

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular

Isabela Beatriz Cabacinha Nóbrega

**PARTICIPAÇÃO DOS LINFÓCITOS NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INJEÇÃO PARENTERAL DE
PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS.**

Belo Horizonte

2024

Isabela Beatriz Cabacinha Nóbrega

**PARTICIPAÇÃO DOS LINFÓCITOS NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INJEÇÃO PARENTERAL DE
PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS.**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr^a Cláudia Rocha Carvalho

Belo Horizonte

2024

043

Nóbrega, Isabela Beatriz Cabacinha.

Participação dos linfócitos no processo de reparo de feridas cutâneas de camundongos submetidos a injeção parenteral de proteínas imunologicamente toleradas [manuscrito] / Isabela Beatriz Cabacinha Nóbrega. – 2024.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Dr^a Cláudia Rocha Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Pele. 3. Zeína. 4. Inflamação. 5. Linfócitos. I. Carvalho, Cláudia Rocha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DE DEFESA DE TESE DA DISCENTE

ISABELA BEATRIZ CABAINHA NÓBREGA

Às **08:30 horas** do dia **30 de janeiro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"PARTICIPAÇÃO DOS LINFÓCITOS NO PROCESSO DE REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INJEÇÃO PARENTERAL DE PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS"**, requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cláudia Rocha Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	Aprovada
Dr. Archimedes Barbosa de Castro Junior	UFRJ	Aprovada
Dra. Raquel Alves Costa	UFSJ	Aprovada
Dr. Ricardo Gonçalves	UFMG	Aprovada
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2024.

Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho (Orientadora) _____

Dr. Archimedes Barbosa de Castro Junior _____

Dra. Raquel Alves Costa _____

Dr. Ricardo Gonçalves _____

Dr^a. Vanessa Pinho da Silva _____



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Rocha Carvalho, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Archimedes Barbosa de Castro Junior, Usuário Externo**, em 01/02/2024, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Alves Costa, Usuário Externo**, em 01/02/2024, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Goncalves, Diretor(a)**, em 16/02/2024, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3001460** e o código CRC **C8E41C83**.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração da Universidade Federal de Minas Gerais com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por abençoar meu caminho e cada escolha que faço em minha vida. Sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais Marcelo e Virgínia, por serem meus maiores exemplos de persistência, honestidade e humildade. Por estarem ao meu lado em cada passo e por me apoiarem incondicionalmente todos os dias da minha vida. Vocês são a minha força e minhas maiores inspirações.

À minha irmã Natália, minha grande companheira de vida e maior incentivadora. Através de você conheci o que é fazer pesquisa científica, você me inspirou, me apoiou e esteve comigo em todos os momentos. Seguiremos juntas, escrevendo não só artigos científicos, mas também a nossa história de vitória.

À minha irmã Ana Beatriz, minha pequena, por sempre me lembrar o quanto o tempo voa. Com você aprendi a ter mais responsabilidade, a cuidar, a ser exemplo e inspiração. Obrigada por estar ao meu lado, sempre com muita alegria e amor!

À minha afilhada Beatriz, meu anjinho aqui na Terra. Você tem me ensinado a cada dia a ser uma pessoa melhor. Desde a sua chegada em meio a pandemia, dividi com sua mãe momentos de angústia, felicidade e muito amor. Obrigada por vir dar mais sentido as nossas vidas.

Ao meu esposo Raphael, meu amor e parceiro de vida. Você esteve ao meu lado desde sempre e acompanhou cada etapa dessa conquista. Com você aprendo todos os dias a ter persistência, paciência, foco e determinação. Que a gente siga trilhando nosso caminho sempre com muito amor, respeito e dedicação.

À todos os meus familiares que me apoiaram e incentivaram durante todos esses anos, vocês são muito importantes e essa conquista também é um pouco de vocês. Meus avós Marcelo e Dayse, tios, tias, primos, sogros e cunhados.

Agradeço imensamente a minha orientadora Dr^a Cláudia Rocha Carvalho, pela confiança que sempre depositou em mim e por me receber de braços abertos no laboratório desde a iniciação científica até os dias de hoje. Com você aprendi muito mais do que uma orientadora poderia ensinar, você me inspira como mulher, professora e pesquisadora. Levarei sempre comigo seus ensinamentos, conselhos e lembrarei com muitas saudades dos momentos de alegrias e risadas que vivemos nesses 9 anos de convivência.

Ao professor Dr. Nelson Monteiro Vaz, por ser um pesquisador a quem sempre terei como referência e que tive o privilégio de conviver, ouvir e aprender. Obrigada por mostrar que ciência vai muito além do que imaginamos, ciência é arte, é poesia, é filosofia.

Ao Dr. Geraldo Magela de Azevedo Júnior, por alegrar nossas análises histológicas com suas histórias e a sua risada nada discreta. O seu apoio, a sua disposição e prontidão em ajudar abrilhantou este trabalho e sem dúvidas contribuiu imensamente para a minha formação.

Ao Dr. Thiago Cantaruti Anselmo, meu amigo e colega de laboratório. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui, com você aprendi muito mais do que fazer os protocolos do laboratório, planejar experimentos, cuidar dos animais. Você me ensinou a confiar em mim mesma, a ser uma boa pesquisadora e a acreditar que eu chegaria lá. E aqui estou...muito obrigada!

À Dr^a Karen Franco Valência, minha amiga internacional. Agradeço por ter sido minha parceira durante um período muito importante da minha formação. Sua amizade fez com que o processo fosse mais leve, engraçado e prazeroso.

Aos demais colegas laboratório Daniel, Evelin, Keylla, Sávio, Gustavo, Thomson e Gabriela, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntos.

À Dr^a. Kênia Soares de Souza, pelo privilégio de poder presenciar sua paixão pela ciência mesmo com todas as adversidades. Onde quer que você esteja, muito obrigada!

À Angélica Vitória Souza Andrade, pela sua amizade e companhia de todos os dias. Sua competência e dedicação são inquestionáveis, você chegou para renovar e trazer mais alegria aos meus dias.

Aos professores e colegas da UFSJ, Dr^a Raquel Alves Costa, Dr^a Erika Costa de Alvarenga e Ms^a Raisa Mileb, pela incrível parceria e contribuições para o nosso grupo de pesquisa.

À professora Dr^a Ana Maria Caetano de Faria, pelas discussões enriquecedoras em que pude estar presente e pela disponibilidade em contribuir com o nosso trabalho. Seu apoio foi de grande importância para que este trabalho fosse concluído. Agradeço também aos seus alunos, Ms^a. Sara Cândida, Dr^o. Vinícius Dantas, Ms^a. Mariana de Almeida, Ms^a. Cecília Horta e Ms^a. Monique Macedo, por todo apoio e colaboração com os animais RAG KO e experimentos.

Ao professor Dr^o. José Menguele, pela experiência, oportunidade e disponibilidade em me receber em Petrópolis/RJ, para realização de experimentos. Foram momentos de muito aprendizado.

Aos colegas e colaboradores da pós, agradeço pelas trocas de experiência, pelos conselhos e por todos os momentos de alegria que vivemos.

As minhas queridas amigas do LFV, Little, Dani e Naiara. Vocês fizeram com que a minha passagem pela pós-graduação fosse mais leve e prazerosa. Sempre vou me lembrar com muito carinho dos nossos almoços regados de muita fofoca, risadas, conselhos e as vezes até choros. Carrego vocês com muito carinho no meu coração.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, pela excelência e paixão com o qual vocês desempenham seus trabalhos, vocês contribuíram de forma significativa para a minha formação.

Resumo

A integridade da pele é muito importante para a saúde mas lesões, sejam acidentais ou de cirurgia programada, ocorrem com frequência. O reparo destas lesões conta com a participação de diversos tipos celulares que interagem de forma ainda não bem entendida. O não fechamento das lesões no tempo esperado ou a ocorrência de cicatrizes patológicas são problemas importantes para a saúde pública, cuja solução demanda formas mais eficazes de intervenção no reparo e um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos. Sabe-se que a fase inflamatória do reparo é importante para o fechamento da lesão mas a inflamação exacerbada e prolongada está relacionada à formação de cicatrizes hipertróficas e à feridas crônicas. A tolerância oral é um fenômeno que promove modificações sistêmicas da atividade imunológica após contatos antigênicos através da mucosa oral e inibe respostas imunes quando os antígenos são posteriormente injetados. A tolerância oral é dependente de linfócitos e pode ser adotivamente transferida para animais singênicos através de linfócitos obtidos do baço ou linfonodos. Em trabalhos anteriores mostramos que uma injeção parenteral de proteínas previamente ingeridas, concomitante com lesões na pele, reduz o infiltrado inflamatório e melhora a cicatrização. A zeína é uma proteína do milho presente na ração de camundongos e uma injeção de zeína mais adjuvante até 5 dias antes de feridas na pele reduz o infiltrado inflamatório, aumenta o número de linfócitos T no leito da ferida e melhora a cicatrização. Dados da literatura mostram que linfócitos participam do reparo de lesões cutâneas. Como há diferentes tipos de linfócitos, tanto residentes na pele ou que migram para o leito da ferida durante o reparo, são necessários mais estudos para verificar como estas células atuam no reparo de lesões. Nosso objetivo foi verificar se os efeitos positivos da injeção de zeína dependem da migração de linfócitos para a área da lesão (protocolo CEUA/UFMG 253/2021). Utilizamos camundongos que se alimentam de ração contendo milho e são deficientes em linfócitos (RAG KO) ou receberam injeção de um fármaco (FTY720) que inibe a migração de linfócitos periféricos para locais inflamados. Nossos resultados mostram que a ausência de linfócitos promoveu um ambiente mais inflamatório, com alteração na migração das células inflamatórias e atraso no fechamento das feridas aos 7 dias após a lesão. Aos 40 dias após a lesão observamos que a injeção de FTY720 modificou a formação da neoderme com deposição de colágeno sem formação de feixes de fibras. A injeção de zeína não reduziu a

inflamação e não melhorou a cicatrização nos animais RAG KO nem nos animais que receberam FTY720. A transferência adotiva de células do baço de animais WT para RAG KO imunizados com a proteína tolerada, promoveu efeito positivo da injeção s.c da zeína no reparo de lesões cutâneas. Esses resultados indicam que os linfócitos são células importantes para o processo de reparo de feridas e também para os efeitos imunomoduladores da tolerância oral.

Palavras Chave: Tolerância Oral, Efeitos Indiretos, Pele, Zeína, Inflamação, Linfócitos, FTY720.

Abstract

Skin integrity is very important for health but injuries, whether accidental or from scheduled surgery, occur frequently. The repair of these injuries involves several cell types that interact in ways that is still not well understood. The failure to close the wounds within the expected time or the occurrence of pathological scars are important problems for public health, whose solution requires more effective forms of intervention and a better understanding of the mechanisms involved. The inflammatory phase of repair is important for wound closure, but exacerbated and prolonged inflammation is related with hypertrophic scars and chronic wounds. Oral tolerance is a phenomenon that promotes systemic modifications of immunological activity after antigenic contact through the oral mucosa and inhibits immune responses when antigens are subsequently injected. Oral tolerance is lymphocyte dependent and can be adoptively transferred to syngeneic animals via lymphocytes obtained from the spleen or lymph nodes. In previous studies, we have shown that a parenteral injection of previously ingested proteins, concomitantly with skin lesions, reduces the inflammatory infiltrate and improves healing. Zein is a corn protein present in mouse feed and an injection of zein plus adjuvant up to 5 days before skin wounds reduces the inflammatory infiltrate, increases the number of T lymphocytes in the wound bed, and improves healing. Data from the literature show that lymphocytes participate in the repair of skin injuries. As there are different types of lymphocytes, either resident in the skin or that migrate to the wound bed during repair, more studies are needed to verify how these cells act in wound repair. Our objective was to verify whether zein injection's positive effects depend on lymphocyte migration to the lesion area (CEUA/UFMG protocol 253/2021). We used mice that feed on food containing corn and are deficient in lymphocytes (RAG KO). or received an injection of a drug (FTY720) that inhibits the migration of peripheral lymphocytes to inflamed sites. Our results show that the absence of lymphocytes promoted a more inflammatory environment, with changes in the migration of inflammatory cells and a delay in wound closure at 7 days after injury. At 40 days after the injury, we observed that the injection of FTY720 modified the formation of the neodermis with collagen deposition without forming fiber bundles. Zein injection did not reduce inflammation and improve healing in RAG KO animals or animals receiving FTY720. The adoptive transfer of spleen cells from WT to RAG KO animals immunized with the tolerated protein promoted a positive effect of s.c injection of zein in the repair

of skin lesions. These results indicate that lymphocytes are important cells for the wound repair process and also for the immunomodulatory effects of oral tolerance.

Keywords: Oral Tolerance, Indirect Effects, Skin, Zein, Inflammation, Lymphocytes, FTY720.

