparado ao G1, G2, G3 e G4 e † comparado ao G4.

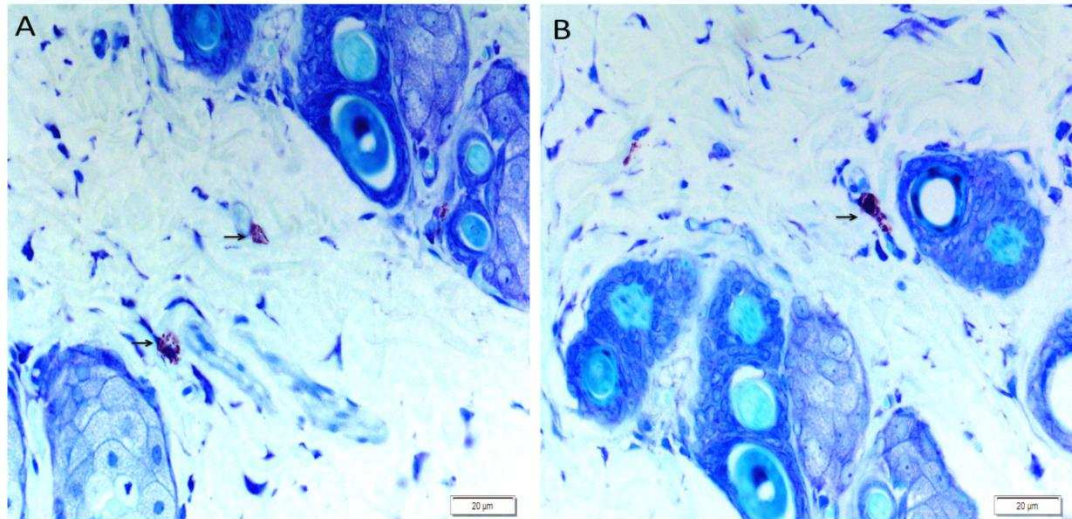


Figura 3: Fotomicrografias mostrando distribuição de mastócitos no tecido cicatricial no grupo que recebeu dieta hipercalórica e álcool (G5), nos períodos F2 e F3 (células coradas em púrpura), no (A e B). Coloração Azul de toluidina.

No dia 7 e 14 a quantidade de vasos foi menor nos grupos G3, G4 e G5 quando comparado aos grupos controle (G1 e G2) (Figura 4A e Figura 5). A quantidade de hemossiderina no dia 7 foi maior em G5 e G4 quando comparado aos outros grupos. No dia 14, a quantidade de depósito de ferro foi maior em G3 quando comparado aos controles, maior em G4 quando comparado à G1, G2 e G3 e maior em G5 quando comparado aos demais grupos. Resultados semelhantes ao anterior foram apresentados no dia 21 (Figura 4B e 4C).

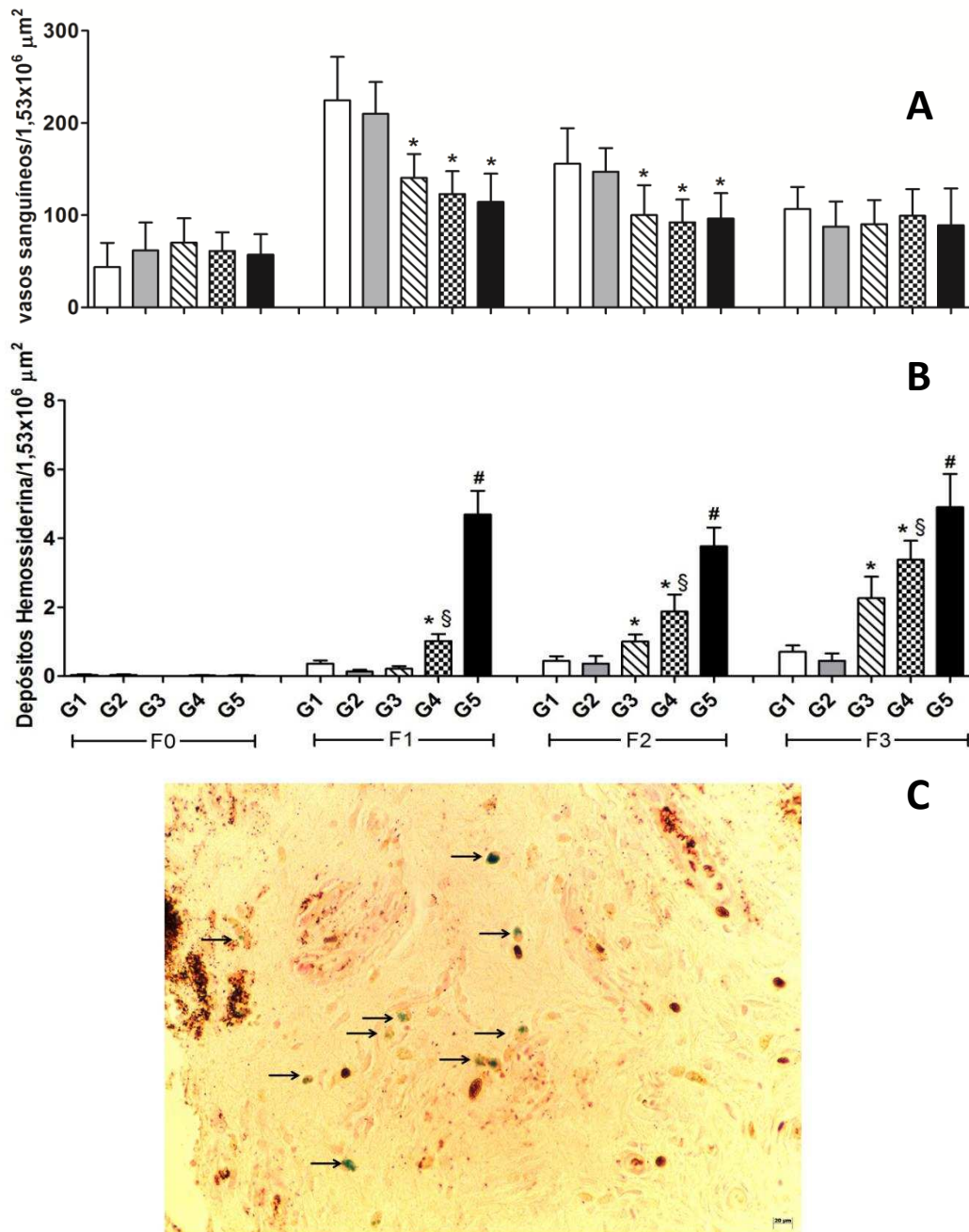


Figura 4: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica na quantidade total de vasos (A) e depósitos de hemosiderina (G4) (B) em feridas cutâneas de ratos wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,#,§ diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); * comparado ao G1 e G2, # comparado ao G1, G2, G3 e G4. § comparação com G1, G2 e G3. Em C, a fotomicrografia mostra depósitos de hemossiderina (azul). Barra: $20 \mu\text{m}$. Coloração de Perls e vermelho neutro.

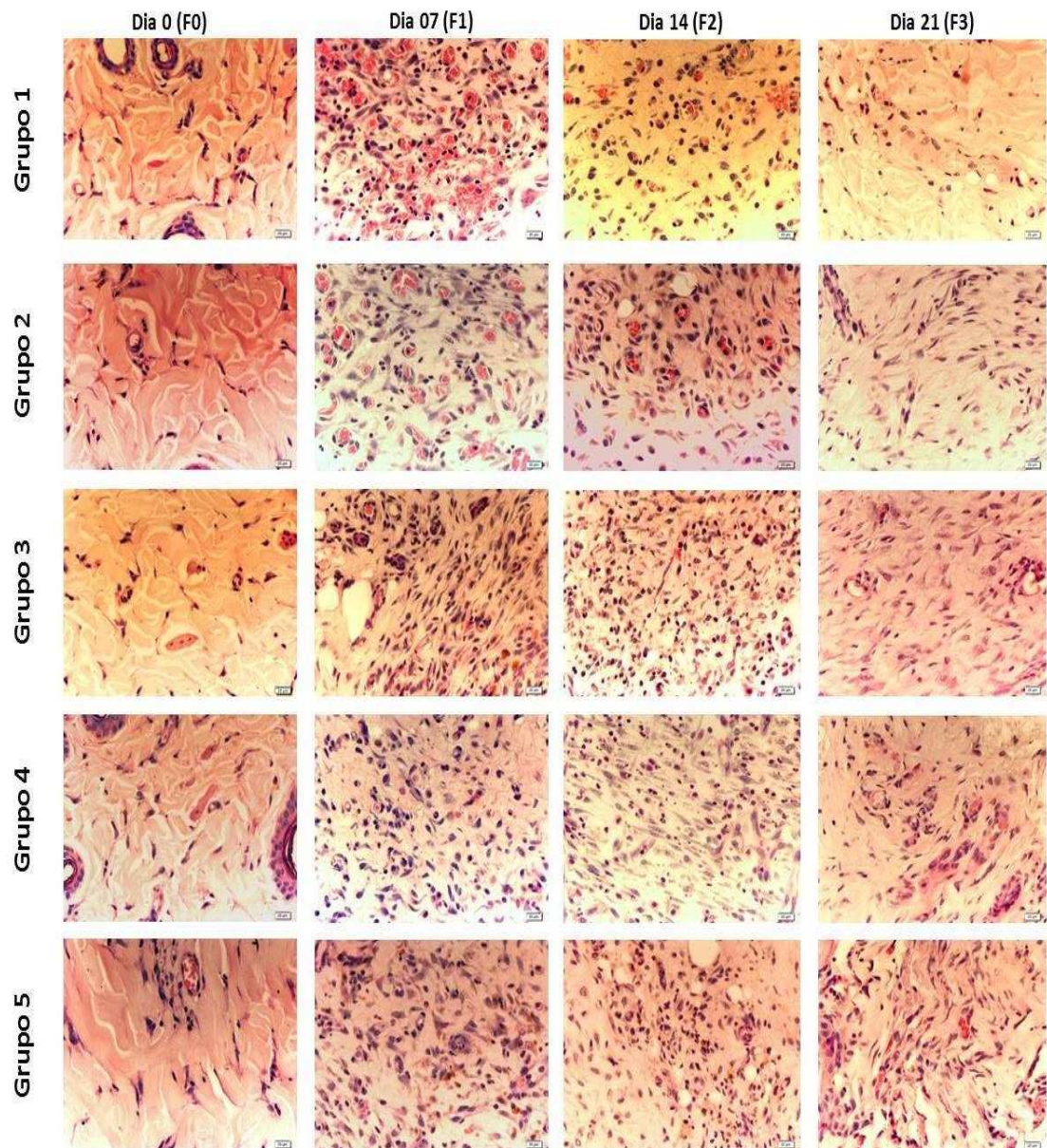


Figura 5: Fotomicrografias que demonstram a distribuição de vasos sanguíneos no tecido cicatricial em ratos wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e etanol 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7,14 e 21 dias respectivamente. Barra: 20 μ m. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).