Lista de Abreviações

APC – Aloficocianina

BSA - Albumina de soro bovino

C° - Celsius

C – Crosta

CAPi – Centro de Aquisição e Processamento de Imagem

CD- Células Dendríticas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

d – dia (s)

DAMPs - Danos Moleculares Associados a Patógenos

DAPI – diamidino-2- fenilindole

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

ENFs – Fibroblastos Negativos para Engrailed-1

EPFs – Fibroblastos Positivos para Engrailed -1

EUA – Estados Unidos da América

e – epiderme

FACS- Fluorescence Assisted Cell Sorter

FDA- Food and Drug Administration

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

FTY720 - Fingolimod

Fig. – Figura

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Intestino

GI – Gastrointestinal

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

H&E - Hematoxilina e Eosina

HETAB / HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

i.p. – Via intraperitoneal

IFN – Interferon

IGF – Fator de Crescimento Insulina

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

Kg- quilogramas

KGF- Fator de Crescimento de Queratinócitos

LP- Lâmina Própria

LIB- Laboratório de Imunobiologia

M1 – Macrófago classicamente ativado

M2 – Macrófago alternativamente ativado

MEC – Matriz extracelular

MMP – metaloproteinase

MPO - Indicador indireto do influxo de células polimorfonucleares

mg- Miligramas

ml – Mililitros

mm- Milímetros

mm² – Milímetros Quadrados

min – Minutos

M- Molar

MHC-II – Molécula de Histocompatibilidade de classe II

n – Número de animais

OVA – Ovalbumina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

PDG- Prostaglandinas

pH - potencial hidrogeniônico

pc – Panículo Carnoso

RAG KO – RAG Knockout, KO

RAG KO- R – RAG Knockout, KO - Reconstituído

RPMI – Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)

rpm – Rotações por Minuto

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

s.c – Via subcutânea

SEM- Erro padrão da Média

S1P – Esfingosina- 1 Fosfato

S1P-R – Receptor de Esfingosina -1 Fosfato

T $\gamma\delta$ – Linfócito T gamma delta

T_{RM} - Linfócito T Residente de Memória

Treg – Linfócito T Regulador

TGF- β - Fator de crescimento Transformante beta

TNF - Fator de necrose tumoral

TRIS – trisaminometano

tg – Tecido de Granulação

ta – Tecido Adiposo

tam – Tecido Adiposo marrom

TO – Tolerância Oral

TCR – Receptor de Células T

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

ug- Microgramas

ul- Microlitros

μm - Micrômetros

μm^2 – Micrômetro Quadrados

WT – Wild Type

α -SMA – Actina Alfa de Músculo Liso

% - Porcento

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema do protocolo experimental de ferida excisional no dorso de camundongos.....**49**
- Figura 2:** Protocolo experimental para avaliar o reparo de lesões no dorso em animais sem linfócitos (RAG KO) que foram imunizados com a proteína tolerada zeína.....**50**
- Figura 3.** Protocolo experimental para verificar a ação da aplicação do FTY720 no processo de reparo de lesão cutâneas.....**51**
- Figura 4.** Protocolo experimental para verificar se a injeção do FTY720 impede os efeitos positivos da injeção da proteína tolerada zeína no reparo de lesões cutâneas.....**52**
- Figura 5.** Protocolo experimental para verificar se a transferência de células do baço de animais WT para animais RAG KO modifica o reparo de lesões na pele.....**53**
- Figura 6.** Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas 7 dias após a sua realização.....**55**
- Figura 7.** Coleta da pele contendo a cicatriz, 40 dias após a realização das lesões.....**55**
- Figura 8.** Retículo utilizado para análises morfométricas. O retículo apresenta uma área de 100 μm^2 e é acoplado à ocular do microscópio.....**57**
- Figura 9.** Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo excisional.....**57**
- Figura 10.** Injeção s.c de zeína em animais RAG KO não promove maior fechamento das lesões na pele.....**61**

Figura 11. A administração subcutânea de zeína não alterou a quantidade de células no leito da ferida de animais RAG KO.....	63
Figura 12. A administração subcutânea de zeína não alterou a quantidade de células no leito da ferida de animais RAG KO.....	64
Figura 13. A injeção de zeína em animais RAG KO não reduz o número de leucócitos na área da lesão.....	65
Figura 14. Injeção de zeína em animais RAG KO não altera o número de leucócitos no leito da ferida.....	66
Figura 15. Análise de miofibroblastos no leito da ferida de animais RAG KO.....	67
Figura 16. A administração de FTY720 promove redução drástica dos linfócitos circulantes e prejudica o fechamento de lesões na pele.....	70
Figura 17. A administração de FTY720 não alterou a quantidade de células no infiltrado inflamatório.....	72
Figura 18. Administração de FTY720 impediu os efeitos positivos da aplicação de zeína durante o fechamento de lesões no dorso.....	73
Figura 19. A administração de FTY720 promove atraso no reparo de lesões e impede os efeitos positivos da imunização com zeína na cicatrização da pele.....	75
Figura 20. A administração de FTY720 modifica o perfil das células imunes no leito da ferida no dia 7 após a lesão.....	77
Figura 21. A administração de FTY720 modifica o perfil das células imunes no leito da ferida no dia 7 após a lesão.....	78
Figura 22. A injeção de zeína reduz o número de miofibroblastos em animais controle mas não em animais que receberam FTY720.....	79

Figura 23. A injeção de zeína reduz o número de miofibroblastos em animais controle mas não em animais que receberam FTY720.....	80
Figura 24. Injeção de zeína reduz a cicatriz do animal controle, mas não do animal tratado com FTY720.....	81
Figura 25. Injeção de zeína melhora o remodelamento de colágeno da pele de animais controle, mas não de animais tratados com FTY720.....	83
Figura 26. A transferência de linfócitos promoveu reconstituição dessas células no baço de animais RAG KO.....	84
Figura 27. A injeção de zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz a área das lesões.....	86
Figura 28. A imunização com a proteína tolerada zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz a área do tecido de granulação, o número de fibroblastos e mastócitos.....	88
Figura 29. A imunização com a proteína tolerada zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz o número de fibroblastos e mastócitos no leito da ferida.....	89

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Especificação dos anticorpos utilizados para a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	59
--	-----------

Sumário

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 A Pele	28
1.2 Células imunológicas na Pele	28
1.3 Reparo de Feridas na Pele	31
1.4 Linfócitos T no Reparo de Feridas na Pele	32
1.5 Uso de Imunossuppressores no Reparo de Feridas na Pele	35
1.6 Dados Epidemiológico sobre Feridas na Pele	36
1.7 Tolerância Oral	38
1.8 Mecanismos da Tolerância Oral	40
1.9 Efeitos Indiretos da Tolerância Oral	41
1.10 Utilização da zeína nos Efeitos Indiretos Tolerância Oral	43
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Animais	47
4.2 Dieta dos Camundongos para indução de tolerância oral a zeína	47
4.3 Administração intraperitoneal do Fármaco Fingolimode – FTY720	48
4.4 Imunização Subcutânea com Zeína em Adjuvante	48
4.5 Lesões no Dorso	48
4.6 Transferência de Células	49
4.7 Organização e Denominação dos Grupos Experimentais	50
4.8 Coleta de Sangue	53
4.8.1 Análise Hematológica	53
4.8.2 Citometria de Fluxo	54
4.9 Coleta e fixação da pele com as lesões	54
4.10 Análises macroscópicas e medida da áreas das lesões	55

4.11 Histologia e morfometria	56
4.12 Técnica de Imunofluorescência Indireta.....	58
4.13 Análises estatísticas.....	59
5 RESULTADOS.....	60
Parte I – Avaliação da cicatrização de feridas de pele em animais sem linfócitos.....	60
5.1 Administração subcutânea de Zeína em animais RAGKO não promove maior fechamento da lesão.....	60
5.2 Administração subcutânea de Zeína em animais RAG KO não altera o infiltrado inflamatório.....	61
5.3 Injeção subcutânea de zeína em animais RAG KO não altera a intensidade de fluorescência para marcador específico de leucócitos.....	65
5.4 Análise por imunofluorescência da presença de miofibroblastos no leito da ferida em animais RAG KO.....	67
Parte II – Avaliação do efeito do tratamento com FTY720 na cicatrização de pele	68
5.5 Administração intraperitoneal de FTY720 reduz drasticamente a quantidade de linfócitos circulantes de animais C57BL/6 e prejudica o fechamento das feridas na pele.....	69
5.6 Administração intraperitoneal de FTY720 impede o efeito positivo da zeína na cicatrização de feridas na pele.....	72
5.7 Análise por imunofluorescência mostra que administração de FTY720 modifica o perfil de células imunes no leito da ferida.....	76
5.8 Análise por imunofluorescência demonstra que a administração de FTY720 aumenta o número de miofibroblastos no leito da ferida e altera a sua forma.....	79
5.9 A administração intraperitoneal de FTY720 modifica a deposição de colágeno 40 dias após lesões no dorso.....	81

Parte III – Avaliação do efeito da reconstituição de linfócitos nos animais RAG no reparo de lesões	83
5.10 A injeção de zeína em animais RAG KO reconstituídos de linfócitos reduz a área da ferida.	83
5.11 A imunização com zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz o número de fibroblastos e mastócitos no leito da ferida.	87
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Pele

A pele é frequentemente vista como uma barreira física, que tem como principal função proteger o corpo do mundo exterior. De fato, a pele possui essa importante função de proteger o indivíduo contra agentes externos, agentes estes que podem ser biológicos, químicos e mecânicos. Para conseguir desempenhar tal função a pele possui uma estrutura muito dinâmica, constituída por diferentes tipos de células e macromoléculas, espacialmente distribuídas em três camadas que em conjunto protegem os tecidos internos. A pele também desempenha importantes funções homeostáticas através do controle da perda de água e da termorregulação (CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2020).

A função de barreira física se deve principalmente pelas células que constituem a camada mais externa da pele, ou seja, a camada que esta em contato direto com o meio externo. Essa camada, chamada de epiderme, é composta em sua maioria pelos queratinócitos, células que se organizam de forma justaposta. Essa organização se deve principalmente pela presença das junções intercelulares e das moléculas de adesão. Muitos trabalhos na literatura demonstram que perturbações na expressão ou na função dos componentes que promovem a adesão dos queratinócitos, resultam na formação inadequada da barreira física da pele podendo assim acarretar no desenvolvimento de patologias como dermatite atópica e psoríase (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

Classificada como um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, a epiderme possui em sua camada mais basal células produtoras de queratina que irão conferir fortalecimento e impermeabilidade a pele. As células de Langerhans são fenotipicamente caracterizadas pela alta expressão de MHCII e estão ancoradas na epiderme através de interações entre moléculas de adesão. Essas células são responsáveis por coletar amostras de antígenos através da projeção de suas membranas pelos extratos da epiderme para promover respostas iniciais imunes adaptativas. Na epiderme também são encontradas células envolvidas na mecanossensação, como as células de Merkel, capazes de captar sensações de toque

leve. Também podem ser encontrados na camada mais basal os melanócitos, células especializadas na produção de melanina, um pigmento capaz de proteger as células contra os raios solares. As células que constituem a camada basal da epiderme possuem grande potencial proliferativo, com isso elas se desprendem periodicamente e migram para a camada superior onde se diferenciam. A diferenciação dessas células caracteriza a formação dos estratos da epiderme, como por exemplo o estrato espinhoso, localizado acima da camada basal, é composto por queratinócitos que se unem por desmossomos e filamentos semelhantes a espinhos. Logo acima encontra-se o estrato granuloso, composto por uma fina camada de células achatadas cheias de grânulos que impermeabilizam as células como prevenção a perda de água. Já o estrato córneo é composto por células mortas, anucleadas e achatadas que foram queratinizadas para conferir maior proteção a pele. Todo esse processo de diferenciação das células que constituem a epiderme, da camada basal até o estrato córneo dura em média de 26 a 28 dias, este curto prazo de tempo reforça a ideia de que a pele esta sempre em constante renovação. (NGUYEN; SOULIKA, 2019) e (Disponível em: <http://www.eerp.usp.br/ebooks/camadasdapele.pdf>; acesso: 18 de dezembro de 2023).

Vale ressaltar que a epiderme é uma camada avascularizada, e para que ocorra a chegada de nutrientes para suas células ela conta com a ajuda da camada subjacente conhecida como derme. A camada dérmica da pele tem aproximadamente 2 mm de espessura, podendo chegar a 4 mm na região das costas de indivíduos adultos. Ela é regionalmente dividida em derme papilar, região que interage intimamente com as junções dermoepidérmicas, formando projeções que proporcionam maior área de superfície para fixação entre as camadas, além de serem importantes para resistir a forças de tração que naturalmente ocorrem na pele. É constituída de fibras colágenas de pequeno diâmetro intercaladas com fibras reticulares. A outra região que faz parte da derme é a chamada derme reticular, composta em sua maioria parte por fibras colágenas de grande diâmetro organizadas em grandes feixes de fibras entrelaçadas com fibras elásticas formando assim uma superestrutura. (NGUYEN; SOULIKA, 2019; WONG et al., 2016)

Os fibroblastos são as principais células estruturais especializadas na deposição e remodelação da matriz extracelular. Estas células são essenciais para

manutenção da integridade do tecido e estão fortemente presentes na derme. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se um tecido adiposo subcutâneo, também chamado de hipoderme. A hipoderme é composta por células adiposas que agem como isolante térmico e reserva calórica. Tem um papel importante na homeostase pois é rica em receptores acoplados a proteína G, que regulam a lipólise, a secreção de adiponectina e leptinas. Trabalhos recentes também identificaram o importante papel dos adipócitos da hipoderme na imunidade da barreira como uma fonte significativa de peptídeos antimicrobianos. (CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2020; NGUYEN; SOULIKA, 2019)

1.2 Células imunológicas na Pele

A pele é um órgão imunologicamente ativo, onde podemos encontrar nas duas camadas que compõem a sua estrutura, células imunes efetoras inatas e adaptativas. Essas células formam a primeira linha de defesa contra infecções mas também são importantes para a manutenção da homeostase tecidual. (HAJAM et al., 2022a)

Na epiderme as células de Langerhans são um subconjunto de células apresentadoras de antígenos que residem entre os queratinócitos. Essas células coletam antígenos através da projeção dos seus dendritos e apresentam para células T epidérmicas, ou células T gama delta ($T\gamma\delta$) (WEST; BENNETT, 2018). As células $T\gamma\delta$ possuem a capacidade de iniciarem uma resposta imune local mas também podem migrar para o linfonodo e iniciar respostas imunológicas nos órgãos linfoides (SHIMURA et al., 2010). Além disso, as células $T\gamma\delta$ desempenham papel importante na manutenção da homeostase dos queratinócitos, pois sua ausência promove o aumento a apoptose dessas células (NIELSEN; WITHERDEN; HAVRAN, 2017).

Na derme também podemos encontrar outros tipos de células do sistema imune que são residentes, como por exemplo os macrófagos. A principal fonte de macrófagos dérmicos é proveniente de monócitos circulantes que amadurecem quando atingem a pele. São consideradas um tipo de células apresentadoras de antígenos e atuam na detecção de patógenos e danos para iniciar uma resposta imune apropriada. Estão localizadas mais profundamente na derme e podem auxiliar

na manutenção da homeostase através do aumento de mecanismos anti-inflamatórios. Entretanto, são células que possuem plasticidade podendo ter funções efetoras durante a inflamação, como também podem atuar na resolução dessa inflamação quando são alternativamente ativados (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

Os mastócitos também são células do sistema imune residentes na derme, provenientes de progenitores de medula óssea que migram e amadurecem ao chegar no tecido. Seus grânulos contêm mediadores pré-formados como a histamina, classicamente conhecida pelo seu envolvimento em reações alérgicas. Além da histamina, são produtores em massa de prostaglandinas, como a PGD2 e de grande parte da família de leucotrienos, importante mediador inflamatório lipídico, muito eficaz na atração de neutrófilos para locais de inflamação, morte celular e na própria degranulação do mastócito (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

Não são apenas as células imunes residentes na pele que irão desempenhar funções nesse tecido. As células imunes que trafegam pela derme e epiderme mantêm a vigilância imunológica do tecido e são muito importantes para iniciar respostas inflamatórias robustas em momentos de infecção. As células T migram da periferia para a pele via interação com o antígeno. Após a resolução da inflamação, algumas dessas células podem se tornar células de vida longa residentes, distintas das suas contrapartes circulantes, passando a serem chamadas de células T de memória residentes (T_{RM}). As T_{RM} têm capacidade de montar respostas robustas sem emigrar do tecido, além de manterem sua função de sentinela e recrutarem outras células T da periferia para os locais de infecção (NGUYEN; SOULIKA, 2019; SEIDEL et al., 2018).

Um subtipo de linfócito T importante para homeostase imunológica tecidual, são os linfócitos T reguladoras (Treg). Estas células migram a partir do timo e dos gânglios linfáticos guiadas por sinais provenientes das células T residentes do tecido. Em condições homeostáticas essas células migram pela interação microbiano-epitelial e assim promovem a manutenção da tolerância a esses comensais (HAJAM et al., 2022b). Durante o estado homeostático, aglomerados de células apresentadoras de antígenos, células T_{RM} $CD4^+$ e células Treg são encontrados ao redor dos folículos capilares na pele murina e humana (COLLINS et al., 2016).

O processo de cicatrização de feridas pode ser desencadeado em todos os órgãos do corpo, pois trata-se de um processo que ativa respostas gerais similares, havendo algumas variações de acordo com a especificidade de algumas células que compõem cada tecido. Com isso, podemos utilizar dos conhecimentos adquiridos sobre reparo de feridas em outros órgãos para associar com o reparo de feridas na pele e vice-versa. Lindsay e colaboradores, fizeram essa correlação entre reparo cardíaco e reparo de feridas na pele, que apesar de apresentarem diferenças no reparo dos tecidos, a pele e o coração partilham muitas propriedades de cicatrização de feridas que podem auxiliar no desenvolvimento de terapias que preveem a resposta cardíaca, por exemplo. (LINDSEY; BECIROVIC-AGIC, 2023). Outro estudo importante conseguiu demonstrar através de lesões feitas no músculo, que uma população de linfócitos Treg que expressam $ROR\gamma^+$, provenientes do intestino, acumulam-se rapidamente durante as fases iniciais no músculo lesionado e auxiliam de forma direta na dinâmica da inflamação gerada (HANNA et al., 2023).

O papel dos linfócitos B na pele permaneceu por grande parte do tempo desconhecida, apesar da sua imensa contribuição de forma sistêmica para a imunidade e inflamação da pele. Estas células se diferenciam em células secretoras de anticorpos, que distribuídos de forma sistêmica, reforça a defesa contra infecções cutâneas mas também podem apoiar o surgimento de alergias e doenças autoimunes. São encontradas na derme reticular no curso dessas doenças e estão associadas a níveis aumentados de IgM, IgE e IgG (DEBES; MCGETTIGAN, 2019).

Os linfócitos B migram para a pele via interação com antígenos ou através da apresentação destes pelas próprias células T. As células B também são associadas a papéis regulatórios, com capacidade de suprimir respostas imunes com mecanismos variados que incluem a expansão e manutenção de células Treg e secreção de citocinas supressoras. A descoberta de que os linfócitos B são células que fazem parte do sistema imune da pele é recente, portanto ainda são necessários mais estudos para compreender melhor a participação destas células nas respostas imunes da pele (DEBES; MCGETTIGAN, 2019; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

1.3 Reparo de Feridas na Pele

Como a pele é um órgão que está em contato direto com o mundo externo, ela torna-se altamente susceptível a ocorrência de lesões. Estas lesões têm um impacto significativo tanto para o indivíduo quanto para a sociedade. Além disso, o reparo de lesões na pele é considerado um processo complexo pois envolve a interação de vários mediadores químicos e tipos celulares, que estão amplamente distribuídos nas suas camadas, tais como os queratinócitos, os fibroblastos, melanócitos, células endoteliais além das células do sistema imune residentes e migratórias (DYRING-ANDERSEN et al., 2020).

Após uma ferida, a primeira resposta é a constrição dos vasos sanguíneos e a ativação das plaquetas para formar um coágulo de fibrina e assim evitar a perda de fluidos e a entrada de agentes infecciosos. Essa primeira fase da cicatrização de feridas é chamada de hemostasia, que além de promover uma resposta imediata após a ferida também é responsável por dar início a fase subsequente chamada de fase inflamatória. A formação de um coágulo estável marca o início da fase inflamatória, fase que inicialmente promove a ativação de vias independentes de fatores de transcrição tais como, liberação de citocinas inflamatórias pelas células lesionadas, aumento de Ca^{+} intracelular, de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esses fatores liberados na ferida promovem o recrutamento de células imunes circulantes e a ativação das células imunes residentes (RODRIGUES et al., 2019).

Existe uma cinética de migração das células imunes para o local lesionado, no qual os neutrófilos são os chamados “primeiros respondentes” pois nas primeiras 24 horas pós lesão correspondem a 50% de todas as células no local da ferida e sua permanência prolongada está associada a amplificação da inflamação (SU; RICHMOND, 2015). Os monócitos são células recrutadas pela liberação de plaquetas e pela degranulação de mastócitos residentes na pele lesionada. Eles se acumulam nas primeiras 48 horas já como macrófagos com fenótipo pró inflamatório (M1) e microbicidas, expressando $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-1 β . Com a resolução da inflamação, o fenótipo do macrófago inflamatório transita para um tipo de célula anti-inflamatória denominado macrófago alternativamente ativado ou macrófago M2, que durante a

próxima fase do processo de cicatrização de feridas, a chamada fase proliferativa, sinaliza ativamente para fibroblastos dérmicos migrarem para o local da ferida e juntos com outras células imunes formam o chamado tecido de granulação (RODRIGUES et al., 2019).

Os fibroblastos são muito importantes no processo de cicatrização de feridas. Várias metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-1, 2 e 3, desempenham papéis relevantes na migração de fibroblastos para a matriz provisória da ferida. Estas células secretam colágeno, especialmente colágeno de tipos I e III, a partir do terceiro dia após a lesão tecidual e são estimuladas por vários fatores de crescimento, incluindo PDGF, TGF- β , fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e FGF-2 (WERNER; GROSE, 2017). Uma lesão persistente com uma resposta inflamatória associada ou um sinal de reparo incontrolável pode resultar em uma cicatriz heterotrófica devido à maior atividade dos miofibroblastos. Se não for resolvida, o reparo se manifesta em fibrose excessiva, uma estrutura patológica que envolve um processo de remodelação caracterizado pela substituição de uma arquitetura de tecido flexível normal por um acúmulo de componentes rígidos da MEC (GERARDUZZI; DI BATTISTA, 2017).

A remodelação do novo tecido é a fase mais tardia do processo de reparo de feridas cutâneas. Ela pode durar semanas ou meses, e se caracteriza pela regressão da neovasculatura, deposição periódica de MEC e a formação de um tecido cicatricial. Essa formação do tecido cicatricial se caracteriza pela substituição do colágeno do tipo III, predominante no tecido de granulação durante as primeiras fases do reparo, e passa a ser parcialmente substituído por colágeno tipo I, colágeno mais forte a medida que a remodelação da ferida avança. Quando as células que compõem o tecido de granulação não entram em apoptose, ou seja, quando há uma permanência prolongada da fase inflamatória, cicatrizes patológicas tendem a se formar (RODRIGUES et al., 2019).

1.4 Linfócitos T no Reparo de Feridas na Pele

Em seres humanos adultos normalmente as feridas se fecham com algum grau de cicatriz, mas a grande diversidade do processo de cicatrização sugere que o reparo tecidual pode ser influenciado por múltiplos fatores. Existem situações em que o fechamento de feridas na pele ocorre com regeneração. Por exemplo, nos primeiros dois terços da gestação em fetos humanos, eventuais feridas cutâneas se fecham sem formação de cicatriz; nesta fase, o organismo exibe respostas inflamatórias menores, com pouca infiltração de leucócitos e baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias. No fechamento de feridas em fetos, que regeneram, existem maiores níveis de citocinas antifibróticas em comparação com feridas adultas e, especificamente, maior nível da isoforma do fator de crescimento transformador 3 (TGF β 3) (GURTNER, & LONGAKER, 2013).

Durante o reparo tecidual, linfócitos T são recrutados para o local ferido. Supõe-se que estas células podem ajudar na resolução da inflamação alterando a polarização de macrófagos de um estado pró-inflamatório para um estado envolvido mais na resolução da inflamação (LI et al., 2018). Linfócitos T residentes na pele (T_{RM}) também são importantes para o fechamento das lesões, uma vez que quando ativados agem sobre queratinócitos e outros tipos de células residentes, participando da manutenção da homeostase epitelial e da resposta ao dano tecidual, infecção e inflamação (XU et al., 2017). Os linfócitos T_{RM} são menos dependentes de contato com o complexo MHC-peptídeo para sobreviver, além disso possuem alta capacidade de reativação, de secreção de citocinas e por estarem amplamente distribuídos por quase todos os tecidos, conferem ao indivíduo ampla proteção (MORO-GARCÍA et al., 2018).

A inflamação de tecidos periféricos como a pele, gera o aumento do fluxo sanguíneo para os gânglios linfáticos e consequentemente ocorre o aumento do influxo de linfócitos T. Nesse ambiente pró-inflamatório, moléculas coestimuladoras e moléculas de MHC I e II são responsáveis pela ativação clássica dos linfócitos. No entanto, também existem mediadores inflamatórios e citocinas capazes de atrair os linfócitos T para o sítio inflamatório ativando essas células através dos seus receptores antigênicos. Durante a fase inicial da inflamação, linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) secretam citocinas que recrutam macrófagos, tais como TNF e IL-17 e outras que ativam os macrófagos como a citocina IFN- γ . A diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em

um fenótipo efetor específico (Th1, Th2, Th17 e Treg) dependerá das citocinas presentes no microambiente inflamatório (MORO-GARCÍA et al., 2018).

Em um estudo publicado em 2006, o reparo de lesões na pele foi comparado em camundongos atímicos (nude-nu), camundongos timectomizados e em camundongos RAGKO (GAWRONSKA-KOZAK et al., 2006). Neste estudo, mostrou-se que o reparo de lesões nos camundongos nude-nu ocorre através de um processo que se assemelha à regeneração que ocorre em fetos, com mínimo infiltrado inflamatório. Nos outros camundongos deficientes em linfócitos o reparo ocorre com formação de cicatrizes, com maior inflamação, aumento de citocinas pró-fibrótica (por exemplo, TGF β 1) e aumento da produção de colágeno. Os camundongos atímicos (nude-nu), são deficientes de linfócitos T que se formariam no timo mas têm linfócitos T extratímicos e linfócitos B, além de terem alterações na pele, uma vez que não formam pêlos. Ademais, os camundongos nude-nu acumulam linfócitos com o aumento da idade, através da maturação de linfócitos T em timos ectópicos ou extratímicos, tornando difícil distinguir nesta linhagem de camundongos o papel dos diferentes tipos de linfócitos no reparo de lesões (GAWRONSKA-KOZAK et al., 2006; MOMTAZI et al., 2015).

Nos camundongos mutantes RAGKO, com deleção dos genes de ativação de recombinação das regiões variáveis, genes que ativam a recombinação da região V (D) J (variável, diversidade, junção), não ocorre a formação das imunoglobulinas dos linfócitos B nem dos receptores de linfócitos T, levando a uma interrupção precoce da diferenciação de linfócitos B e T. Os camundongos RAGKO são incapazes de rejeitar enxerto de tecidos, mesmo xenogênicos (de outras espécies) e, por isto, foram usados num estudo em que se demonstrou que ocorre formação de cicatrizes hipertróficas nestes animais após transplante de pele humana, mas não após auto-transplante (MOMTAZI et al., 2015). As cicatrizes hipertróficas, que podem ocorrer em humanos mas não em camundongos, são caracterizadas através do aumento da espessura epidérmica e dérmica, além da perda de glândulas, folículos pilosos e alterações na deposição de colágeno e miofibroblastos (MOMTAZI et al., 2015).

Estudos recentes demonstram que as principais diferenças entre o reparo de feridas fetais e adultas ocorrem durante o estágio inflamatório, no qual as feridas fetais

contam com a participação de um número menor de células inflamatórias. Como consequência, ocorre menor formação de tecido cicatricial. Existem muitas evidências de que a inflamação durante o processo de reparo de feridas está diretamente ligada à extensão da formação da cicatriz (REINKE; SORG, 2012).

Devido a influência da fase inflamatória no processo de reparo de feridas, tornou-se atrativo para estudos de medicina regenerativa interferir na inflamação afim de alcançar melhores resultados e propor terapias mais promissoras para reduzir as cicatrizes.

1.5 Uso de Imunossupressores no Reparo de Feridas na Pele

A persistência da fase inflamatória durante a cicatrização de feridas na pele tem relação direta com o surgimento de cicatrizes patológicas, podendo gerar problemas clínicos como perda muscular, formação de úlceras, cicatrizes hipertróficas e queloides. Vários trabalhos na literatura têm utilizado imunossupressores como terapia para controlar a fase inflamatória durante o processo de cicatrização para então verificar se há uma melhora no processo final do reparo. A ciclosporina por exemplo, é um peptídeo cíclico de origem fúngica que inibe as respostas de células T através da inibição de fatores de transcrição necessários para ativação desses linfócitos. No entanto, estudos mostram que alguns desses agentes imunossupressores utilizados em condições como transplante de órgãos e doença inflamatória intestinal, podem prejudicar o processo de cicatrização de feridas. (BOOTUN, 2013)

Um imunossupressor chamado FTY720, também conhecido como Fingolimod, está atualmente sendo investigado como terapia imunorregenerativa para estimular a regeneração e modelos in vivo de cicatrização de feridas. Este fármaco foi aprovado pela FDA em 2010 para uso em tratamento de pacientes portadores de esclerose múltipla recidivante. Doença neurológica autoimune crônica no qual os linfócitos T autoreativos destroem a bainha de mielina de neurônios das substâncias branca e cinzenta do sistema nervoso central, trazendo ao paciente acometido alterações na

visão, sensibilidade do corpo, equilíbrio, controle da força muscular com consequente redução da mobilidade e locomoção. (BEHARA; GOUDY, 2023) e (Disponível em: <https://www.einstein.br/doencas-sintomas/esclerose-multipla-em>, acesso: 18 de dezembro de 2023)

O fármaco FTY720 atua como um antagonista funcional dos receptores de esfingosina 1- Fosfato (S1P-R). A molécula que se liga a esse receptor é a esfingosina 1-fosfato (S1P), lipídeo bioativo formado a partir da fosforilação de esfingolipídeos de membrana. Essa molécula têm sido implicada em diversos processos fisiológicos e a nível celular está envolvida na migração, proliferação e sobrevivência celular (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2018).

Os linfócitos T são células que expressam o S1P-R porém estes só são externalizados quando estas células entram no linfonodo durante uma resposta imune normal. Uma vez dentro dos linfonodos, o S1P-R é externalizado e então ocorre a ligação com o seu ligante bioativo S1P. A ligação do ligante em seu receptor, guia os linfócitos dentro do linfonodo para que eles consigam sair do órgão linfóide e assim se dirijam ao local onde está ocorrendo a infecção. Uma vez que a saída dos linfócitos dos órgãos linfóides se torna dependente da ligação entre S1P-S1PR, interferir nesse processo se tornou alvo para terapias.

O FTY720 possui uma estrutura química muito semelhante a molécula S1P, o que permite que o medicamento se ligue ao S1P-R já externalizado no linfonodo. (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2018)

A ligação do FTY720 vai promover a internalização e eventual degradação do receptor, impedindo a saída dos linfócitos e consequentemente reduzindo o número dessas células nos locais de inflamação (BEHARA; GOUDY, 2023).