A figura 6 mostra os efeitos do consumo de dieta hipercalórica e álcool sobre a produção de fibras colágenas tipo I, tipo III e sobre fibras elásticas. No dia 7 houve um retardo na deposição de fibras colágenas do tipo I em G3, G4 e G5, quando comparado à G1 e G2. Os grupos G4 e G5 apresentaram um retardo na produção destas fibras quando comparado à G1, G2 e G3 (Figura 6A). No dia 14 os grupos G3, G4 e G5 apresentaram um retardo na deposição de colágeno I quando comparado à G1 e G2. No dia 21 os grupos G4 e G5 apresentaram um atraso na deposição de fibras quando comparado à G1, G2 e G3 (Figura 6A). Em relação às fibras colágenas do tipo III no dia 7 e no dia 14 os grupos G3, G4 e G5 apresentaram um retardo na deposição de fibras quando comparado à G1 e G2 (Figura 6B). A análise de fibras elásticas mostrou que não houve diferença entre os grupos durante todo o experimento (Figura 6C). A figura 7 demonstra o retardo da síntese de colágeno I em G3, G4 e G5, em relação a G1 e G2, sobressaindo assim às fibras de colágeno do tipo III, apesar de apresentar deposição inferior em relação ao G1 e G2.

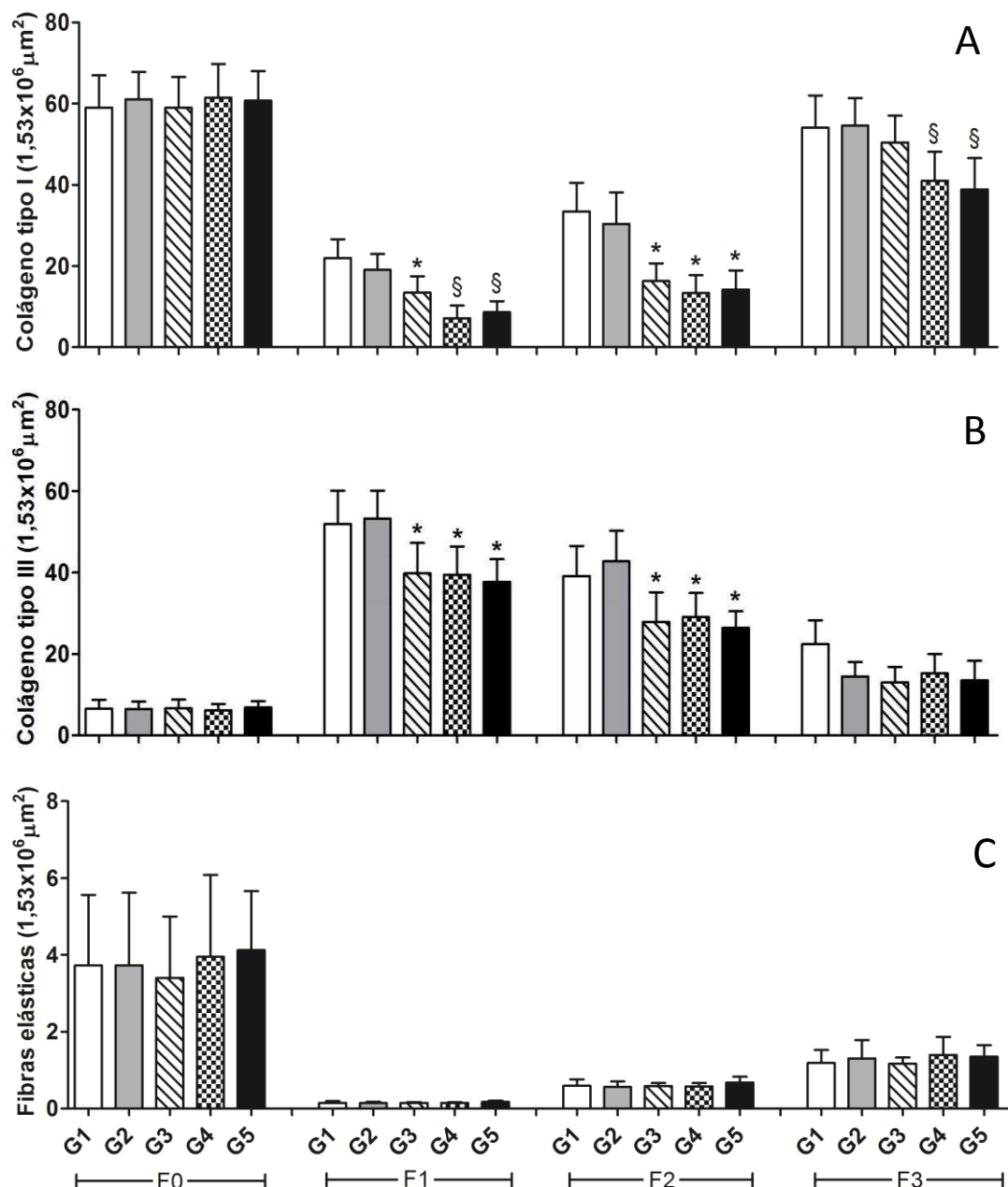


Figura 6: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica na quantidade total de colágeno do tipo I (A), colágeno do tipo III (B) e fibras elásticas (C) em feridas cutâneas de ratos wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,§ diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); * comparado ao G1 e G2, § comparação com G1, G2 e G3.

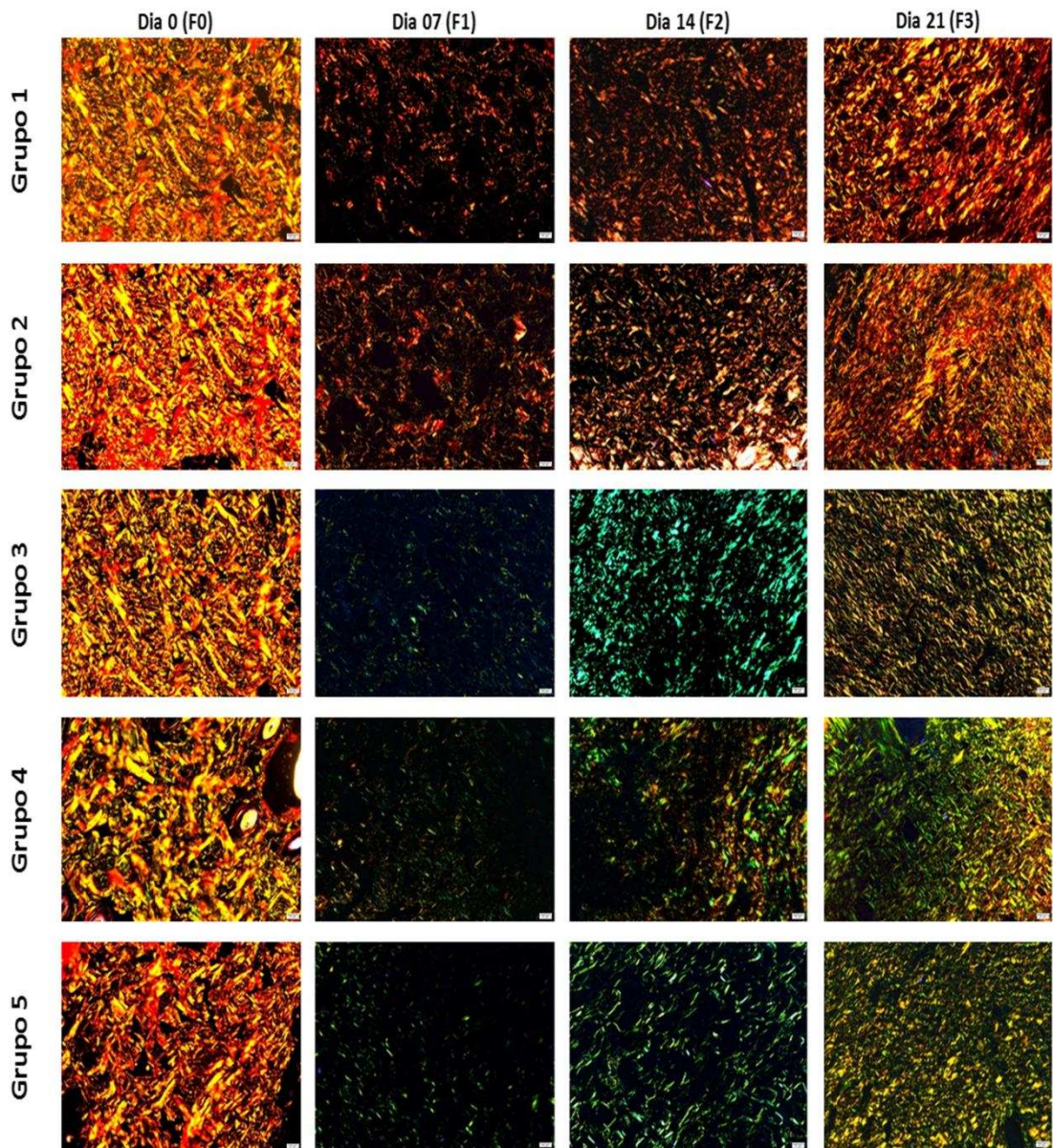


Figura 7: Fotomicrografias sob luz polarizada que demonstram a distribuição de colágeno no tecido cicatricial. Fibras vermelhas e amarelas (colágeno I) e fibras verdes (colágeno III). Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e etanol. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Barra: 20 μ m. Coloração Sirius Red.

A análise de TGF- β mostrou que no dia 7 (F1), G3, G4 e G5 apresentaram valores maiores quando comparado à G1 e G2, sendo que G5 foi menor que G4. No dia 14 (F2), os grupos G3 e G5 apresentaram valores maiores que G1 e G2, e os níveis de TGF- β em G4 foram maiores que G3 e G5 (Figura 8).

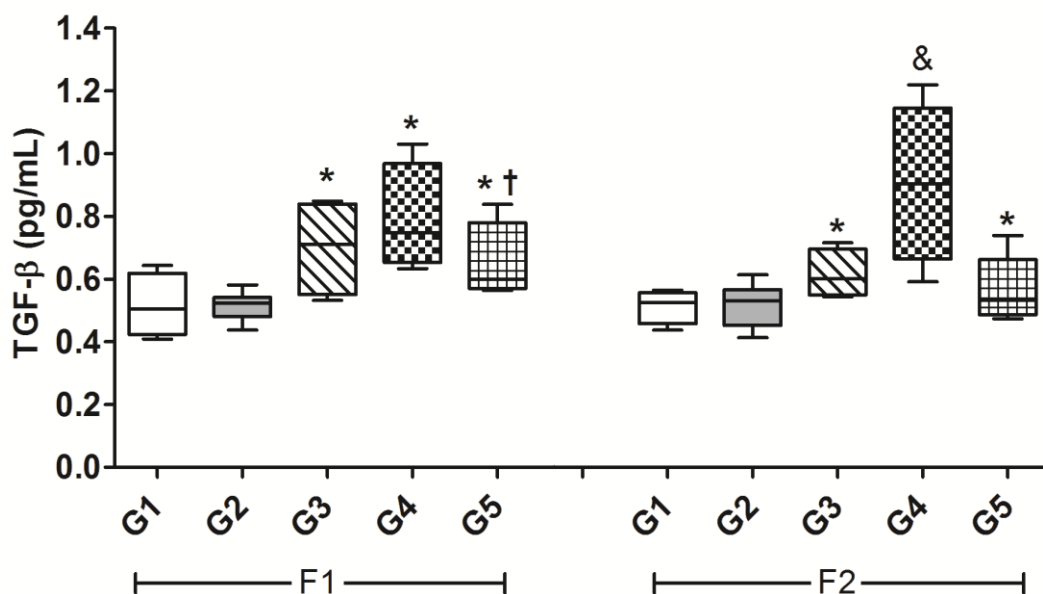


Figura 8: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica nos níveis de TGF- β em feridas cutâneas de ratos wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,†,& diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); * comparado ao G1 e G2, † comparado ao G4 e & comparado com G3 e G5.