1.6 Dados Epidemiológico sobre Feridas na Pele

No Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independentemente de sexo, idade ou etnia. Apesar da escassez de dados acerca do número de pacientes acometidos por algum tipo de ferida na pele, as poucas

pesquisas realizadas no país indicam alto índice de pessoas com alterações na integridade da pele, constituindo assim um grave problema de saúde pública (LIBERATO SMD, et al., 2017).

A incidência de pacientes com lesões de pele em unidades de internação tem aumentado, chegando a 42,6% em clínica médica, o que leva ao comprometimento da saúde dessa população. Os cuidados às lesões cutâneas necessitam do envolvimento de uma equipe multiprofissional, em vista que estas feridas podem ser responsáveis por longas internações hospitalares, além de comprometerem a recuperação dos pacientes (Mittag BF, Krause TCC, Roehrs H, Meier MJ, Danski MTR. Cuidados com Lesão de Pele: Ações da Enfermagem. ESTIMA [Internet]. 2017 Jan. 13 [cited 2023 Dec. 19];15(1). Available from: <https://www.revistaestima.com.br/estima/article/view/447>).

De acordo com a organização mundial de saúde, três das cinco principais causas de morte entre pessoas de 5 a 29 anos estão relacionadas a lesões, ou seja, lesões causadas por trânsito, homicídio e suicídio. Dos 4,4 milhões de mortes anuais relacionadas com lesões, cerca de 1 em cada 3 destas mortes resulta de acidentes de trânsito, 1 em cada 6 por suicídio, 1 em cada 9 por homicídio e 1 em 61 de guerra e conflito. (World Health Organization – WHO, 29 de novembro de 2022; Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-11-2022-who-urges-more-effective-prevention-of-injuries-and-violence--causing-1-in-12-deaths-worldwide>).

O problema de saúde pública relacionado aos indivíduos acometidos por algum tipo de lesão na pele vai além do que se pode imaginar. O Brasil é um país que se destaca muito quando o assunto são procedimentos cirúrgicos estéticos. De acordo com a sociedade brasileira de cirurgia plástica, estima-se que mais de 2 milhões de procedimentos sejam realizados pelos brasileiros até o final de 2023. (Disponível em: <https://www.sbcsp-sp.org.br/na-midia/cirurgias-plasticas-devem-somar-2-milhoes-de-procedimentos-em-2023-aponta-pesquisa/>; acesso: 19 de dezembro de 2023).

Segundo dados divulgados pela “International Society of Aesthetic Plastic Surgery”, em 2021 mais uma vez, os EUA realizaram a maioria dos procedimentos em todo o mundo (24,1% do total), seguidos pelo Brasil (8,9%) e pelo Japão (5,7%). Estima-se que os EUA e o Brasil tenham o maior número de cirurgias plásticas, com

mais de 30% do total mundial. Esses dados enfatizam ainda mais a necessidade do desenvolvimento de terapias eficazes para promover um melhor fechamento de feridas na pele. (MOUNT ROYAL, N.J., 9 de janeiro de 2023 /PRNewswire/ -- A Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (International Society of Aesthetic Plastic Surgery, ISAPS).

1.7 Tolerância Oral

Os primeiros relatos do envolvimento de proteínas alimentares nas reações imunológicas surgiram no início do século XX, quando pesquisadores conseguiram prevenir choques anafiláticos em animais através da ingestão previa de proteínas presentes no ovo, milho e leite (BESREDKA 1909; WELLS, 1911). Em um desses estudos, as cobaias recebiam na sua dieta proteínas oriundas do milho, dentre elas a mais abundante zeína, ou seja, elas se alimentavam da proteína previamente e posterior a isso as cobaias eram imunizadas com a zeína. De acordo com Wells & Osborne (1911) as cobaias que se alimentaram com zeína não sofreram reações anafiláticas, como sofreram as cobaias que não possuíam milho na dieta. Curiosamente, já em 1829, encontraram relatos de que índios americanos ingeriam extratos de uma planta sensibilizante (Poison ivy) como forma de impedir a dermatite de contato a esta planta (DANKIN, 1829).

Na década de 1970, a diminuição da resposta imune a partir de proteínas que foram previamente ingeridas foi denominada como tolerância oral (TO) (VAZ et al., 1977). A tolerância oral pode ser considerada um fenômeno análogo a autotolerância pois previne reações de hipersensibilidade as proteínas alimentares e antígenos bacterianos presentes na microbiota. Ela contribui para o equilíbrio entre antígenos exógenos provenientes da dieta, das bactérias comensais e dos componentes próprios do corpo (REZENDE; WEINER, 2022).

Embora proteínas contactadas por via oral penetrem o organismo e possam desencadear reações em animais previamente sensibilizados, elas não são usualmente sensibilizantes por si mesmas (VERDOLIN et al., 2001). Em 2012, Costa-

Junior e colaboradores, demonstraram que animais tolerantes a ovalbumina (OVA) tinham maior atividade global de linfócitos, apesar de apresentarem capacidade de resposta reduzida a OVA. Importante destacar que neste estudo, os pesquisadores observaram o surgimento precoce de células T reg ativadas, apoiadas pela expressão de citocinas regulatórias tais como IL-10 e TGF β (CASTRO-JUNIOR et al., 2012). A tolerância oral tem efeitos sistêmicos que inibem a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos específicos (OLIVEIRA et al., 2015a). Estes efeitos sistêmicos são considerados importantes mecanismos fisiológicos capazes de modular distúrbios autoimunes, inflamatórios e alérgicos, se a exposição oral ao antígeno ocorre antes da imunização (sensibilização) (GÜTGEMANN et al., 1998). Uma única exposição oral a ovalbumina (OVA) pode reduzir os níveis de anticorpos a esta proteína em camundongos adultos e resultar em tolerância imunológica específica intensa e prolongada, com redução da IgE específica. Uma vez estabelecida, a tolerância oral pode persistir em camundongos por 1 ano (SPEZIALI et al., 2018).

Em 1978, Richman e colaboradores demonstraram que é possível transferir o estado tolerante através da transferência adotiva de células T do baço para animais receptores irradiados (RICHMAN. et al 1978), caracterizando assim a tolerância oral como um fenômeno ativo e dependente de linfócitos T.

Vários mecanismos foram propostos para explicar a tolerância oral, dentre eles foi proposto que ela depende da dose e da forma de administração do antígeno. Os antígenos solúveis timo-dependentes são capazes de induzir tolerância oral em condições dose-dependentes (STROBEL; MOWAT, 1998). Nesse mesmo contexto, a anergia ou deleção clonal ocorre principalmente com altas doses de antígeno, enquanto doses baixas e repetidas do antígeno promovem a indução ativa de células T reguladoras (Tregs) (REZENDE; WEINER, 2022). No entanto, a ingestão voluntária de doses diárias do antígeno em dias consecutivos, como ocorre em uma dieta normal, é mais eficaz na tolerização que a aplicação do antígeno por gavagem (intubação gástrica) e a tolerância oral induzida por ingestão continua é mais persistente e difícil de ser quebrada (FARIA; WEINER, 1999; OLIVEIRA et al., 2015b).

A idade dos animais também influencia a indução de tolerância oral: é mais difícil induzir tolerância em animais neonatos ou senis, mas a indução de tolerância oral pode ser facilitada se estes animais recebem transferência de linfócitos de animais normais jovens adultos. Isso indica que a indução de tolerância depende da imunocompetência do organismo (LAHMANN et al., 1992). A microbiota intestinal, o background genético e a facilidade de absorção intestinal do antígeno são outros fatores que também afetam a tolerância oral (FARIA; WEINER, 1999, 2005).

A indução de tolerância oral em humanos só foi demonstrada no início da década de 1990, quando adultos alimentados com hemocianina de lapa seguida de imunização subcutânea com o mesmo antígeno foram impedidos de desenvolver uma resposta subsequente de hipersensibilidade do tipo retardado. Atualmente, a TO foi testada na indução de tolerância em doenças autoimunes e inflamatórias, como alergia ao amendoim, asma alérgica, alergia ao pólen, infecção por hepatite C, artrite reumatoide, diabetes tipo I, hemofilia A e B, em estudos clínicos e pré-clínicos (BERTOLINI et al., 2021). A maioria dos estudos mostraram que é difícil aplicar a TO para bloquear uma doença em curso, sendo a TO mais indicada para prevenir.

1.8 Mecanismos da Tolerância Oral

No intestino, ocorre crosstalk entre diversas células para induzir um ambiente naturalmente tolerogênico. Ao contrário das células Treg derivadas do timo, que possuem um repertório de TCR ativado por autoantígeno, as Treg intestinais exibem um repertório periférico Treg TCR ativado pela microbiota residente, não residente e aos antígenos dietéticos, desempenhando assim um papel crucial no controle das respostas pró-inflamatórias (BERTOLINI et al., 2021).

A resposta imune intestinal protetora ou tolerogênica ocorre em vários locais distintos do intestino e, no contexto da tolerância oral, o intestino delgado e seus linfonodos de drenagem são locais críticos. Um crescente conjunto de evidências demonstrou que as estruturas organizadas do GALT (Tecido Linfóide Associado ao Intestino) desempenham um papel importante no reconhecimento imunológico de

antígenos alimentares. Esses antígenos ao chegarem no intestino delgado são captados pelas células dendríticas (CD) que ao secretarem TGF- β induzem a expansão de células Treg que migram de volta para o intestino, onde promovem a tolerância. As CD carregadas com antígeno então migram para o linfonodo mesentérico e apresentam o antígeno para células T CD4⁺ virgens (REZENDE; WEINER, 2022).

Embora a tolerância oral seja estabelecida no intestino, conforme descrito acima, ela é sistêmica. Os mecanismos pelos quais ocorre a tolerância sistêmica não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que os antígenos administrados por via oral possam atingir a circulação e ativar o sistema imunológico. Na verdade, trabalhos já demonstram que as proteínas alimentares podem ser encontradas no sangue de ratos e humanos logo após a ingestão (REZENDE; WEINER, 2022). Mas, como os linfócitos são células que recirculam, a TO oral pode também ser dependente da recirculação dos linfócitos.

1.9 Efeitos Indiretos da Tolerância Oral

A tolerância oral é frequentemente estudada através de injeções parenterais da proteína que foi previamente administrada pela via oral - em adjuvante - e avaliação da produção de anticorpos específicos. No entanto, em camundongos tolerantes a OVA imunizações parenterais com OVA + adjuvante podem inibir resposta imunes para antígenos não relacionados injetados simultaneamente ou até três dias depois do antígeno tolerado (CARVALHO et al., 1994). Este fenômeno foi denominado “efeito indireto” da tolerância oral (CARVALHO et al., 1994; CARVALHO; VAZ, 1996).

A inibição das respostas imunes a uma proteína não relacionada ao antígeno tolerado pode ocorrer mesmo que as duas proteínas sejam injetadas por vias diferentes. Além disto, esses efeitos indiretos ocorrem mesmo se o antígeno tolerado for injetado 72 horas antes (mas não depois) do outro antígeno. Caso ocorra imunização secundária sem o antígeno tolerado e a imunização primária com o segundo antígeno for realizada na presença do antígeno tolerado também é possível

obter os efeitos da tolerância oral (CARVALHO et al., 1994; CARVALHO; VAZ, 1996; VAZ et al., 1997).

Diversos experimentos mostraram que os “efeitos indiretos” da tolerância oral também interferem no processo inflamatório e têm outras repercussões sistêmicas no organismo. Ramos et al. (2009) mostraram que os efeitos indiretos da injeção intraperitoneal do antígeno tolerado bloqueiam a inflamação desencadeada pela injeção de carragenina na pata de camundongos. Além disso também foi demonstrado que a injeção concomitante de OVA + hemoglobina em animais tolerantes orais a OVA, impede a peritonite desencadeada pela injeção intraperitoneal (i.p) de hemoglobina, assim como inibe a produção de eosinófilos na medula óssea (RAMOS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2006). Em outro estudo, mostrou-se que a injeção de OVA por via i.p. em camundongos tolerantes a OVA, concomitante com a injeção endovenosa de ovos de *Schistosoma mansoni*, reduz a formação de granulomas pulmonares (AZEVEDO et al., 2012).

Costa e colaboradores (2011 e 2016) avaliaram se os fenômenos anti-inflamatórios desencadeados pelos efeitos indiretos da tolerância oral, afetavam o reparo de lesões na pele de camundongos. Foi observado nos animais tolerantes a OVA, que a injeção i.p. de OVA+adjuvante $Al(OH)_3$ concomitante com a realização de lesões na pele, reduziu a área do tecido de granulação e o número de miofibroblastos e de leucócitos nesta área. Além disso, a reorganização das fibras de colágeno I e III ficaram dispostas de forma similar às fibras de uma pele intacta, diferentemente do que usualmente ocorre nas cicatrizes (COSTA et al., 2011, 2016).

Esse processo também foi observado com a injeção de zeína, proteína presente na ração dos camundongos. A injeção i.p. de zeína + $Al(OH)_3$ concomitante a lesões na pele reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme (CANTARUTI et al., 2017a). A redução da inflamação e melhora do reparo de lesões cutâneas também foi observado em camundongos diabéticos que receberam injeção i.p. de zeína pouco antes das lesões na pele e até 6 horas após (CANTARUTI et al., 2019, 2017b).

Karen Franco e colaboradores (2022) demonstraram que a injeção de zeína por via subcutânea, concomitante com lesões na pele também reduziu o infiltrado inflamatório e melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme. E mais, os animais tolerantes a proteína zeína, quando injetados com a proteína até 5 dias antes da realização de lesões no dorso, apresentam menor número de células inflamatórias no leito da ferida e maior número de linfócitos T. Estes animais tiveram melhor deposição das fibras de colágeno na neoderme formada (FRANCO-VALENCIA et al., 2022a).

Recentemente foi demonstrado por Bruno Costa e colaboradores (2023) que os efeitos indiretos da tolerância oral desencadeados pela injeção i.p de zeína em adjuvante, melhorou a cicatrização óssea de ratos wistar, através da redução da inflamação, levando a uma formação óssea mecanicamente mais funcional (COSTA et al., 2023).

1.10 Utilização da zeína nos Efeitos Indiretos Tolerância Oral

Os estudos de Tolerância oral e também dos efeitos indiretos da tolerância oral foram inicialmente conduzidos utilizando a proteína OVA como a proteína que induz o estado de tolerância. Contudo, esta proteína não faz parte da dieta usual de roedores, sendo necessária sua introdução na alimentação destes animais por dias consecutivos. Por outro lado, a zeína é uma proteína que está presente na ração de roedores, portanto os animais se alimentam dessa proteína diariamente e continuamente. Além disso, animais que recebem proteínas do milho em sua dieta não sofrem reações anafiláticas quando imunizados com a zeína (Wells and Osborne, 1911).