A análise de enzimas antioxidantes mostrou que os grupos que receberam dieta hipercalórica e álcool apresentaram atividade elevada de SOD, CAT e GST. A análise de SOD mostrou que G3, G4 e G5 foram maiores que nos grupos controle G1 e G2, sendo que G3 e G5 apresentaram valores ainda maiores quando comparado à G4 no dia 7. No dia 14 os grupos G3, G4 e G5 apresentaram valores maiores para atividades de SOD quando comparado aos controles (Figura 9A). A análise de CAT mostrou que no dia 7 e no dia 14, G3, G4 e G5 mostraram valores mais elevados quando comparado à G1 e G2. No dia 21, G3 e G5 apresentaram valores mais

elevados quando comparado à G1, G2 e G4 (Figura 9B). Em relação à GST os grupos G3, G4 e G5 apresentaram valores maiores no dia 7, quando comparado aos controles G1 e G2 (Figura 9C).

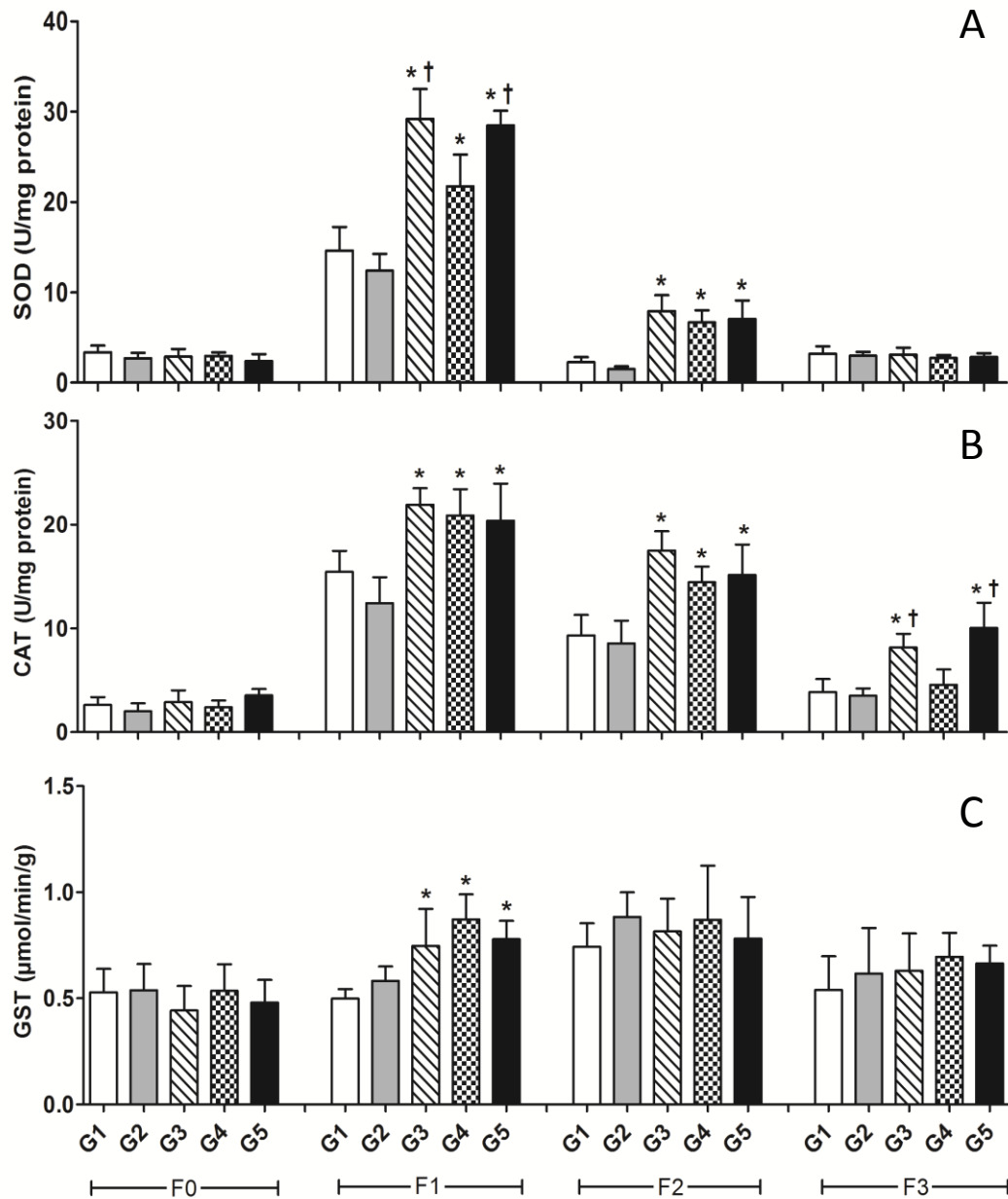


Figura 9: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica na atividade das enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutase (A) Catalase (B) e Glutaciona-S-Transferase (C) em feridas cutâneas de ratos wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e etanol 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,† diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$). * comparado ao G1 e G2, † comparado ao G4.

A análise de marcadores de estresse oxidativo mostrou que no dia 7 (F1), G3 e G5 apresentaram os maiores valores para TBARS e Proteínas carboniladas quando comparado aos grupos controles e G4 (Figura 10A e 10B). No dia 14 e 21 não houve diferença entre os tratamentos.

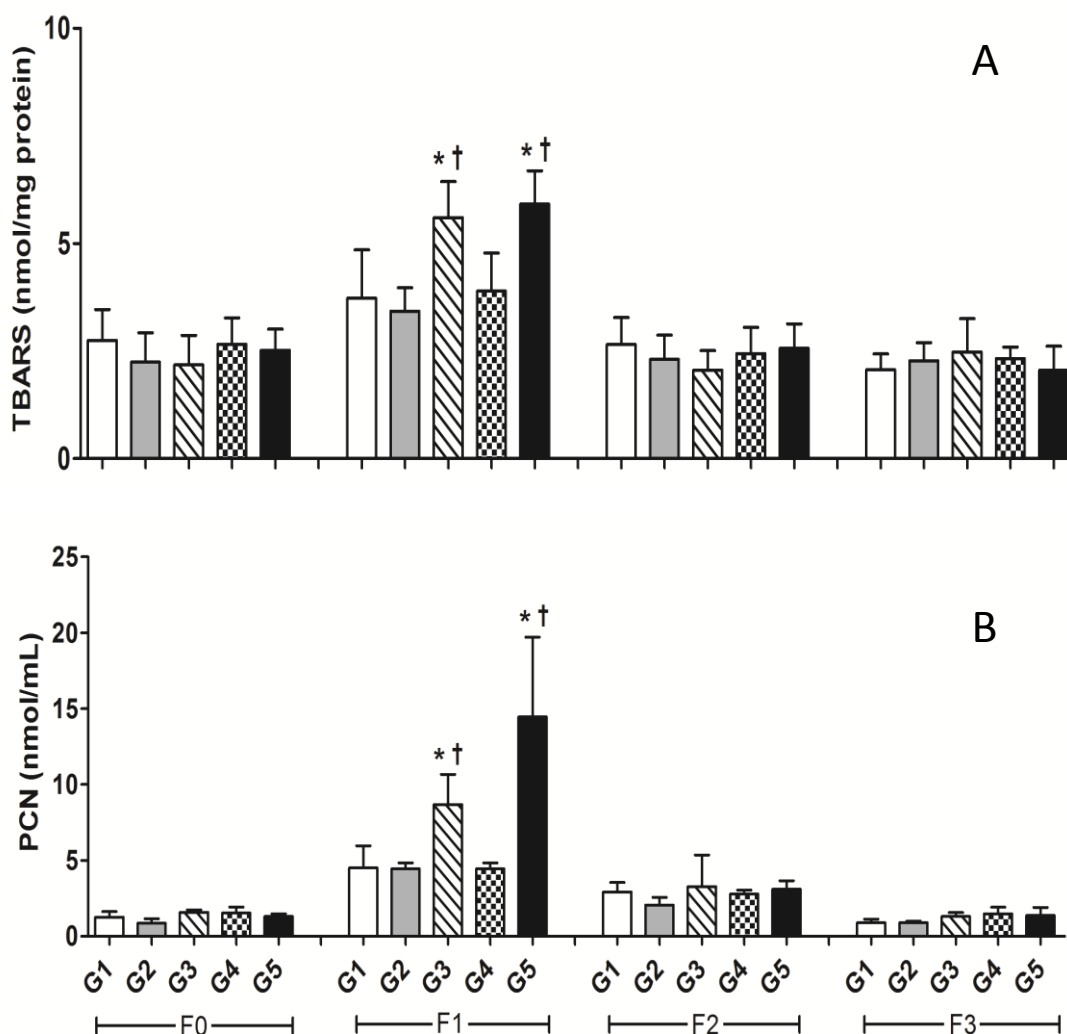


Figura 10: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica nos níveis de TBARS (A) e Proteínas Carboniladas (B) no tecido cicatricial de feridas cutâneas em ratos Wistar. Fragmentos de tecidos foram coletados a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta Hipercalórica (cafeteria), G5: Dieta Hipercalórica (cafeteria) e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,† diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); * comparado ao G1 e G2, e † comparado ao G4.

As análises de marcadores sanguíneos mostrou que a quantidade de triacilgliceróis em G4 e G5 foi maior que G1 e G2. O grupo que recebeu álcool e dieta (G5) mostrou quantidades ainda maiores quando comparado à G4 (Figura 11A). A quantidade de glicose no sangue foi maior em G3, G4 e G5 quando comparado à G1 e G2 (Figura 11B). Os níveis de AST e ALT foram maiores em G3, G4 e G5 quando comparado à G1 e G2 (Figura 11C e 11D).