A zeína é uma proteína vegetal proveniente do milho, isolada e caracterizada por John Gorman em 1821. Ela possui uma estrutura formada por quatro peptídeos com diferentes solubilidades e sequências de aminoácidos. Devido a suas propriedades únicas, incluindo reprodutibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e a capacidade de fixar fármacos, ligantes hidrofóbicos e hidrofílicos em sua superfície, fizeram com que a zeína tenha sido extensivamente utilizada como nanocarreadoras.

Essa proteína é usada para fabricar produtos como fibras têxteis, filmes, plásticos biodegradáveis, revestimentos de alimentos e em formas farmacêuticas de liberação controlada.

Além disso, a zeína é um excipiente seguro, abundante na natureza, barato e de digestibilidade mais lenta, sendo promissoras para uso oral (ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS et al., 2023).

2 JUSTIFICATIVA

A integridade da pele é muito importante para a saúde, e a ocorrência de lesões, sejam acidentais ou decorrentes de cirurgias programadas, ocorrem com frequência. O não fechamento das feridas no tempo esperado ou cicatrização patológica, como formação de quelóides ou cicatrizes hipertróficas, geram buscas por serviços de saúde. Os indivíduos acometidos pelas feridas, seus acompanhantes quando necessários, além de todo o serviço de saúde sofrem com os seus impactos negativos. O reparo dessas lesões envolve diversos tipos de células residentes no tecido ou que migram para o local das lesões de forma ainda não esclarecida. O desenvolvimento de novas terapias para o reparo de lesões pode se beneficiar do melhor entendimento das interações celulares durante o reparo. A participação de linfócitos no reparo de lesões é reconhecida mas as suas interações com as células epiteliais e células do estroma ainda não é bem entendida. A tolerância oral resulta de uma modificação sistêmica da atividade imunológica frente a proteínas previamente ingeridas, que inibem respostas imunes ao antígeno específico. Sabe-se que a tolerância oral é um fenômeno ativo, dependente de linfócitos T e que influenciam indiretamente no reparo de lesões cutâneas. A injeção de proteínas dadas previamente por via oral concomitante com, ou até 5 dias antes da realização de lesões na pele, reduz as cicatrizes, altera os fibroblastos, reduz o infiltrado inflamatório e aumenta o número de linfócitos T no leito da ferida. Os efeitos sistêmicos da injeção de proteínas toleradas podem potencializar e/ou modificar as interações dos linfócitos com as demais células participantes do reparo de lesões. O entendimento das interações de células imunes com células epiteliais e do estroma pode resultar no desenvolvimento de terapias mais adequadas para o tratamento de lesões ou prevenção de cicatrizes patológicas. Assim, investigamos a participação dos linfócitos durante o reparo de lesões na pele em animais injetados com uma proteína imunologicamente tolerada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a participação dos linfócitos nos efeitos indiretos da tolerância oral, produzidos pela injeção de zeína, no reparo de lesões na pele.

3.2 Objetivos Específicos

1. Comparar o efeito da injeção de zeína no reparo de lesões na pele de animais com linfócitos (C57BL/6 WT) e sem linfócitos (C57BL/6 RAG KO).
2. Verificar se a inibição da saída de linfócitos de linfonodos periféricos altera o processo de reparo de lesões na pele.
3. Verificar se a inibição da saída de linfócitos de linfonodos periféricos altera o reparo de lesões na pele após a injeção s.c de zeína em camundongos C57BL/6 WT.
4. Verificar se a transferência de linfócitos de animais C57BL/6 WT para animais sem linfócitos (RAG KO) altera o reparo de lesões na pele após a injeção s.c de zeína.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da UFMG. Esses animais foram acomodados no biotério de animais experimentais do Departamento de Morfologia, em um ambiente com ar refrigerado em torno de 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas seguindo as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG. Os camundongos foram alimentados com ração padrão para camundongos e água à vontade.

Camundongos RAG1 (RAG Knockout, KO) machos com 8 semanas de idade foram cedidos pela professora Ana Maria Caetano de Faria e pelo professor Sérgio Costa Oliveira, ambos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Também obtivemos animais RAG1 KO do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos esses animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia (LIB), em microisoladores esterilizados dispostos em estantes ventiladas com controle de fluxo de ar. Os camundongos RAG KO foram alimentados com ração padrão para camundongos e água à vontade, ambas autoclavadas.

Em colaboração com o professor José Menguele da Fiocruz/RJ realizamos experimentos adicionais com animais RAG KO na faculdade de Medicina de Petrópolis, local onde os animais foram mantidos com água e ração a vontade. Experimentos aprovados pela CEUA da UFMG, protocolo 253/2021.

4.2 2 Dieta dos Camundongos para indução de tolerância oral a zeína

Todos os animais foram alimentados com ração para roedores de laboratório Nuvital/Nuvilab CR-3. O milho, contendo a proteína zeína, faz parte da composição desta ração, de forma que os animais ingeriram zeína diariamente e continuamente.

4.3 Administração intraperitoneal do Fármaco Fingolimode – FTY720

Para inibir a saída de linfócitos dos linfonodos utilizamos o fármaco Fingolimode (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), também conhecido como FTY720. De acordo com trabalhos anteriores obtidos na literatura escolhemos um protocolo de administração de FTY720 que inibe a saída dos linfócitos dos linfonodos. Assim, fizemos a administração i.p de 1mg/kg de FTY720 dissolvido em 200µL de salina em três momentos: dois dias antes das lesões na pele, minutos antes das lesões e dois dias após as lesões.

4.4 Imunização Subcutânea com Zeína em Adjuvante

Dez minutos antes da lesão na pele, os animais receberam uma injeção subcutânea, na base da cauda, de 10 µg de Zeína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) misturada numa solução de 100 µL de salina contendo 1,6 mg de adjuvante Al(OH)₃. Um grupo controle (Salina) recebeu injeção s.c. de 100 µL de salina e outro grupo (Adjuvante) recebeu 100 µL de salina com 1,6 mg de Al(OH)₃.

O protocolo de imunização subcutânea com Zeína foi utilizado tanto nos animais C57BL/6 quanto nos animais RAG KO, no entanto, toda a manipulação dos animais RAG KO ocorreu dentro de um fluxo laminar para assim evitar qualquer tipo de contaminação dos mesmos.

4.5 Lesões no Dorso

Os camundongos foram anestesiados por administração i.p. de 100 µL de uma solução de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) diluídos em salina fisiológica. Após a anestesia, foi feita a tricotomia na região dorsal dos camundongos, a limpeza da pele com álcool 70% e realizada a lesão com o auxílio de um punch dermatológico de 6,5mm de diâmetro. Após o período de recuperação, cada animal foi acondicionado em gaiolas individuais afim de evitar interferências por outros animais durante o processo de cicatrização.

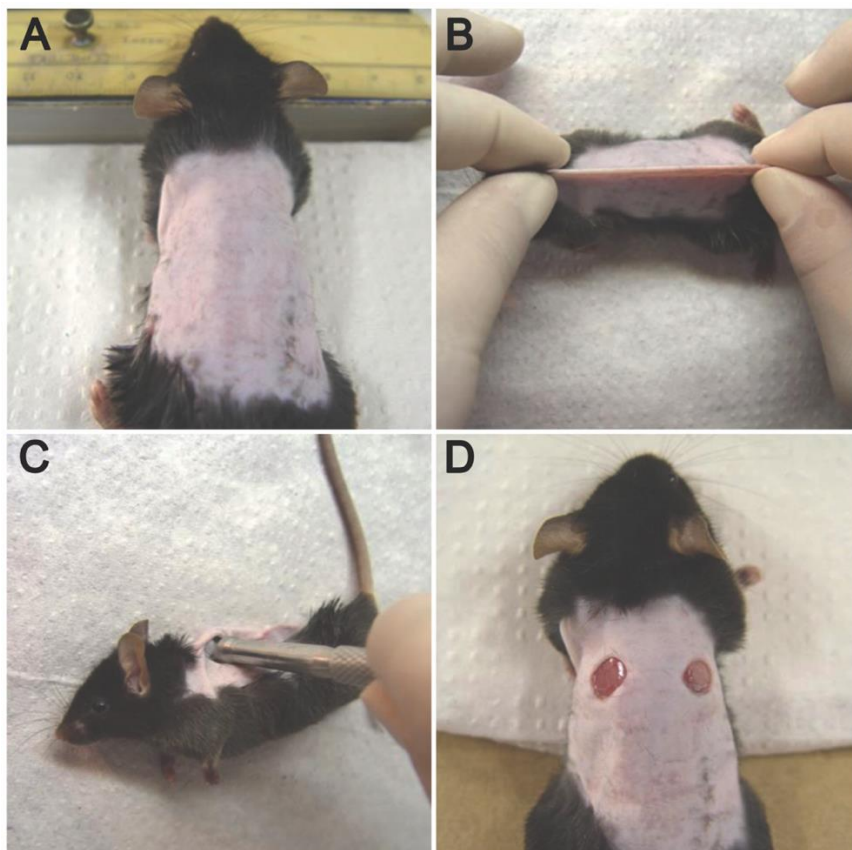


Figura 1. Esquema do protocolo experimental de ferida excisional no dorso de camundongos. Na imagem **A** o animal encontra-se com o pelo da região dorsal raspado, em decúbito ventral, anestesiado. Na imagem seguinte, **B**, a pele da região dorsal é alinhada com o plano mediando do corpo do animal. Logo após o animal se encontra em decúbito lateral **C**, e com o auxílio de um punch cirúrgico de 6,5 mm, são feitas duas feridas no dorso do animal, como representada na figura **D**.

4.6 Transferência de Células

Para verificar se a transferência de linfócitos de animais selvagens (wild type, WT) para animais sem linfócitos RAG KO seria capaz de melhorar o reparo de lesões no dorso, realizamos a coleta do baço de animais C57BL/6 WT para extração de células totais. As células extraídas foram mantidas em meio RPMI e centrifugadas a 1.200 rpm por 10 min, em seguida descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet com 1000 μ L água destilada para lise das hemácias. Paramos a reação com 9000 μ L de PBS 1x e centrifugamos novamente. Para verificar a viabilidade celular

utilizamos o corante azul de tripan e fizemos a contagem das células vivas e mortas. Por fim, ressuspendemos a solução na proporção de 1×10^8 células e injetamos nos animais RAG KO por via retro-orbital num volume de 0,1ml por animal. Quarenta e oito horas após a transferência das células, realizamos as imunizações com salina e zeína em adjuvante, seguidas de lesões no dorso e análise aos 7 dias após as lesões.

4.7 Organização e Denominação dos Grupos Experimentais

Os animais RAGKO foram divididos em três grupos: Grupo controle Salina, Grupo Adjuvante e Grupo Zeína + adjuvante, que receberam, respectivamente, injeções s.c de Salina, Adjuvante e Zeína + adjuvante, minutos antes da realização das lesões no dorso (Figura 2).

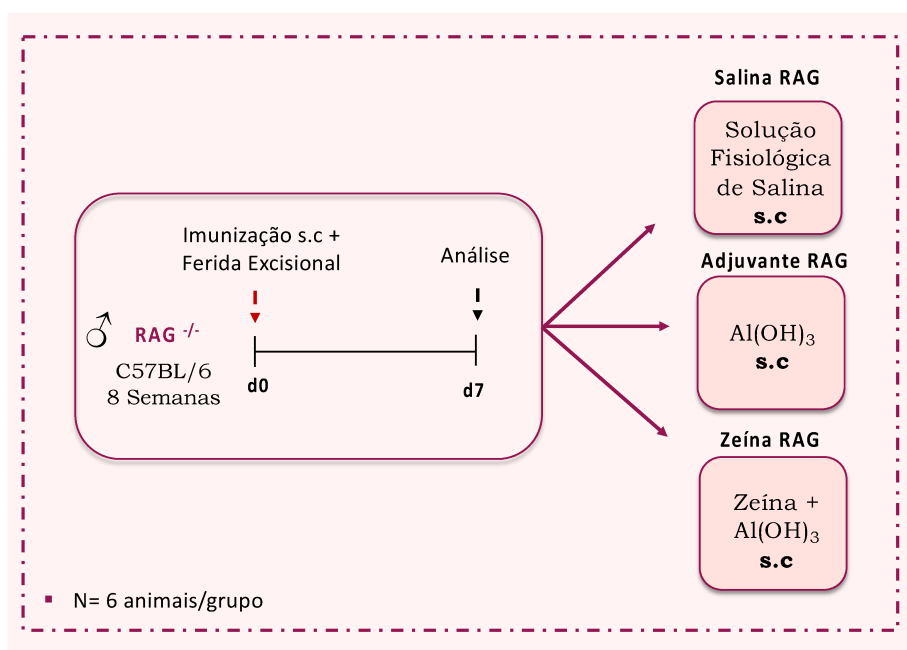


Figura 2: Protocolo experimental para avaliar o reparo de lesões no dorso em animais sem linfócitos (RAG KO) que foram imunizados com a proteína tolerada zeína.

Os animais C57BL/6 foram utilizados nos experimentos com o fármaco FTY720 e foram divididos nos seguintes grupos:

- Experimento para verificar a ação do FTY720 no reparo de lesões na pele:

Para este experimento, os animais experimentais foram denominados como grupo **FTY720**. Esse grupo de animais recebeu três doses do fármaco FTY720 pela via i.p nos seguintes dias: dia -2, dia 0 (minutos antes da realização das lesões no dorso) e no dia +2. O grupo controle, denominado de grupo **Salina** recebeu injeções de salina também pela via i.p nos mesmos dias que os animais experimentais receberam o fármaco (Figura 3).

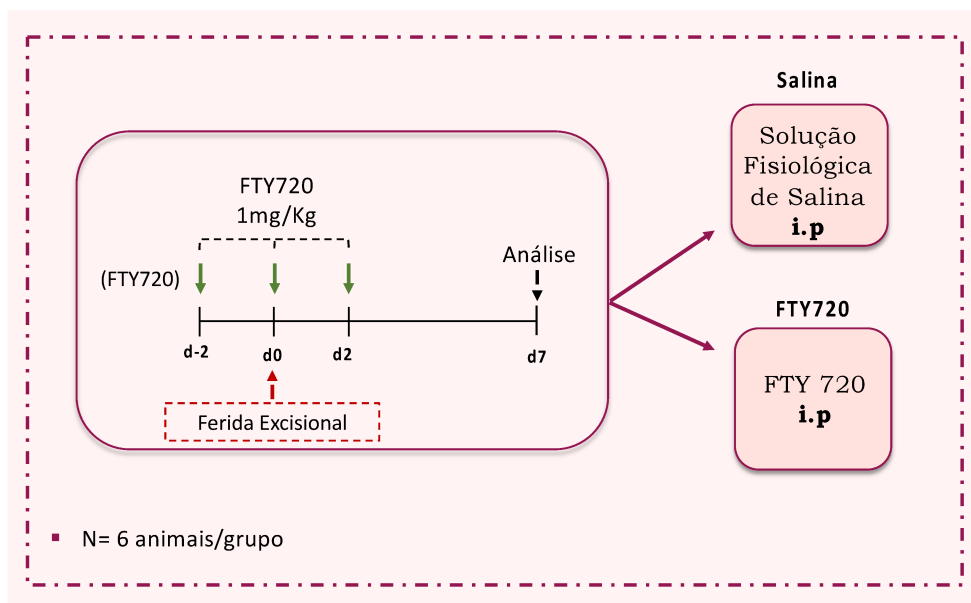


Figura 3. Protocolo experimental para verificar a ação da aplicação do FTY720 no processo de reparo de lesão cutâneas.