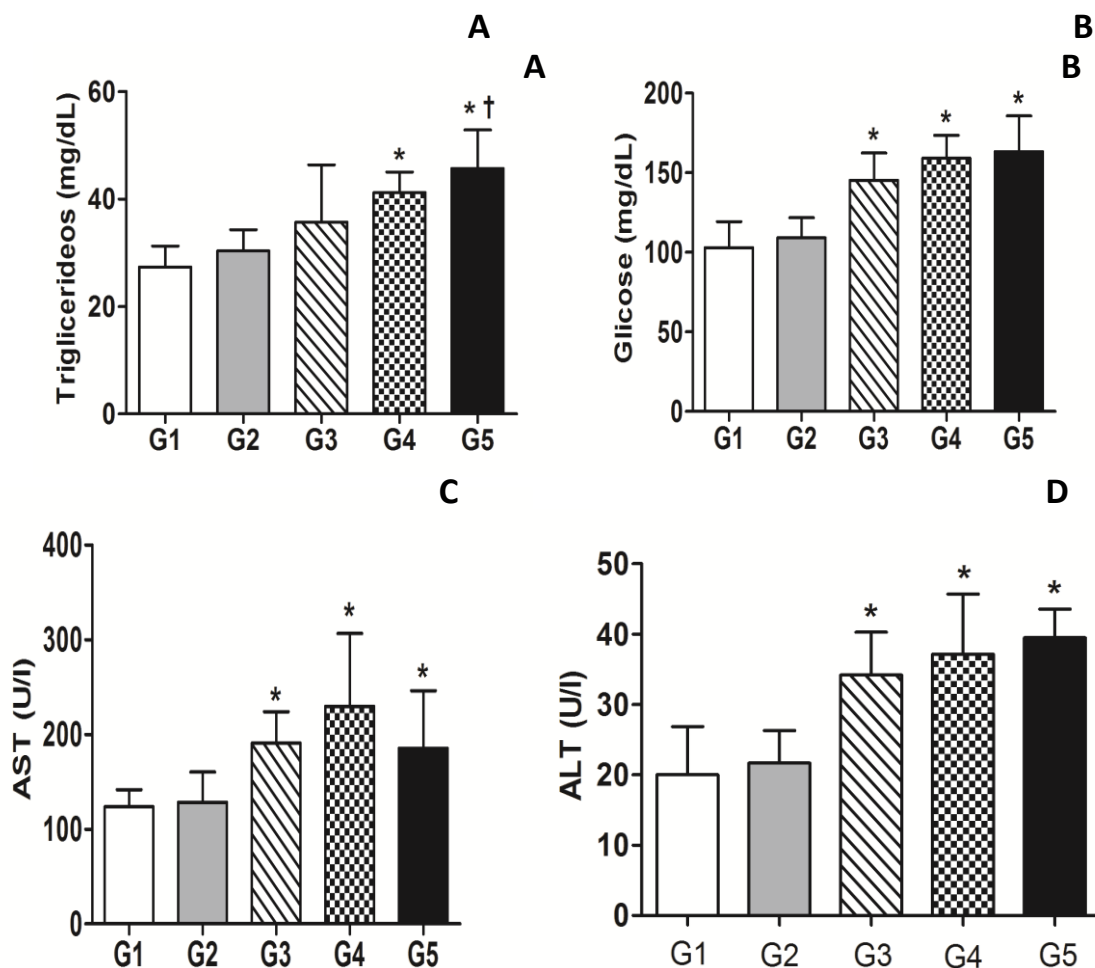


Figura 11: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica nos níveis de triacilgliceróis (A) Glicose (B) AST (C) e ALT (D) no soro de ratos Wistar. Amostras sanguíneas foram coletadas durante a eutanásia (dia 61). G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *,† diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); * comparado ao G1 e G2, e † comparado ao G4.

Nos grupos tratados com álcool isolado e associado à dieta hipercalórica, observou-se a área da ferida maior em relação ao grupo controle (G1) durante a cicatrização em F1, F2 e F3 (Figura 12). Da mesma forma, os grupos tratados apenas com dieta hipercalórica também demonstraram valores superiores da área de ferida durante os 21 dias (F1, F2 e F3). Não houve diferenças significantes no índice de contração de feridas em nenhum grupo tratado.

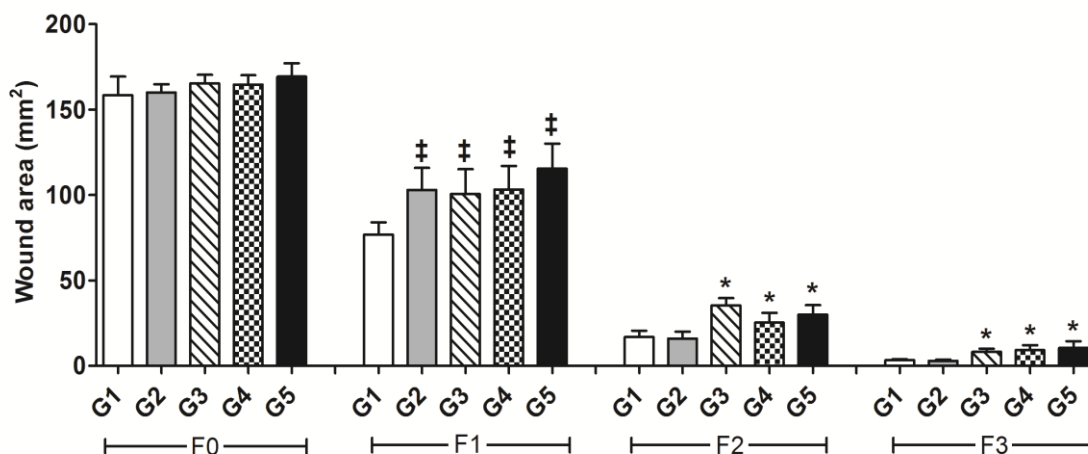


Figura 12: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica sobre a área de feridas cutâneas de ratos Wistar. A área da ferida foi aferida a cada 7 dias durante 21 dias. G1= Controle, dieta comercial e água por gavagem, G2: Controle, dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica, G5: Dieta hipercalórica e álcool 40%. F0= tecido ileso, F1, F2, F3= tecido cicatricial com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Dados são relatados como média±desvio padrão (DP). *, † diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0.05$); *comparado ao G1 e G2, † comparado ao G1.

Na análise dos parâmetros biométricos, a CEA foi maior em G2 e G4 quando comparado aos demais grupos. Em relação à TEP G2 foi maior que G1, G3 e G5 e foi menor que G4. O grupo que recebeu apenas dieta hipercalórica (G4) apresentou valores mais elevados para TEP quando comparado aos demais grupos. O IMC inicial foi igual para todos os grupos. O IMC final foi menor em G5 quando comparado aos demais grupos.

Tabela 2: Efeito do álcool e da dieta hipercalórica nos parâmetros biométricos, Coeficiente de eficiência alimentar (CEA), taxa específica de ganho de peso (TEP) e índice de massa corporal (IMC).

Grupos	CEA		TEP		IMC inicial		IMC final	
	<i>Média</i>	<i>D.P</i>	<i>Média</i>	<i>D.P</i>	<i>Média</i>	<i>D.P</i>	<i>Média</i>	<i>D.P</i>
G1	243,52	±15,8 ^a	52%	±0,04 ^b	4,24	±0,31 ^a	5,25	±0,34 ^a
G2	273,89	±43,8 ^b	61%	±0,14 ^c	4,44	±0,26 ^a	5,52	±0,93 ^a
G3	233,44	±20,1 ^a	43%	±0,14 ^a	4,14	±0,42 ^a	4,83	±0,25 ^a
G4	286,17	±26,1 ^b	83%	±0,30 ^d	4,04	±0,42 ^a	5,29	±0,37 ^a
G5	214,07	±51,4 ^a	43%	±0,05 ^a	4,15	±0,25 ^a	4,55	±0,14 ^b

Dados foram expressos como média±desvio padrão (DP). G1= Controle, Dieta comercial e água com gavagem, G2: Controle, Dieta comercial e água sem gavagem, G3: Dieta comercial e álcool 40%, G4: Dieta hipercalórica (cafeteria), G5: Dieta hipercalórica (cafeteria) e álcool 40%. ^{a,b,c,d} letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. $p \leq 0,05$.

4. Discussão

Neste estudo fica evidente que o consumo de dieta hipercalórica e álcool, isolados ou associados, promove retardo no reparo de feridas cutâneas de segunda intenção, uma vez que causam alterações morfológicas, bioquímicas e biométricas no organismo acarretando alterações celulares e teciduais que comprometem o processo de reparo. Desequilíbrios na proliferação celular, devido ao aumento da liberação de mediadores químicos, aumento de infecções e excesso de migração celular causada por processos inflamatórios vêm sendo demonstrado em modelos de reparo cutâneo com exposição aguda ao álcool^(21,45). Além disto, o consumo dieta de cafeteria, também tem demonstrado efeitos negativos no processo de reparo tecidual, uma vez que estas dietas são utilizadas para induzir a obesidade e este aumento de adiposidade promove a liberação de adipocinas que retardam a formação de células sanguíneas importantes para a defesa do organismo e alteram a liberação de mediadores envolvidos na síntese de proteínas e na proliferação celular^(45,46).

Nossos resultados mostram que a um aumento na celularidade nos grupos tratados com álcool e dieta gorda. Além disto houve um aumento de mastócitos no G 5, em relação aos demais grupos (Figura 2). Estes dados podem indicar um aumento do processo inflamatório que é caracterizado por aumento da migração e proliferação celular, além disto, o aumento de mastócitos promove uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que também facilitam a chegada de novas células ao local lesado. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos tratados alimentados com dieta rica em gordura trans^(47,48) e em estomago de ratos que receberam altas doses de álcool⁽⁴⁹⁾. Os achados destes estudos com dieta rica em gorduras, também mostram que na fase de remodelação (21 dias), onde a proliferação celular é menor e a maturação do tecido é maior, ainda existe grande quantidade de células nos grupos que receberam álcool e dieta hiperlipídica. Estes dados podem indicar um atraso no processo de reparo, uma vez que nesta fase as células tendem a sofrer apoptose e apresentar redução em seu número. Desta forma, o tecido assume as características de pele íntegra^(50,51). No entanto, existem relatos de que a exposição aguda ao álcool promove uma redução da proliferação celular, com diminuição da resposta inflamatória, sugerindo que o álcool poderia limitar a transição da fase inflamatória para a proliferativa^(2,52).

Nós analisamos a vascularização tecidual durante o processo de reparo cutâneo e observamos que os grupos que receberam álcool e dieta hipercalórica apresentaram uma neovascularização menor. A vascularização tecidual é considerada um fator crucial para o processo de cicatrização, uma vez que é responsável por fornecer aos tecidos oxigênio e nutrientes necessários para a atividade metabólica das células^(1,11,53). Os resultados apresentados neste estudo são semelhantes aos dados demonstrados por Radek et al. (2005)⁽⁵⁴⁾ onde camundongos expostos ao álcool 20%, de forma aguda exibiram menor vascularização, além disto, segundo Costa et al. (2013)⁽⁵⁵⁾ animais diabéticos que receberam álcool à 5% apresentaram redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Existem relatos de que a administração de dieta hipercalórica em camundongos promove diminuição da expressão de VEGF, reduzindo a vascularização tecidual em feridas cutâneas e compromete também o reparo ósseo^(47,56,57).

O acúmulo de ferro no interior dos tecidos geralmente é causado quando a quantidade de bilirrubina proveniente da destruição das hemácias é grande, e quando não ocorre a biotransformação da bilirrubina, que auxilia na sua eliminação. Neste caso os hepatócitos e macrófagos hepáticos não conseguem realizar a biotransformação e a bilirrubina não é excretada pela urina e se acumula em tecidos diversos, como a pele, formando depósitos de hemossiderina^(58,59,60). Este quadro é muito comum em casos de cirrose hepática, doença que compromete todo o funcionamento do organismo. Nossos resultados mostram que houve um acúmulo de ferro (hemossiderina) no tecido cutâneo neoformado, principalmente nos animais que receberam álcool e dieta hipercalórica associados, estes achados podem ser justificados por uma possível sobrecarga do fígado dos animais, uma vez que os níveis de ALT e AST estavam alterados. Alguns estudos têm relatado os efeitos negativos da dieta hiperlipídica e do álcool no fígado dos animais, promovendo processos degenerativos, morte celular e fibrose que comprometem todo o funcionamento do órgão^(61,62,63).

Além de células e vasos, o tecido neoformado, também conhecido como tecido de granulação, é constituído por componentes fibrilares que dão suporte para migração celular e serve de arcabouço para maturação tecidual, conferindo à nova pele resistência e força^(14,64,65). Os nossos resultados demonstraram que a administração de álcool e da dieta hipercalórica retardou a deposição de fibras colágenas do tipo I e III (Figura 6). Estes resultados se assemelham aos encontrados

por Radek et al. (2007)⁽⁶⁶⁾, que demonstrou que exposição ao álcool reduziu significativamente os níveis de colágeno total no sétimo dia após a realização das feridas e aumentou a expressão de metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz. Estudos *in vitro* também mostraram que o etanol inibiu a síntese de colágeno^(65,67,68). Alguns relatos também mostram os efeitos negativos da dieta hipercalórica para síntese dos constituintes da matriz. Segundo Nascimento e Costa, (2011)⁽⁴⁶⁾, animais que receberam dieta rica em gordura apresentaram retardo na síntese de fibras colágenas do tipo I com predomínio da síntese de fibras colágenas do tipo III, além disso, os níveis de hidroxiprolina foram menores no sétimo dia após a realização das feridas. A densidade de colágeno também foi menor no grupo tratado com dieta enriquecida com gordura, o que pode indicar um atraso na síntese e remodelação da matriz extracelular e permitir a formação de uma cicatriz mais frágil e menos resistente⁽⁶⁹⁾. Camundongos que receberam dieta hiperlipídica também apresentaram redução na remodelação do colágeno e alteração no alinhamento das fibras, comprometendo as propriedades biomecânicas e a regeneração de animais com lesão em tendões⁽⁷⁰⁾. Quando a administração da dieta hipercalórica está associada à alguma doença metabólica, como por exemplo o diabetes, ocorre aumento da expressão de metaloproteinases e redução da expressão do colágeno, o que confere ao tecido menor capacidade de resistir às pressões⁽⁷¹⁾.

Os resultados encontrados em nosso estudo mostram que os níveis de ALT, AST e triglicérides no soro dos animais estavam mais elevados nos animais que receberam álcool e dieta hipercalórica. Resultados semelhantes foram apresentados por Bakhautdin et al. (2014)⁽⁷²⁾ no qual animais que receberam dieta líquida contendo álcool 36% apresentaram aumento na concentração de ALT, AST e triglicérides devido ao estresse oxidativo apresentado pelo fígado. Para Hajrezaie et al. (2015)⁽⁷³⁾, a administração de álcool absoluto também promove aumento destes marcadores sanguíneos por aumentar a formação de radicais livres no fígado e por promover desestruturação da morfologia hepática. A administração de dieta rica em gordura também pode promover aumento de AST, ALT e triacilgliceróis no sangue (Figura 11), uma vez que pode levar ao desenvolvimento de degenerações que alteram a estrutura das membranas celulares causando morte celular^(74,75). O aumento de triacilgliceróis está geralmente ligado à alterações metabólicas que podem alterar a cicatrização de feridas cutâneas pelo intenso processo inflamatório e por causar um distúrbio na liberação de mediadores químicos⁽⁴⁵⁾. Outro fator importante que

apresentou elevação no soro em nosso trabalho foi a glicose (Figura 11B). Relatos na literatura mostram que o aumento constante de glicose no sangue pode levar ao diabetes tipo II e conseqüentemente comprometer todo o processo cicatricial, principalmente a fase de neovascularização^(71,76). Alguns estudos tem demonstrado que a administração de dieta rica em gordura causa aumento da glicose em várias espécies animais e comprometem a função metabólica destes organismos durante o processo de reparo tecidual^(70,71). Resultados negativos sobre a administração de dieta hipercalórica e álcool não se limitam ao processo de reparo cutâneo. Existem relatos que a formação do calo ósseo e a reconstrução do tecido são afetadas pela ingestão destes componentes^(57,61).

A cicatrização de feridas é um processo complexo coordenado pela liberação de mediadores químicos de forma controlada a fim de promover a regeneração do tecido e homeostase⁽⁷⁷⁾. Baseado nisto, a dosagem de alguns fatores de crescimento torna-se importante para demonstrar a influência destes fatores sobre o processo de reparo. O TGF- β é um importante marcador tecidual que pode ser produzido por várias células em resposta a uma agressão, são produzidos por períodos curtos e em quantidade limitada, uma vez que sua ação ocorre em fases pontuais do processo^(78,79). Em nossos resultados chama a atenção a grande quantidade de TGF- β produzido pelos grupos que receberam álcool e dieta hipercalórica contrariando a afirmação acima de que sua produção seria curta e limitada.

Geralmente quando estes mediadores estão sendo produzidos em grande quantidade está ocorrendo um processo de inflamação crônica, onde existe uma proliferação celular muito grande e estas células para tentar resolver esta inflamação começam a produzir mediadores anti-inflamatórios. Por isso, em regiões com processo inflamatório persistente é comum encontrar mediadores pró e anti-inflamatórios, além de elevado número de células, fibras e pontos de necrose^(80,81,82). No entanto, para que esta hipótese fosse comprovada seria necessária a análise de outros mediadores como TNF- α e interleucinas que também modulam o processo inflamatório e conseqüentemente o processo de reparo. Outro ponto que deve ser levantado é que a produção excessiva de TGF- β poderia levar a deposição desorganizada das fibras colágenas, uma vez que durante a inflamação crônica a deposição correta das fibras fica comprometida e conseqüentemente ocorre a formação de queloides e cicatrizes hipertróficas⁽⁸³⁾. Resultados semelhantes ao do nosso estudo foram encontrados por Otranto et al. 2013⁽⁸⁴⁾, que observou níveis

elevados de TGF- β em animais que receberam dieta gorda após 14 dias de realização das feridas. No entanto, outros estudos mostram uma redução nos níveis de TGF- β em animais expostos ao etanol em reparo ósseo⁽⁸⁵⁾ e em fibroblastos *in vitro* durante o reparo cutâneo⁽⁶⁸⁾.

Os achados de nosso estudo confirmam relatos prévios de que o trauma provocado no tecido cutâneo aumenta o estresse oxidativo na região da lesão e conseqüentemente no tecido cicatricial^(15,86). Os achados destes estudos podem ser confirmados em nosso trabalho pela análise das figuras 5 e 6 que mostraram o aumento dos marcadores de estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes no tecido cicatricial de 7 dias, diferente dos resultados mostrados pelo tecido de pele íntegra (F0). Somado ao fato de que a lesão por si só já é capaz de produzir radicais livres no tecido, quando os animais receberam álcool e dieta gorda, a produção de espécies reativas de oxigênio e de enzimas antioxidantes fica ainda mais evidente. Já é conhecido que a ação dos radicais livres sobre o tecido promove o chamado estresse oxidativo no interior das células lesando membranas, proteínas e o material genético^(45,87,88).

Em nosso estudo o excesso de produção de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (Malondialdeído) e proteínas carboniladas mostram a ação negativa do consumo de álcool e dieta hipercalórica para o reparo cutâneo. Estes resultados podem ser confirmados pelos achados de Gika e Wilson, (2014)⁽⁸⁹⁾ em análises *in vitro*, e em vivo por Curtis et al. (2014)⁽²⁾, na qual ambos os achados demonstram que o etanol, através da oxidação do acetaldeído altera o pH do estrato córneo da epiderme e prorroga a inflamação no tecido cicatricial. Porém, o aumento do estresse oxidativo no tecido também pode ser observado em trabalhos utilizando dieta hipercalórica^(76,90). Segundo Nascimento e Costa, (2011)⁽⁴⁷⁾, ratos obesos também apresentam maior peroxidação lipídica quando comparado com ratos de peso normal. Este aumento do estresse oxidativo pode estar associado ao diabetes e alterações nos níveis de insulina⁽⁸⁴⁾. A análise dos níveis de proteínas carboniladas no tecido é considerado um bom marcador da destruição de proteínas pela ação de radicais livres e segundo Hiebert e Granville, (2013)⁽⁹¹⁾, a pele de animais machos alimentados com dieta gorda apresentam níveis elevados deste marcador. Geralmente quando existe destruição proteica, já ocorreu destruição dos lipídeos das membranas, e a associação destes dois marcadores representa a confirmação da instalação de degeneração no tecido e conseqüente morte celular⁽⁸⁴⁾.

O desequilíbrio na geração de radicais livres também pode ser dosado pelo aumento na expressão de proteínas antioxidantes como SOD, CAT e GST, enzimas responsáveis por eliminar o excesso de radicais livres no interior das células^(92,93,94). A enzima Superóxido-Dismutase (SOD) é a primeira defesa antioxidante da célula, catalisando a transformação do íon superóxido (O^*), extremamente lesivo às células, em H_2O_2 e sua ação é acompanhada pela catalase que elimina o H_2O_2 e converte-o em água e O_2 molecular⁽⁹⁵⁾. A enzima Glutathione-S-Transferase (GST) catalisa reações que utilizam a glutathione como co-fator ou substrato e mantém o equilíbrio redox intracelular⁽⁹⁶⁾. Nossos resultados mostram que o álcool e a dieta hipercalórica aumentam a atividade de SOD, CAT e GST, indicando que o tecido está passando por um processo de estresse e que necessita ativar seus sistemas de defesa. Estudos trabalhando com diferentes tecidos demonstraram que o aumento destas enzimas antioxidantes geralmente indica lesão tecidual grave e retardo no processo de cura^(16,88). No entanto existem relatos de que a lesão tecidual pode ser tão intensa que ao invés de aumentar os níveis destas enzimas pode causar uma exaustão enzimática, ou seja, uma diminuição na atividade destas proteínas, no entanto, quando este fenômeno ocorre geralmente o tecido não pode mais regenerar e evolui para necrose^(88,97).

Em relação à área da ferida os grupos que receberam álcool isolado, dieta hipercalórica, e álcool associado à dieta hipercalórica apresentaram a área da ferida maior em relação ao grupo controle (Figura 12), apesar de não apresentarem diferença significativa na velocidade no fechamento da ferida. Animais tratados com álcool apresentaram área da ferida maior e uma redução da síntese de colágeno^(54,66), podendo indicar um atraso na cicatrização que não refletiu na repitelização e dessa forma o tecido apresentou-se superficialmente cicatrizado. Porém, um atraso na cicatrização e na contração de feridas cutâneas foi observado em ratos tratados com dieta rica em gordura^(47,56).

Ao analisar os parâmetros biométricos observamos que o CEA e a TEP foram maiores nos grupos G2 e G4, acreditamos que este resultado pode ser justificado pela ausência do estresse da gavagem e da administração nestes dois grupos, uma vez que o IMC final destes grupos também foi maior quando comparado aos grupos que receberam álcool e a gavagem com água, o que pode reforçar a interferência do álcool no ganho de peso e na ingestão de alimentos, uma vez que o etanol comprovadamente provoca lesão na mucosa gástrica e conseqüentemente dificulta a

alimentação⁽⁷³⁾, e do estresse da gavagem em si. Alguns estudos têm relatado que animais que receberam etanol apresentam redução do peso corporal^(61, 98,99). Nossos resultados mostram que os animais que receberam dieta hipercalórica associado a álcool apresentaram o menor ganho de peso quando comparado aos demais. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Reis et al., (2015)⁽¹⁰⁰⁾ que mostrou uma redução de peso em ratos fêmeas que receberam uma dieta calórica associada ao álcool na concentração de 20% durante a lactação. Acreditamos que a dieta gorda contribuiu para o aumento do CEA, TEP e IMC no G4, pois se trata de uma dieta rica em gorduras e palatável. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados em alguns trabalhos que relatam que ratos tratados com dieta gorda apresentaram aumento de peso e do consumo alimentar, quando comparado aos animais que receberam dieta com baixas calorias^(69,57,101,102,103).