- b. Experimento para verificar se a injeção de FTY720 impede os efeitos indiretos da tolerância oral: Neste experimento os animais foram divididos em dois grupos controles denominados **grupo Salina** e **grupo Zeína**. Esses grupos controles receberam nos dias -2, 0 e +2, somente solução de salina via i.p e no dia da realização das lesões (dia 0) também foi feita administração s.c de Salina ou Zeína respectivamente. Os demais grupos foram denominados de **grupo Salina FTY** e **grupo Zeína FTY** pois receberam nos dias -2, 0 e +2 as doses do FTY720 e no dia da realização das lesões (dia 0) foi feita administração s.c de salina ou zeína respectivamente (Figura 4).

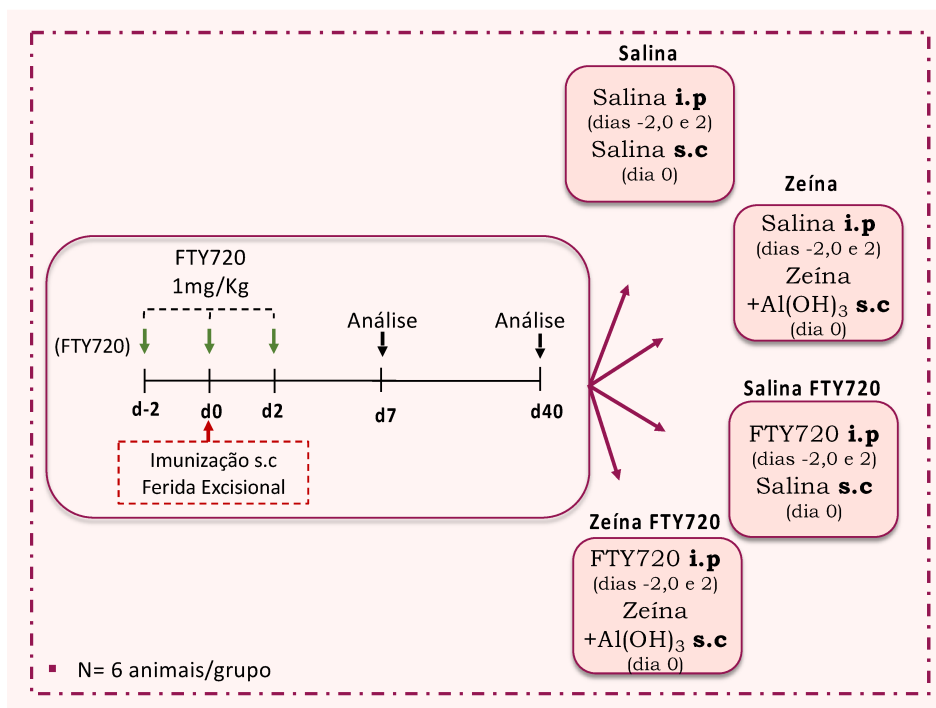


Figura 4. Protocolo experimental para verificar se a injeção do FTY720 impede os efeitos positivos da injeção da proteína tolerada zeína no reparo de lesões cutâneas.

Para os experimentos de transferência de células, os animais RAGKO foram divididos em dois grupos: Grupo controle Salina reconstituído, e Grupo Zeína + adjuvante reconstituído. Esses animais receberam transferência 1×10^8 células do baço de animais WT e após 48 horas foram imunizados por via s.c com Salina e Zeína + adjuvante respectivamente, minutos antes da realização das lesões no dorso (Figura 5).

Para verificar a população de linfócitos no baço de animais reconstituídos, dividimos os animais em dois grupos: Grupo Salina Controle, constituído de animais RAGKO imunizados com salina e que não receberam transferência adotiva de células e Grupo Salina reconstituído, imunizados com salina e que receberam 1×10^8 células do baço de animais WT doadores.

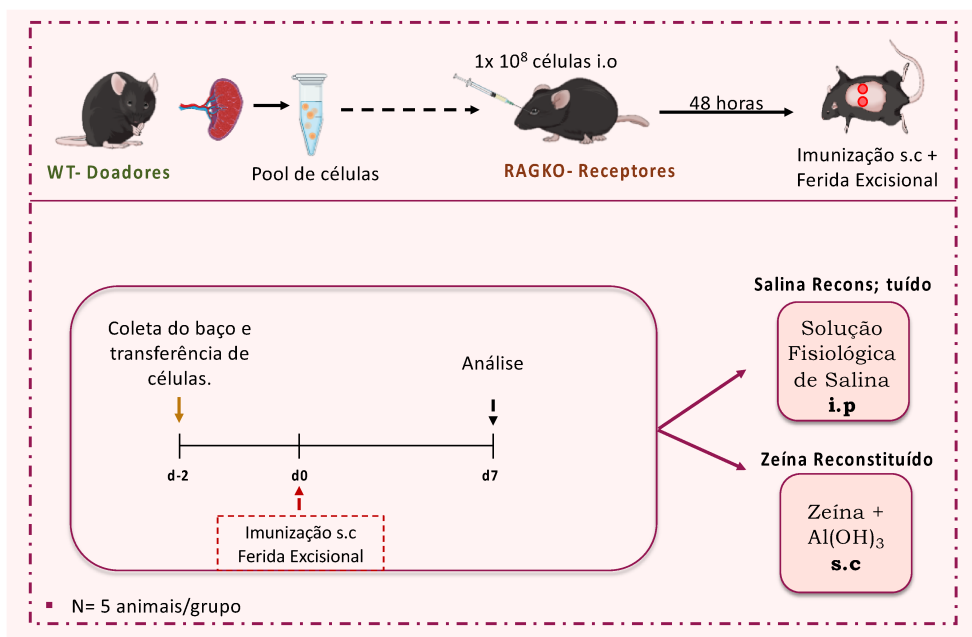


Figura 5. Protocolo experimental para verificar se a transferência de células do baço de animais WT para animais RAGKO modifica o reparo de lesões na pele.

4.8 Coleta de Sangue

4.8.1 Análise Hematológica: Para quantificar os leucócitos circulantes, utilizamos a técnica considerada padrão ouro para coleta de sangue em camundongos, no qual espeta-se uma agulha de maior espessura atrás ou abaixo do músculo masseter localizado na região da bochecha do animal. Coletamos cerca de $20\mu\text{L}$ de sangue dos camundongos que iriam receber as doses de FTY720 e analisamos usando o hemocítômetro Celltac MEK-6500K (Nihon Kohden).

O hemograma foi realizado antes da 1ª e da 2ª aplicação do FTY720 para que assim pudéssemos comparar a quantidade das células que haviam na circulação antes e após o uso do fármaco. Também realizamos análises no dia da eutanásia dos animais (dia 7) e também fizemos acompanhamento semanal em um grupo de animais para verificar em que momento o efeito do fármaco seria revertido. Importante ressaltar que o sangue foi coletado sempre no mesmo período do dia.

4.8.2 Citometria de Fluxo: Para verificar ausência de linfócitos no sangue de animais injetados com o imunossupressor FTY720 utilizamos da técnica de citometria de fluxo sem nenhuma marcação de células com anticorpos, realizamos apenas análise do tamanho x granulosidade. O sangue coletado no dia da eutanásia (dia 7) foi colocado em tubos contendo 10 uL de heparina para evitar a formação de coágulos. Em seguida fizemos a lise das hemácias, lavagens com PBS, centrifugação e ressuspensão em PBS para leitura no citômetro BDFACSCan™.

Também utilizamos a citometria de fluxo para verificar a transferência de células de animais WT para animais RAG KO. Para isso seguimos o mesmo protocolo, porém após a uso da heparina, incubamos o material com anticorpos anti-CD3 PE (1:200), anti-CD4 FITC (1:200) e anti-CD8 APC(1:200).

4.9 Coleta e fixação da pele com as lesões

Para avaliação microscópica, no dia 7 e 40 após as lesões os camundongos foram anestesiados com Xilasina e Cetamina e em seguida foram eutanasiados por deslocamento cervical. A pele foi depilada quando necessário e desinfetada com álcool 70%. As lesões dos lados direito e esquerdo foram separadas, sendo uma das lesões fixada em formalina de Carson pH 7,4 durante 24 horas em temperatura ambiente para posterior inclusão em parafina e análise histológica e a outra lesão foi fixada em uma solução contendo 80% de metanol e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) em ultrafreezer a -80°C para posterior inclusão em paraplast e análises de imunofluorescência (Figuras 6 e 7).

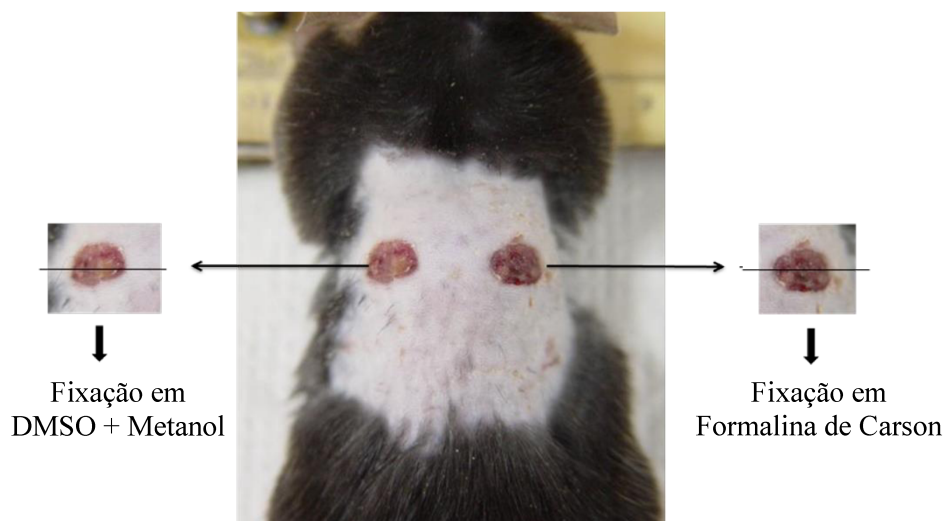


Figura 6. Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas 7 dias após a sua realização.

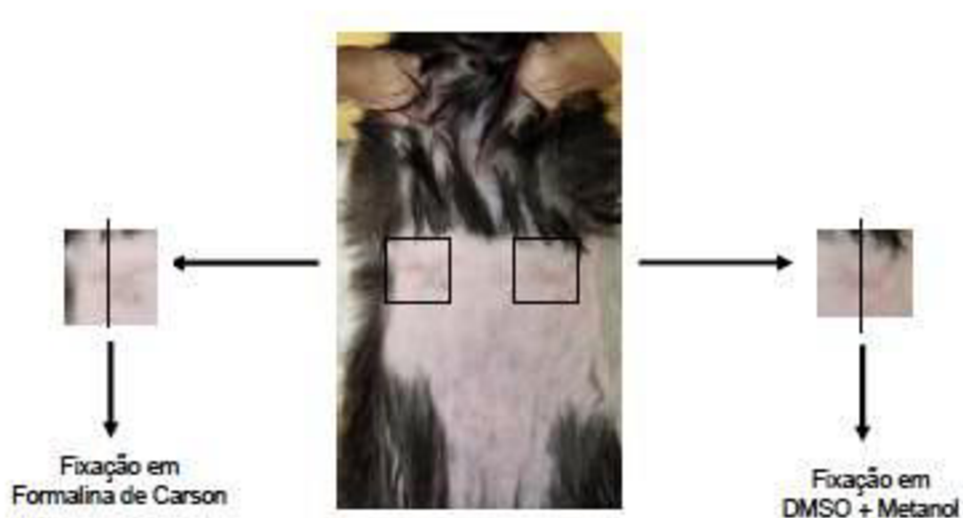


Figura 7. Coleta da pele contendo a cicatriz, 40 dias após a realização das lesões.

4.10 Análises macroscópicas e medida da áreas das lesões

Para avaliação macroscópica, as lesões foram fotografadas ao lado de uma régua milimetrada utilizando uma câmera digital (Nikon COOLPIX S3100), no dia da realização das lesões (dia 0), no dia 7 e 40 pós lesão. As imagens com a área da lesão foram analisadas utilizando o software Image Tool Versão 3.0 (UTHSCSA, San Antônio, Texas USA <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.htm>), através do qual a área da lesão foi determinada em mm².

4.11 Histologia e morfometria

Após a fixação em formalina de Carson, as lesões foram seccionadas perpendicularmente em sua metade e processadas para inclusão em parafina. Utilizando um micrótomo foram feitos cortes de 5 μm à partir do meio da lesão e esses cortes foram colocados em lâminas que foram submetidas a protocolos padrão de coloração com hematoxilina e eosina (H&E), azul de toluidina, alcian blue + safranina, tricrômico de Masson e Picrosirius Red. Imagens digitais dos tecidos foram obtidas utilizando um scanner digital automático de lâminas (Pannoramic MIDI, 3DHISTECH Ltd., Budapeste, Hungria).

Na análise dos cortes histológicos corados com H&E observou-se os seguintes aspectos: extensão da lesão, presença de tecido de granulação, intensidade e tipos de células predominantes no exsudado inflamatório, reepitelização, presença de crostas, presença de edema intersticial, presença de hemorragia e disposição espacial das fibras de colágeno. As células presentes no tecido de granulação possuem características morfológicas individuais sendo as principais os fibroblastos (núcleo alongado, bastante condensado, fusiforme e com escasso citoplasma em sua forma quiescente ou com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos que destaca uma morfologia ativada) e os leucócitos (células de forma esférica com citoplasma granular ou não, com núcleos irregulares, arredondados ou lobulados) (Carneiro, 2006).

A análise morfométrica das células foi realizada utilizando uma grade de inserção colocada na lente ocular em imersão (aumento de 1000x) (Figura 8). Os mastócitos foram identificados através da coloração com azul de toluidina e/ou alcian blue + safranina. Para análise das fibras de colágeno, utilizamos a coloração de Tricômico de Masson e Picrosirius Red. Para análise morfométrica, leucócitos, fibroblastos e mastócitos foram contados em 10 campos de 10000 μm^2 na área da lesão, de uma secção por cada animal e os resultados de seis secções por grupo foram expressos como a média $\pm$ erro padrão por grupo.