5 Conclusão:

O álcool e a dieta gorda causam alterações sistêmicas e locais prejudicando o processo cicatricial. As alterações sistêmicas observadas foram alterações na massa corporal, alterações sorológicas e o depósito de hemossiderina nos tecidos. As alterações locais encontradas neste trabalho foram aumento da fase inflamatória, devido ao aumento do número de células e maior liberação de fatores que atuam na inflamação como TGF- β . Além disto, observamos comprometimento na síntese dos constituintes da MEC, principalmente em relação às fibras colágenas. Estes resultados mostram que o consumo de álcool e de uma dieta rica em gordura pode retardar o processo de cura das lesões, transformando-se em um processo crônico com a formação de uma cicatriz frágil e menos resistente. Os dados encontrados podem facilmente ser extrapolados para humanos, uma vez que o consumo de álcool e de dietas hipercalóricas vem se tornando hábito para a maioria das pessoas.

6 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

7 Referencias

1. Balbino CA, Pereira LM, Curi R (2005) Mechanisms involved in wound healing: a revision. *Rev Bras de Ciên Farm* **41**, 27-51.
2. Curtis BJ, Hlavin S, Brubaker AL, *et al.* (2014) Episodic Binge Ethanol Exposure Impairs Murine Macrophage Infiltration and Delays Wound Closure by Promoting Defects in Early Innate Immune Responses. *Alcohol Clin Exp Res* **38**, 1347–1355.
3. Ojeh N, Pastar I, Canic MT, *et al.* (2015) Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci* **16**, 25476-25501.
4. Nassar D, Letavernier E, Baud L, *et al.* (2012) Activity Is Essential in Skin Wound Healing and Contributes to Scar Formation. *PLoS one* **7**, 1. 1-10
5. Flegg JA, Menon SM, Maini PK, *et al.* (2015) On the mathematical modeling of wound healing angiogenesis in skin as a reaction-transport process. *Front Physiol* **6**, 262-277.
6. Yingjun Su, Ann Richmond (2014) Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of skin Wounds. *Advan in Woun care* **4**, 631-640.
7. Tofetti AHF, Oliveira VR (2006) The importance of the use of sunblocker to prevent the photoaging and skin cancer. *Rev Cien da Univ de Fran.* **6**, 59-66.
8. Labarrade F, Bergeron L, Serre C, *et al.* (2015) Modulating the expression of survivin and other basal epidermal proteins protects human skin from UVB damage and oxidative stress. *J of Cosmet ic Dermatol* **14**, 191-203.
9. Puliafito A, Hufnagel L, Neveu P, *et al.* (2012) Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proc Natl Acad Sci* **109**, 739–744.
10. Amar MB, Wu M (2009) Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing. *Journal of the Royal Society Interface* **11**, 1-7.
11. Mendonça RJ, Netto JC (2009) Aspectos celulares da cicatrização. *Na Bras Dermatol* **84**, 257-262.
12. Mandapalli PK, Labala S, Bojja J, *et al.* (2015) Effect of pirfenidone delivered using layer-by-layer thin film on excisional wound healing retrieved no results. *Eur J Pharm Sci* **15**, 0928-0987.
13. Lichtman MK, Otero-Vinas M & Falanga V (2015) Transforming Growth Factors β (TGF- β) Isoforms in Wound Healing and Fibrosis. *Woun Rep Regen* **26**, 2-26.

14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, *et al.* (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321.
15. Servetto N, Cremonuzzi D, Simes JC, *et al.* (2010) Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med* **42**, 577- 583.
16. Halıcı M, Öner A, Güney Ö, *et al.* (2010) Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklem Hastalık Cerrahisi* **21**, 172 -177.
17. Gonçalves RV, Novaes RD, do Carmo Cupertino M, *et al.* (2012) Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers Med Sci* **28**, 1-8.
18. Dunnill C, Patton T, Brennan J, *et al.* (2015) Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound* **2015**, 1-8.
19. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, *et al.* (2008) The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* **34**, 1159-1169.
20. Perreira LO, Francischi RP & Júnior AHL (2009) Obesidade: Hábitos nutricionais, Sedentarismo e resistência à insulina. *Arp. Bras. Endocrinol Metab* **47 /2**, 111-227.
21. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, *et al.* (2014) Effect of Diet on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation in Mouse Liver Insights into Mechanisms of Hepatic Steatosis. *PLoS one* **9/2**, 1-17.
22. Teixeira FB, Santana LNds, Bezerra FR, *et al.* (2014) Chronic Ethanol Exposure during Adolescence in Rats Induces Motor Impairments and Cerebral Cortex Damage Associated with Oxidative Stress. *PLoS One* **9/6**. 1-8.
23. Lotfi P, Yaghmaei P & Habibi AE (2015) Cymene and Metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. *J of Diabetes & Metabolic Disorder* **2015**, 2-5.
24. Damani SB, Topol EJ (2011) Emerging genomic applications in coronary artery disease. *JACC Interv* **4**, 473-482.
25. Boullart ACI, De Graaf J & Stalenhoef AF (2012) Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 867-875.
26. Jakobsdottir G, XU J, Molin G, *et al.* (2013) High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and

- Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects. *PLoS One* **8**, 1-15.
27. Lee KC, Hsieh YC, Yang YY, *et al.* (2016) Aliskiren Reduces Hepatic steatosis and Epididymal Fat Mass and Increases Skeletal Muscle Insulin Sensitivity in High-Fat Diet-Fed Mice. *Sci Rep* **6**, 1-11.
 28. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, *et al.* (2013) Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice. *PLoS One* **8**, 1-8.
 29. Rosine TC, Silva ASR, Moraes C, *et al.* (2012) Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras* **58**, 383-387.
 30. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, *et al.* (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* **9**, 1109-1117.
 31. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
 32. Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM. (2000) Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat. *Pathophysiology* **7**, 25-32.
 33. Gonçalves RV, Novaes RD, Cupertino CMdo, *et al.* (2012) Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. *Lasers Med Sci* **28**, 383–390.
 34. Meguro R, Asano Y, Odagiri S, *et al.* (2007) Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Histol Cytol* **70**, 1–19.
 35. Puchtler H, Waldrop FS (1979) On the mechanism of Verhoeff's elastica stain: a convenient stain for myelin sheaths. *Histochemistry* **62**, 233-247.
 36. Churukian CJ, Schenk EA (1981) A toluidine blue method for demonstrating mast cells. *J Histotechnol* **4**, 85–86.
 37. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121-126.

38. Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* **186**, 1-85.
39. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2000) Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**, 33-39.
40. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1976) Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **175**, 710-716.
41. David LL, Shearer TR (1989) Role of proteolysis in lenses: a review. *Lens Eye Toxic Res.* **6**, 725-747.
42. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976, **72**, 248.
43. Campbell JA (1963) Pathological aspects of hexachlorobenzene feeding in rats. *Afr J Lab Clin Med* **14**, 203-206.
44. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL (2007) Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* **41**, 111-119.
45. Guo and L.A. DiPietro (2010) Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* **89**, 219-229.
46. Fontana L (2007) Nutrition, adiposity and health. *Epidemiol Prev.* **31**, 290-294.
47. Nascimento AP & Costa AMA (2011) Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. *Brit J of Nutrit* **106**, 603-611.
48. Fujii M, Shimazaki Y, Muto Y, Hohno S, Ohya S, Nabe T (2015) Dietar y deficie ncies of unsatur ated fatty acids and starch cause atopic dermatitis-like pruritus in hairless mice. *Exp Derm* **24**, 108-113.
49. Alvarenga DM, Perez DA, Santos ACG, *et al.* (2015) Previous Ingestion of Lactococcus lactis by Ethanol-Treated Mice Preserves Antigen Presentation Hierarchy in the Gut and Oral Tolerance Susceptibility. *Alcohol Clin Exp Res* **39**, 1453-1464.
50. Andrade AG, Lima CF & Albuquerque AKB (2010) Efeito do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. *Rev Bras de queimaduras* **9**, 21-30.
51. Gonçalves RV, Novaes RD & Matta SLP (2010) Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil

- on skin wounds in Wistar rats: a histomorphometric study. *Photom Laser Surg* **28**, 597-602.
52. Choudhry MA, Fontanillaa CV, Duffnera LA, *et al.* (2000) Ethanol exacerbates T cell dysfunction after thermal injury. *Alcohol* **21**, 239-243.
 53. Flegg JA, Menon SM , Maini PK, McElwain DSL, *et al.* (2015) On the mathematical modeling of wound healing angiogenesis in skin as a reaction-transport process. *Front Physiol* **6**, 262.
 54. Radek KA, Matthies AM & Burns AL (2005) Acute ethanol exposure imphase of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, 1084–1090.
 55. Costa R, Negrão R, Valente I, *et al.* (2013) Modulates Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis in Type 1 Diabetic Rat Skin Wound Healing. *J Nat Prod* **76**, 2047 –2053.
 56. Seitz O, Schurmann C, Hermes N, *et al.* (2010) Wound Healing in Mice Wugth High - Fat Diet – or ob Gene-Induced Diabetes-Obesity Syndromes: A Comparative Study. *Experimental Diab Res* **2010**, 1-15.
 57. Brown MML, Yukata K & Farnsworth GW, *et al.* (2014) Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes. *Plos One* **9**, 1-11.
 58. Hughes VK, Ellis PS & Burt T (2004) The practical application of reflectance spectrophotometry for the demonstration of haemoglobin and its degradation in bruises. *J Clin Pathol* **57**, 355-359.
 59. Caggiati A, Rosi C, Casini A, *et al.* (2010) Skin iron deposition characterises lipodermatosclerosis and leg ulcer. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **40**, 777-782.
 60. Kakizaki P, Valente NY, Paiva DL, *et al.* (2014). Targetoid hemosiderotic hemangioma - Case report. *An Bras Dermatol* **89**, 956-959.
 61. Chakkalakala DA, Novaka JR, Fritza ED, *et al.* (2005). Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Elsev-Alcohol* **36**, 201–214.
 62. Stice CP, Liu C, Aizawa K, *et al.* (2015). Dietary tomato powder inhibits alcohol-induced hepatic injury by suppressing cytochrome p450 2E1 induction in rodent models. *Arch Biochem Biophys* **572**, 81-88.
 63. Xu T, Zheng L, Xu L, *et al.* (2014) Protective effects of dioscin against alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* **88**, 739-753.

64. Gonçalves RV, Novaes RD, Cupertino MC, *et al.* (2014) *Bathysa cuspidata* Extract Modulates the Morphological Reorganization of the Scar Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Rats: A Time-Dependent Study. *Cells Tissues Organs* **2014**, 2-12.
65. Wang Y, Xu R, Luo G, *et al.* (2016) Biomimetic fibroblast-loaded artificial dermis with "sandwich" structure and designed gradient pore sizes promotes wound healing by favoring granulation tissue formation and wound re-epithelialization. *Acta Biomater* **30**, 246-257.
66. Radek KA, Kovacs EJ & DiPietro LA (2007) Matrix Proteolytic Activity During Wound Healing: Modulation by Acute Ethanol Exposure. *Alcohol Clin Exp Res* **31**, 1045–1052.
67. Donejko M, Przyłipiak A, Rysiak E, *et al.* (2015) Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts. *Drug Des Devel Ther* **24**, 6225-6233.
68. Ranzer MJ, Chen L & DiPietro LA (2011) Fibroblast Function and Wound Breaking Strength Is Impaired by Acute Ethanol Intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* **35**, 83–90.
69. Nascimento AP, Costa AMA (2006) Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Brit J of Nutrit* **96**, 1069–1077.
70. David MA, Jones KH, Inzana JA, *et al.* (2014) Tendon Repair Is Compromised in a High Fat Diet-Induced Mouse Model of Obesity and Type 2 Diabetes. *PLoS One* **9**, 1-8.
71. Slavkovsky R, Kohlerova R, Tkacova V, *et al.* (2011) Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. *Wound Rep Reg* **19**, 515–525.
72. Bakhautdin B, Das D, Mandal P, *et al.* (2014) Protective role of HO-1 and carbon monoxide in ethanol-induced hepatocyte cell death and liver injury in mice. *J Hepatol.* **61**, 1029-1037.
73. Hajrezaie M, Salehen N, Karimian H, *et al.* (2015) Biochanin A Gastroprotective Effects in Ethanol- Induced Gastric Mucosal Ulceration in Rats. *PLoS One* **10/3**, e0121529.
74. Gong M, Cao C, Chen F, *et al.* (2015) Electroacupuncture attenuates hepatic lipid accumulation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in obese rats. *Acupunct Med.* **0**, 1-6.

75. Lotfi P, Yaghmaei P & Ebrahim-Habibi A (2015) Cymene and Metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. *J Diabetes Metab Disord* **0**, 1-6.
76. Leite SN, Leite MN, Caetano GF, *et al.* (2015) Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. *Laser in Med Scien* **30**, 1481-1488.
77. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, *et al.* (2015) Therapeutic potential of regulatory cytokines that target B cells. *Int Immunol* **8**, 1-7.
78. Siebert N, Xu W, Grambow E, *et al.* (2011) Erythropoietin improves skin wound healing and activates the TGF- β signaling pathway. *Lab Invest* **91/12**, 1753-1765.
79. Sydow AK, Janbaz C, Kardeby C, *et al.* (2015) IL-1 α Counteract TGF- β Regulated Genes and Pathways in Human Fibroblasts. *J Cell Biochem* **9999**, 1-11.
80. Ginderachte JAV (2012) The wound healing chronicles. *J Blood* **120**, 499-500.
81. Rani M, Zhang Q & Schwacha MG (2014) Gamma delta T cells regulate wound myeloid cell activity after burn. *Shock* **42**, 133-141.
82. Pullerits R, Flodén A, Oltean M (2015) Circulating resistin levels are early and significantly increased in deceased brain dead organ donors, correlate with inflammatory cytokine response and remain unaffected by steroid treatment. *J Transl Med* **13**, 201-209.
83. Lee K, Lee B, Lee MH, *et al.* (2015) Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats. *BMC Complement Altern Med* **15**, 1-9.
84. Otranto M, Nascimento AP & Costa AMA (2013) Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound Rep Reg* **21**, 464–447.
85. Driver J , Weber CE , Callaci JJ, *et al.* (2015) Alcohol Inhibits Osteopontin-dependent Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells. *The JI of Biolog* **290/16**, 9959–9973.
86. Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, *et al.* (2009) Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Braz J Phys Ther* **13**, 281–287.
87. Limón-Pacheco J and Gonsebatt ME (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* **674**, 137-147.

88. Scioli MG, Lo Giudice P, Bielli A, *et al.* (2015) Propionyl-L-Carnitine Enhances Wound Healing and Counteracts Microvascular Endothelial Cell Dysfunction. *PLoS One* **10/10**, 1-20.
89. Gika HG & Wilson ID (2014) Global metabolic profiling for the study of alcohol-related disorders. *Bioanalysis* **6/1**, 59–77.
90. Peng X, Nie Y, Wu J, *et al.* (2015) Juglone prevents metabolic endotoxemia-induced hepatitis and neuroinflammation via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway in high-fat diet rats. *Biochem Biophys Res Commun* **462/3**, 245-250.
91. Hiebert PR, Wu D, Granville DJ (2013) Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice. *Cell D and Different* **20**, 1404–1414.
92. Wilgus TA, Wulff BC (2014) The importance of mast cells in dermal scarring. *Adv Wound Care* **3**, 356–365.
93. Lima MH (2004) Oxygen in Biology in Biochemistry: To of free radicals. *Functional Metabolism: Reg and Adapt*, **2004**, 319-368.
94. Ewertowska M, Mikolajczak PL, Okulicz-Kozaryn I, *et al.* (2015) Different response of antioxidant defense system to acamprosate in ethanol preferring and non-preferring rats. *Acta Pol Pharm* **72/3**, 439-45.
95. Dhoub H, Jallouli M, Draief M (2015) Oxidative damage and histopathological changes in lung of rat chronically exposed to nicotine alone or associated to ethanol. *Pathol Biol* **63/6**, 258-267.
96. Dancy BM, Brockway N, Ramadasan-Nair R, *et al.* (2015) Glutathione S-transferase mediates an ageing response to mitochondrial dysfunction. *Mech Ageing Dev* **153**, 14-21.
97. Boligon AA, de Freitas RB, de Brum TF, *et al.* (2014) Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharm Sin B* **4/5**, 358-367.
98. Paula AB, Dias MI, Ferreira MM (2015) Effects on gastric mucosa induced by dental bleaching - an experimental study with 6% hydrogen peroxide in rats. *J Appl Oral Sci* **23/5**, 497-507.
99. Elmali N, Ertem K, Ozen S, *et al.* (2012) Fracture Healing and Bone Mass in Rats Fed on Liquid Diet Containing Ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* **26/4**, 509–513.

100. Reis KP, Heimfarth L, Pierozan P, *et al.* (2015) High postnatal susceptibility of hippocampal cytoskeleton in response to ethanol exposure during pregnancy and lactation. *Alcohol* **49/7**, 665-674.
101. Mohamad-Shahi M, Karandish M, Haidari F, *et al.* (2012) Effect of daidzein-low-calorie diet on body weight, serum levels of glucose, resistin, and high sensitive C-reactive protein in high fat, high calorie diet induced rats. *Saudi Med J* **33/1**, 70-5.
102. Ramos-Romero S, Molinar-Toribio E, Gómez L, *et al.* (2013) Effect of (D)-fagomine on excreted Enterobacteria and weight gain in rats fed a high-fat high-sucrose diet. *Obes (Sil Spr)* **22/4**, 976-979.
103. Collins KH, Hart DA, Reimer RA, *et al.* (2015) Response to diet-induced obesity produces time-dependent induction and progression of metabolic osteoarthritis in rat knees. *J Orthop Res* **2015**, 1-9.

4. CONCLUSÕES GERAIS:

- ✓ O consumo de álcool em diferentes concentrações prejudica o reparo ósseo e cutâneo, principalmente pelo aumento do estresse oxidativo e da expressão de citocinas, como o TGF- β .
- ✓ A maioria dos trabalhos com reparo ósseo e cutâneo não fornece suporte suficiente para reprodução dos trabalhos, apresentando informações metodológicas limitadas.
- ✓ Dietas ricas em gorduras prejudicam a cicatrização de feridas por alterar os níveis de glicose no sangue, podendo em longo prazo causar diabetes, prejudicando a angiogênese, aumentando o estresse oxidativo e expressão de citocinas.
- ✓ O álcool e dieta hipercalórica aumentam os níveis de triacilglicerol, ALT e AST no soro de ratos Wistar.
- ✓ Danos no reparo cutâneo são evidentes, pela redução de colágeno e vasos sanguíneos nos grupos tratados com dieta e álcool e pelo aumento descoordenado da celularidade do tecido, redução da vascularização e área da ferida maior.

- ✓ Depósitos de ferro no tecido cutâneo apresenta evidência de alteração sistêmica, podendo ser causado pelo funcionamento inadequado do fígado na degradação desta substância pelos hepatócitos e sua posterior deposição na pele.
- ✓ Alterações no peso corporal e no consumo alimentar são indícios da interferência do álcool e dieta hipercalórica no metabolismo dos animais tratados.

5. MATERIAL SUPLEMENTAR

5.1 Table S1: Descriptors used for advanced search in Pubmed and Scopus

Data base	Descriptors	Items Found	Time	Date
P u b M e d	#1 Filtro animal parte 1 (filtro PUBMED) ("animal experimentation"[MeSH Terms] OR "models, animal"[MeSH Terms] OR "invertebrates"[MeSH Terms] OR "Animals"[Mesh:noexp] OR "animal population groups"[MeSH Terms] OR "chordata"[MeSH Terms:noexp] OR "chordata, nonvertebrate"[MeSH Terms] OR "vertebrates"[MeSH Terms:noexp] OR "amphibians"[MeSH Terms] OR "birds"[MeSH Terms] OR "fishes"[MeSH Terms] OR "reptiles"[MeSH Terms] OR "mammals"[MeSH Terms:noexp] OR "primates"[MeSH Terms:noexp] OR "artiodactyla"[MeSH Terms] OR "carnivora"[MeSH Terms] OR "cetacea"[MeSH Terms] OR "chiroptera"[MeSH Terms] OR "elephants"[MeSH Terms] OR "hyraxes"[MeSH Terms] OR "insectivora"[MeSH Terms] OR "lagomorpha"[MeSH Terms] OR "marsupialia"[MeSH Terms] OR "monotremata"[MeSH Terms] OR "perissodactyla"[MeSH Terms] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR "scandentia"[MeSH Terms] OR "sirenia"[MeSH Terms] OR "xenarthra"[MeSH Terms] OR "haplorhini"[MeSH Terms:noexp] OR "strepsirhini"[MeSH Terms] OR "platyrrhini"[MeSH Terms] OR "tarsii"[MeSH Terms] OR "catarrhini"[MeSH Terms:noexp] OR "cercopithecidae"[MeSH Terms] OR "hylobatidae"[MeSH Terms] OR "hominidae"[MeSH Terms:noexp] OR "gorilla gorilla"[MeSH Terms] OR "pan paniscus"[MeSH Terms] OR "pan troglodytes"[MeSH Terms] OR "pongo pygmaeus"[MeSH Terms])	5608832	12:42:04	28/10/2015
P u b M e	#2 Filtro animal parte 2 (filtro PUBMED) ((animals[TIAB] OR animal[TIAB] OR mice[TIAB] OR mus[TIAB] OR mouse[TIAB] OR murine[TIAB] OR woodmouse[TIAB] OR rats[TIAB] OR rat[TIAB] OR murinae[TIAB] OR muridae[TIAB] OR cottonrat[TIAB] OR cottonrats[TIAB] OR hamster[TIAB] OR hamsters[TIAB] OR cricetinae[TIAB] OR rodentia[TIAB] OR rodent[TIAB] OR rodents[TIAB] OR pigs[TIAB] OR pig[TIAB] OR	29204	12:42:48	28/10/2015