Figura 8. Retículo utilizado para análises morfométricas. O retículo apresenta uma área de $100 \mu\text{m}^2$ e é acoplado à ocular do microscópio.

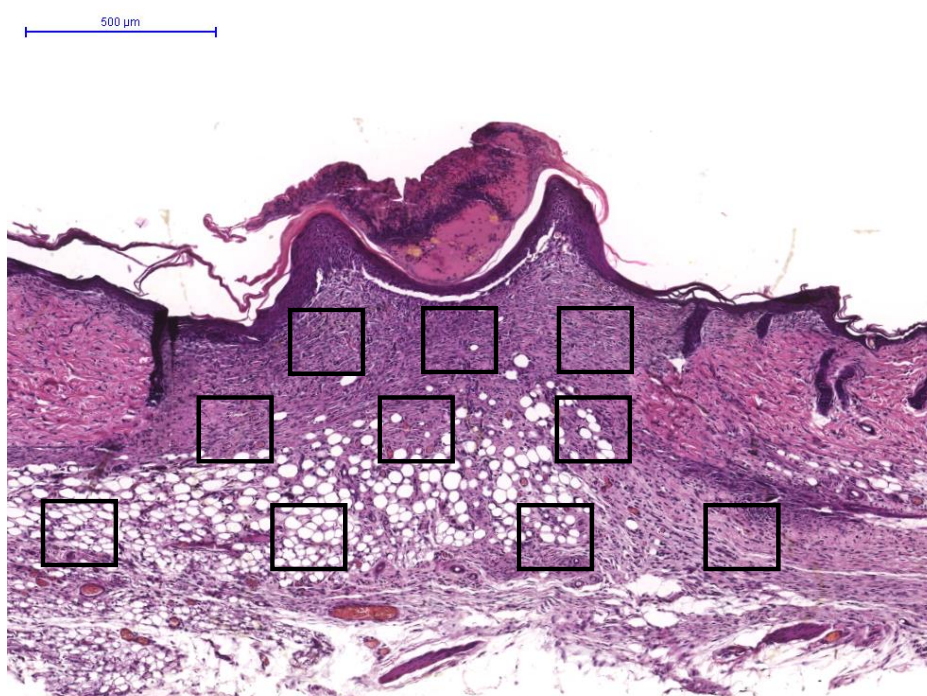


Figura 9. Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo excisional.

4.12 Técnica de Imunofluorescência Indireta

As lesões fixadas em DMSO + Metanol foram seccionadas perpendicularmente em sua metade e processadas para inclusão em Paraplast. Utilizando um micrótomo, foram feitos cortes de 5 μm à partir do meio da lesão. A técnica de Imunofluorescência Indireta é realizada em 3 dias sendo o primeiro dia destinado à adesão do corte à lâmina de microscopia. Para isso, colocou-se uma pequena gota de água milli Q na lâmina e o corte do tecido foi colocado sobre a gota de água na lâmina que, por sua vez, foi colocada em uma chapa aquecedora à 39°C e assim permaneceram até o dia seguinte para que os cortes do tecido se estiquem. No segundo dia as lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol e hidratação em uma série gradual de álcoois (100%-25%), seguida de incubação em solução de bloqueio a 1,25% de Albumina de Soro Bovino (BSA) em PBS + Tween 20 (0,1%) à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida adicionou-se os anticorpos primários para identificação das moléculas expressas nas células de interesse e as lâminas com os cortes foram incubadas overnight a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: rat anti-CD45 (Biolegend), rat anti-CD3 (BD Pharmingen), rat anti-F4/80 (eBioscience), rat anti-Ly-6G purificado (eBioscience), mouse anti-actina de músculo liso α -SMA (Sigma-Aldrich) e rabbit anti-Relm (abcam). No dia seguinte, depois de três lavagens em PBS 1x, os cortes foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente no escuro com os seguintes anticorpos secundários: Anti-Rat Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA), Anti-mouse Alexa-Fluor 488 ou Anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen by Termo Fisher Scientific). Os núcleos das células foram marcados com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Após três lavagens com PBS 1x, as lâminas foram cuidadosamente secadas com papel absorvente para montagem com lamínula específica para Imunofluorescência, (espessura de 0,13 X 0,16 mm), utilizando uma solução de 10% de TRIS (1M pH 9) + 90% de glicerina. Logo em seguida, as lâminas foram analisadas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB, em microscópio confocal (Zeiss LSM 880 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha.) As configurações confocais foram determinadas no início da aquisição das imagens através de lâminas controle (sem anticorpos primário e secundário -/- e sem anticorpo primário mas com o anticorpo secundário -/+) e mantidas constantes durante toda a captura. Foi adquirida 1 foto panorâmica da pele de cada animal (1124.59 μm x 1799.35 μm) e as imagens

obtidas foram posteriormente selecionadas utilizando o software Zen Lite 3.8 para determinação da área da lesão, local onde foram feitas as análises. O tamanho da área analisada (448 μm x 1130 μm) foi mantida a mesma para todos os animais e em todas as marcações feitas. As imagens escolhidas foram convertidas em escala de cinza utilizando o software ImageJ para realização do histograma e os valores encontrados foram divididos pela área previamente selecionada em μm^2 .

ANTICORPOS	ESPECIFICAÇÕES	DILUIÇÃO	FONTE
PRIMÁRIOS	Anticorpo purificado anti-CD45 produzido em rato	1:50	Biolegend (103-102)
	Anticorpo purificado anti-CD3 produzido em rato	1:50	BD Pharmigen (555273)
	Anticorpo purificado anti-F480 produzido em rato	1:50	eBioscience (14-4801)
	Anticorpo purificado anti-Ly6G (Gr-1) produzido em rato	1:50	eBioscience (14-5931-86)
	Anticorpo Monoclonal Anti-actina α -SMA produzido em camundongo	1:100	Sigma-Aldrich (A2547)
	Anticorpo policlonal anti-RELM alpha/Retnla produzido em coelho	1:30	abcam (ab39626)
SECUNDÁRIOS	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em coelho, anti IgG de rato	1:150	Molecular Probes (A21210)
	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em cabra, anti IgG2a de camundongo	1:200	Invitrogen (A21131)
	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em cabra, anti IgG (H+L) de coelho	1:175	Invitrogen (A11008)
	DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	1:300	Molecular Probes (D1306)

Tabela 1 – Especificação dos anticorpos utilizados para a técnica de Imunofluorescência Indireta.

4.13 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como a média $\pm$ erro padrão (SEM). As comparações entre os grupos foram feitas através de ANOVA e pos test de Bonferroni, sendo a diferença considerada significativa quando $p < 0,05$. Para comparação entre dois grupos foi utilizado Teste T de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad PRISMA 7 (GraphPad Software, CA, USA).

5 RESULTADOS

Parte I – Avaliação da cicatrização de feridas de pele em animais sem linfócitos

Uma vez que os linfócitos são importantes para o estabelecimento da tolerância imunológica nos perguntamos se a injeção de zeína em animais sem linfócitos teria efeito diferente do que ocorre em animais WT, onde os efeitos indiretos da tolerância oral promovem melhor cicatrização.

5.1 Administração subcutânea de Zeína em animais RAGKO não promove maior fechamento da lesão.

A análise macroscópica qualitativa, no dia 7 pós lesão (Figura 10B), nos mostra que os animais RAG KO imunizados com Zeína ou apenas com o adjuvante apresentaram atraso no fechamento da ferida quando comparados com os animais RAG KO que receberam injeção de salina. Diferentemente do que ocorre nos animais WT, a injeção de zeína nos animais RAG KO não reduziu a área da lesão. É notável a presença de uma crosta bem aderida, indicando que não houve reepitelização completa nesses animais. De modo geral, as lesões dos animais RAG KO são maiores do que as lesões dos animais WT, o que foi confirmado através da medida das áreas das lesões (Figura 10C). Além disso, conseguimos observar a olho nu que a pele dos animais RAGKO possuem uma espessura mais fina, com aspecto mais avermelhado do que a pele dos animais WT.

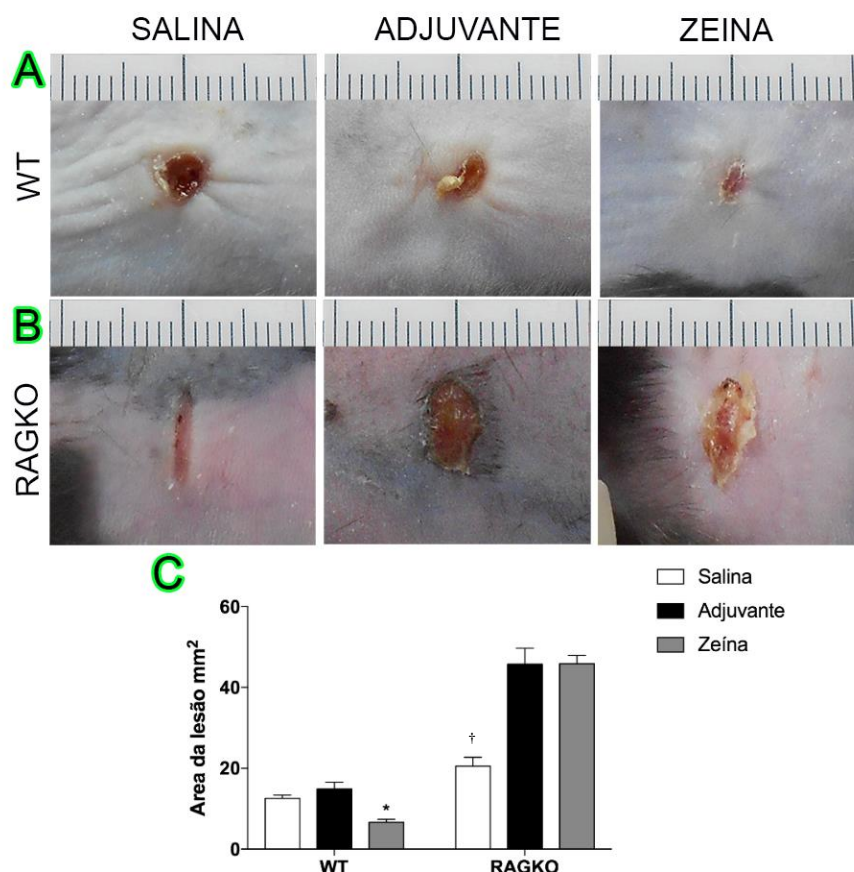


Figura 10. Injeção s.c de zeína em animais RAG KO não promove maior fechamento das lesões na pele. (A) Imagens representativas das lesões após 7 dias em animais WT. (B) Imagens representativas das lesões após 7 dias em animais RAG KO. (C) Gráfico mostra área da lesão no dia 7 pós lesão. * representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos grupos salina e adjuvante WT, † representa diferença significativa em comparação aos grupos adjuvante e zeína. Os dados representam a média $\pm$ SEM. $n = 6$ animais.

5.2 Administração subcutânea de Zeína em animais RAG KO não altera o infiltrado inflamatório.

As análises microscópicas qualitativas das lesões foram realizadas através das colorações de Hematoxilina e Eosina (H&E), para morfometria de leucócitos e fibroblastos, e também utilizando a coloração de Alcian Blue + Safranina, que nos permitiu quantificar os mastócitos. Podemos observar na figura 12 (A-F) microscopias em menor aumento onde fica evidente que a ausência de linfócitos impacta de

maneira significativa na área do tecido de granulação principalmente quando observamos os animais imunizados com zeína e comparamos com os animais zeína WT.

Outro ponto que nos chamou atenção foi que os animais Salina RAG KO apresentaram uma extensão do tecido de granulação maior e mais presença de células adiposas no leito da ferida do que os animais salina WT (Figura 12 A e D), com um microambiente repleto de células inflamatórias (Figura 12 G e J). Observamos de forma geral em todos os grupos RAG KO presença de edema, hemorragia intersticial e formação de novos vasos, aspectos que caracterizam um tecido bastante inflamado, assim como observamos nos animais Salina e Adjuvante WT.

A população de células do infiltrado inflamatório desses animais sem linfócitos (RAGKO), independente do grupo, apresentou-se com intensa presença de neutrófilos. Vale ressaltar que nos animais WT a presença de neutrófilos já não é tão prevalente no dia 7 pós lesão.

De modo geral nossas análises nos mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos RAGKO, no que se refere a quantidades de leucócitos, fibroblastos e mastócitos presentes no tecido de granulação, como demonstrados pelos gráficos (Figuras 11).

Assim, concluímos que a injeção de zeína em animais sem linfócitos (RAGKO) não influenciou positivamente o reparo de lesões na pele, diferentemente do que ocorre em animais com linfócitos WT (Franco-Valência et al 2022).

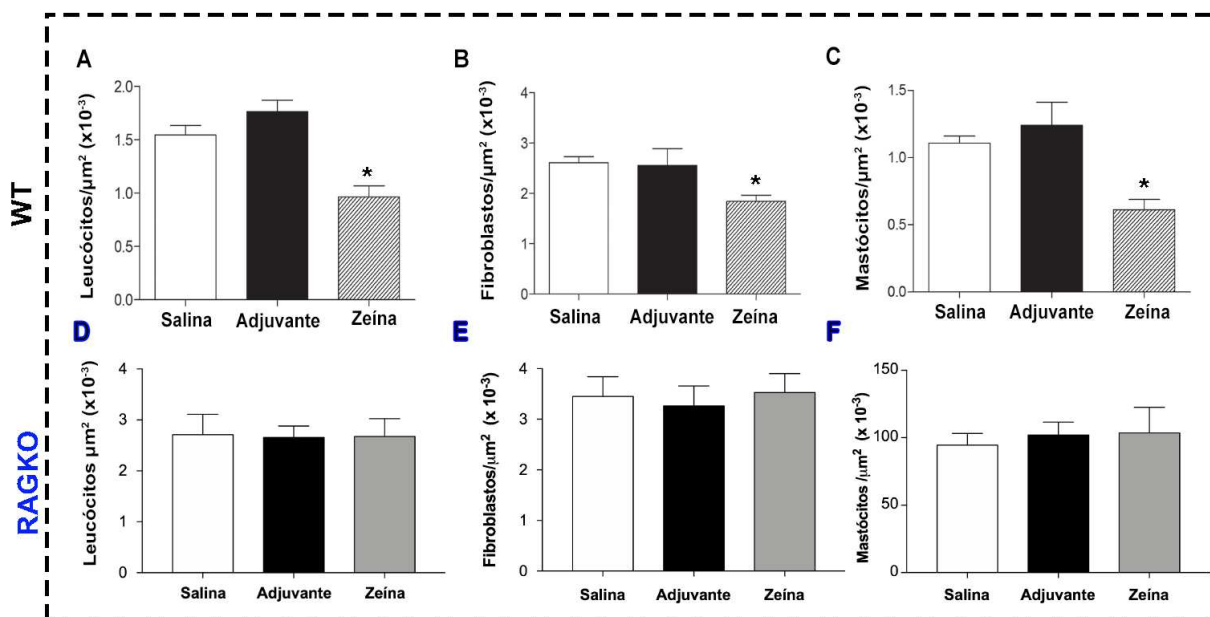


Figura 11. A administração subcutânea de zeína não alterou a quantidade de células no leito da ferida de animais RAGKO. (A-C) Gráficos representativos da morfometria de leucócitos (A) fibroblastos (B) mastócitos (C) em animais com linfócitos WT. (D-F) Gráficos representativos da morfometria de leucócitos (D) fibroblastos (E) mastócitos (F) em animais sem linfócitos RAGKO. Os dados representam a média $\pm$ SEM., * representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos grupos salina e adjuvante. .n= 6 animais.