d swine[TIAB] OR swines[TIAB] OR piglets[TIAB] OR piglet[TIAB] OR boar[TIAB] OR boars[TIAB] OR "sus scrofa"[TIAB] OR ferrets[TIAB] OR ferret[TIAB] OR polecat[TIAB] OR polecats[TIAB] OR "mustela putorius"[TIAB] OR "guinea pigs"[TIAB] OR "guinea pig"[TIAB] OR cavia[TIAB] OR callithrix[TIAB] OR marmoset[TIAB] OR marmosets[TIAB] OR cebuella[TIAB] OR hapale[TIAB] OR octodon[TIAB] OR chinchilla[TIAB] OR chinchillas[TIAB] OR gerbillinae[TIAB] OR gerbil[TIAB] OR gerbils[TIAB] OR jird[TIAB] OR jirds[TIAB] OR merione[TIAB] OR meriones[TIAB] OR rabbits[TIAB] OR rabbit[TIAB] OR hares[TIAB] OR hare[TIAB] OR diptera[TIAB] OR flies[TIAB] OR fly[TIAB] OR dipteral[TIAB] OR drosophila[TIAB] OR drosophilidae[TIAB] OR cats[TIAB] OR cat[TIAB] OR carus[TIAB] OR felis[TIAB] OR nematoda[TIAB] OR nematode[TIAB] OR nematodes[TIAB] OR sipunculida[TIAB] OR dogs[TIAB] OR dog[TIAB] OR canine[TIAB] OR canines[TIAB] OR canis[TIAB] OR sheep[TIAB] OR sheeps[TIAB] OR mouflon[TIAB] OR mouflons[TIAB] OR ovis[TIAB] OR goats[TIAB] OR goat[TIAB] OR capra[TIAB] OR capras[TIAB] OR rupicapra[TIAB] OR chamois[TIAB] OR haplorhini[TIAB] OR monkey[TIAB] OR monkeys[TIAB] OR anthropoidea[TIAB] OR anthropoids[TIAB] OR saguinus[TIAB] OR tamarin[TIAB] OR tamarins[TIAB] OR leontopithecus[TIAB] OR hominidae[TIAB] OR ape[TIAB] OR apes[TIAB] OR pan[TIAB] OR paniscus[TIAB] OR "pan paniscus"[TIAB] OR bonobo[TIAB] OR bonobos[TIAB] OR troglodytes[TIAB] OR "pan troglodytes"[TIAB] OR gibbon[TIAB] OR gibbons[TIAB] OR siamang[TIAB] OR siamangs[TIAB] OR nomascus[TIAB] OR symphalangus[TIAB] OR chimpanzee[TIAB] OR chimpanzees[TIAB] OR prosimians[TIAB] OR "bush baby"[TIAB] OR prosimian[TIAB] OR bush babies[TIAB] OR galagos[TIAB] OR galago[TIAB] OR pongidae[TIAB] OR gorilla[TIAB] OR gorillas[TIAB] OR pongo[TIAB] OR pygmaeus[TIAB] OR "pongo pygmaeus"[TIAB] OR orangutans[TIAB] OR pygmaeus[TIAB] OR lemur[TIAB] OR lemurs[TIAB] OR lemuriidae[TIAB] OR horse[TIAB] OR horses[TIAB] OR pongo[TIAB] OR equus[TIAB] OR cow[TIAB] OR calf[TIAB] OR bull[TIAB] OR chicken[TIAB] OR chickens[TIAB] OR gallus[TIAB] OR quail[TIAB] OR bird[TIAB] OR birds[TIAB] OR quails[TIAB] OR poultry[TIAB] OR poultries[TIAB] OR fowl[TIAB] OR fowls[TIAB] OR reptile[TIAB] OR reptilia[TIAB] OR reptiles[TIAB] OR snakes[TIAB] OR snake[TIAB] OR lizard[TIAB] OR lizards[TIAB] OR alligator[TIAB] OR alligators[TIAB] OR crocodile[TIAB] OR crocodiles[TIAB] OR turtle[TIAB] OR turtles[TIAB] OR amphibian[TIAB] OR amphibians[TIAB] OR amphibia[TIAB] OR frog[TIAB] OR frogs[TIAB] OR bombina[TIAB] OR salientia[TIAB] OR toad[TIAB] OR toads[TIAB] OR "epidalea calamita"[TIAB] OR salamander[TIAB] OR salamanders[TIAB] OR eel[TIAB] OR eels[TIAB] OR fish[TIAB] OR fishes[TIAB] OR pisces[TIAB] OR catfish[TIAB] OR catfishes[TIAB] OR siluriformes[TIAB] OR arius[TIAB] OR heteropneustes[TIAB] OR sheatfish[TIAB] OR perch[TIAB] OR perches[TIAB] OR percidae[TIAB] OR perca[TIAB] OR trout[TIAB] OR trouts[TIAB] OR char[TIAB] OR chars[TIAB] OR salvelinus[TIAB] OR "fathead minnow"[TIAB] OR minnow[TIAB] OR cyprinidae[TIAB] OR carps[TIAB] OR carp[TIAB] OR zebrafish[TIAB] OR

	zebrafishes[TIAB] OR goldfish[TIAB] OR goldfishes[TIAB] OR guppy[TIAB] OR guppies[TIAB] OR chub[TIAB] OR chubs[TIAB] OR tinca[TIAB] OR barbels[TIAB] OR barbus[TIAB] OR pimephales[TIAB] OR promelas[TIAB] OR "poecilia reticulata"[TIAB] OR mullet[TIAB] OR mullets[TIAB] OR seahorse[TIAB] OR seahorses[TIAB] OR mugil curema[TIAB] OR atlantic cod[TIAB] OR shark[TIAB] OR sharks[TIAB] OR catshark[TIAB] OR anguilla[TIAB] OR salmonid[TIAB] OR salmonids[TIAB] OR whitefish[TIAB] OR whitefishes[TIAB] OR salmon[TIAB] OR salmons[TIAB] OR sole[TIAB] OR solea[TIAB] OR "sea lamprey"[TIAB] OR lamprey[TIAB] OR lampreys[TIAB] OR pumpkinseed[TIAB] OR sunfish[TIAB] OR sunfishes[TIAB] OR tilapia[TIAB] OR tilapias[TIAB] OR turbot[TIAB] OR turbots[TIAB] OR flatfish[TIAB] OR flatfishes[TIAB] OR sciuridae[TIAB] OR squirrel[TIAB] OR squirrels[TIAB] OR chipmunk[TIAB] OR chipmunks[TIAB] OR suslik[TIAB] OR susliks[TIAB] OR vole[TIAB] OR voles[TIAB] OR lemming[TIAB] OR lemmings[TIAB] OR muskrat[TIAB] OR muskrats[TIAB] OR lemmus[TIAB] OR otter[TIAB] OR otters[TIAB] OR marten[TIAB] OR martens[TIAB] OR martes[TIAB] OR weasel[TIAB] OR badger[TIAB] OR badgers[TIAB] OR ermine[TIAB] OR mink[TIAB] OR minks[TIAB] OR sable[TIAB] OR sables[TIAB] OR gulo[TIAB] OR gulos[TIAB] OR wolverine[TIAB] OR wolverines[TIAB] OR minks[TIAB] OR mustela[TIAB] OR llama[TIAB] OR llamas[TIAB] OR alpaca[TIAB] OR alpacas[TIAB] OR camelid[TIAB] OR camelids[TIAB] OR guanaco[TIAB] OR guanacos[TIAB] OR chiroptera[TIAB] OR chiropteras[TIAB] OR bat[TIAB] OR bats[TIAB] OR fox[TIAB] OR foxes[TIAB] OR iguana[TIAB] OR iguanas[TIAB] OR xenopus laevis[TIAB] OR parakeet[TIAB] OR parakeets[TIAB] OR parrot[TIAB] OR parrots[TIAB] OR donkey[TIAB] OR donkeys[TIAB] OR mule[TIAB] OR mules[TIAB] OR zebra[TIAB] OR zebras[TIAB] OR shrew[TIAB] OR shrews[TIAB] OR bison[TIAB] OR bisons[TIAB] OR buffalo[TIAB] OR buffaloes[TIAB] OR deer[TIAB] OR deers[TIAB] OR bear[TIAB] OR bears[TIAB] OR panda[TIAB] OR pandas[TIAB] OR "wild hog"[TIAB] OR "wild boar"[TIAB] OR fitchew[TIAB] OR fitch[TIAB] OR beaver[TIAB] OR beavers[TIAB] OR jerboa[TIAB] OR jerboas[TIAB] OR capybara[TIAB] OR capybaras[TIAB]) NOT medline[subset]			
P u b M e d	#4 (filtro PUBMED) ("Wound Healing"[MeSH terms] OR "Regeneration"[MeSH terms])	175948	12:43:13	28/10/2015
P u b	Skin #5 #5 Filtre ("Skin"[MeSH terms] OR "Dermis"[MeSH terms] OR "Granulation Tissue"[MeSH terms] OR "Epidermis"[MeSH	1014186	12:43:33	28/10/2015

M e d	terms] OR “Keratinocytes”[MeSH terms] OR “Integumentary System”[MeSH terms] OR “Dermatology”[MeSH terms] OR “Dermoscopy”[MeSH terms] OR “Wounds and Injuries”[MeSH terms] OR “Fibrosis”[MeSH terms] OR “Skin injuries”[TIAB] OR “Skin fibrosis”[TIAB] OR “Skin scars”[TIAB] OR “Skin cicatriz”[TIAB] OR “Cicatrix”[MeSH terms])			
P u b M e d	#6 (Filtro PUBMED) (“Alcohol”[MeSH terms] OR (“Alcohol”[TIAB])	196557	12:43:56	28/10/2015
P u M e d	#7 (Filtro PUBMED) (“High-Fat Diet”[MeSH terms] OR “High Fat Diet”[MeSH terms] OR “High Fat Diet”[TIAB])	14335	12:44:20	28/10/2015
	Total: #1 and #2 and #4 and #5 Total: #1 and #2 and #4 and #6	166 6	12:49:11 12:47:42	28/10/2015
S c o p u s	#2 (filtro SCOPUS) (TITLE-ABS-KEY(“Wound Healing”) OR TITLE-ABS-KEY(Regeneration) OR TITLE-ABS-KEY(repair))	694187	14:18:34	28/10/2015
S c o p u s	#3 (filtro SCOPUS) (TITLE-ABS-KEY(Skin) OR TITLE-ABS-KEY(Dermis) OR TITLE-ABS-KEY(“Granulation Tissue”) OR TITLE-ABS-KEY(Epidermis) OR TITLE-ABS-KEY(Keratinocyte*) OR TITLE-ABS-KEY(Integumentary System) OR TITLE-ABS-KEY(Dermatology) OR TITLE-ABS-KEY(Dermoscopy) OR TITLE-ABS-KEY(Skin wounds) OR TITLE-ABS-KEY(Skin injuries) OR TITLE-ABS-KEY(Skin fibrosis) OR TITLE-ABS-KEY(Skin scar*) OR (Skin cicatrix))	1067779	14:27:33	28/10/2015

S c o p u s	#4 (Filtro SCOPUS) (TITLE-ABS-KEY("Alcohol"))	620695	14:35:36	28/10/2015
S c o p u s	#5 (Filtro PUBMED) (TITLE-ABS-KEY("High-Fat Diet") OR TITLE-ABS-KEY("High Fat Diet))	17763	14:42:25	
	Total: #2 and #3 and #4	280		28/10/2015
	Total: #2 and #3 and #5	11	14:58:23	