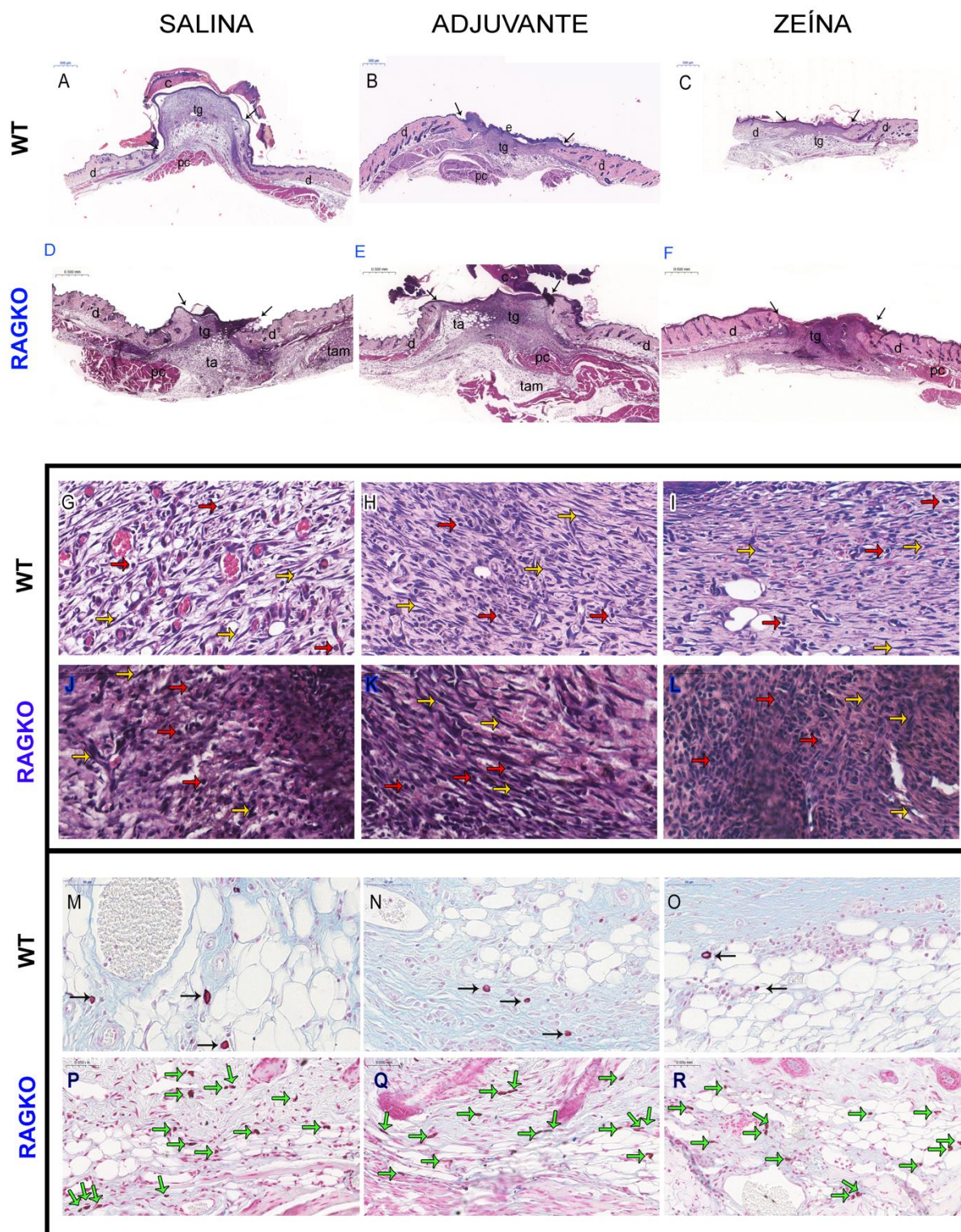


Figura 12. A administração subcutânea de zeína não alterou a quantidade de células no leito da ferida de animais RAGKO. (A-F) Visão panorâmica (40x) após coloração histológica em H&E em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesões no doso. As setas pretas em menor aumento indicam o local onde foi realizada a lesão e as letras pequenas representam: c, crosta; e, epiderme, tg, tecido de granulação; ta, tecido adiposo; tam, tecido adiposo marrom; d, derme; pc, panículo

carnoso. (G-R) Painéis em maior aumento (630x) indicam leucócitos (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas) e mastócitos (setas pretas e verdes) em animais WT e RAGKO. Barra de escala: (A-F) 500 μ m; (G-R) 50 μ m.

5.3 Injeção subcutânea de zeína em animais RAG KO não altera a intensidade de fluorescência para marcador específico de leucócitos.

Trabalhos anteriores do nosso grupo utilizando animais WT, mostraram que a injeção da proteína tolerada zeína reduz o número de leucócitos no leito da ferida. Então, para confirmar os dados encontrados na histologia com H&E, onde observamos que os animais RAG KO apresentam grande número de células inflamatórias no leito da ferida independentemente do tratamento, realizamos a técnica de imunofluorescência através da utilização de anticorpo anti-CD45, específico para leucócitos.. A quantificação da intensidade de fluorescência para CD45 confirmou que não há diferença significativa no número de leucócitos entre os grupos (Figura 13 e 14).

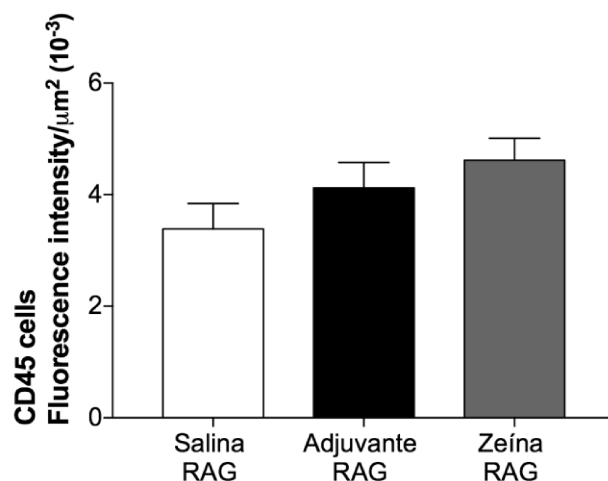


Figura 13. A injeção de zeína em animais RAGKO não reduz o número de leucócitos na área da lesão. Gráfico representativo da intensidade de fluorescência para leucócitos (CD45+) em fragmentos de pele no dia 7 após a realização das lesões em animais RAG KO. Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

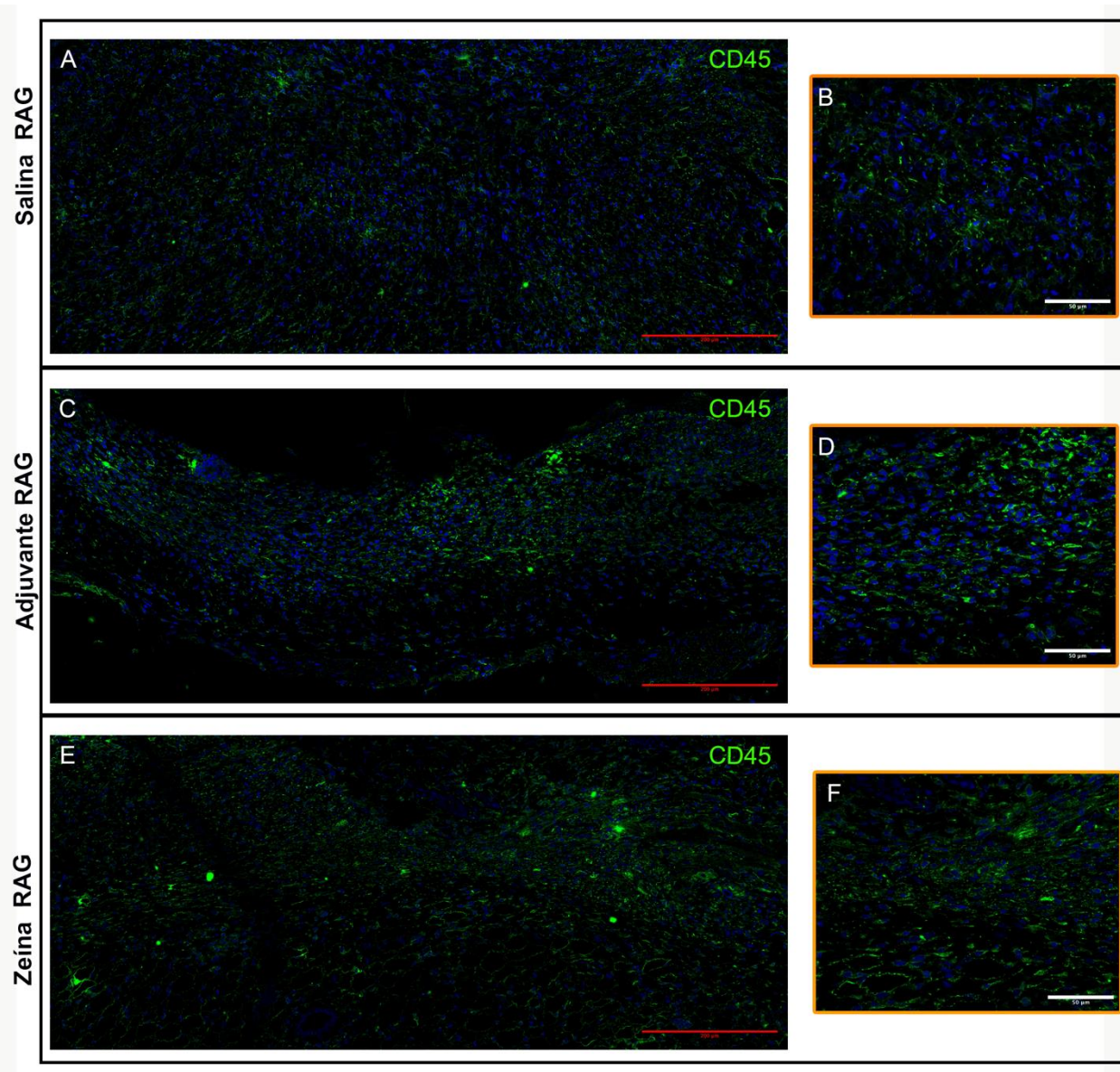
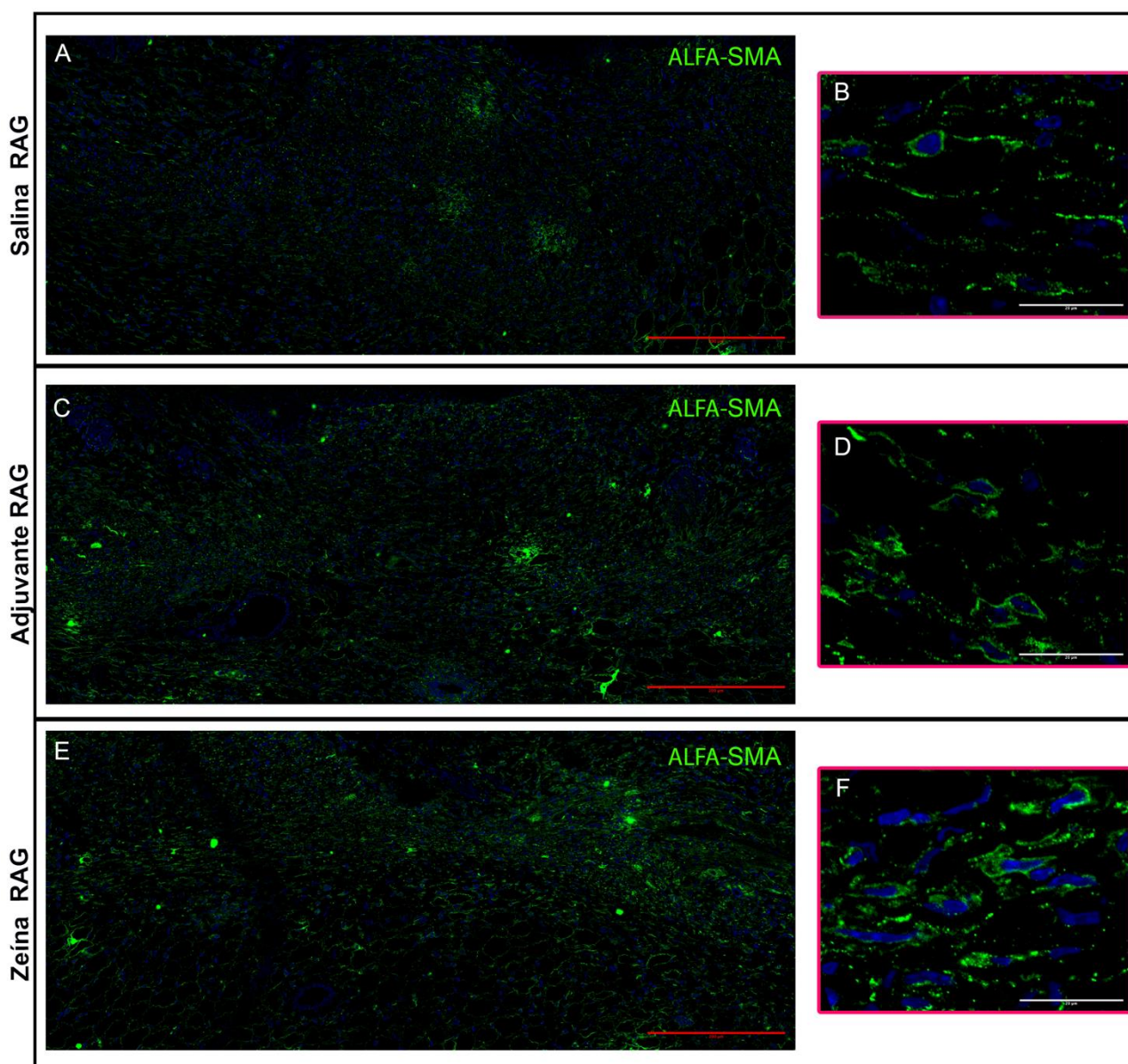


Figura 14. Injeção de zeína em animais RAG KO não altera o número de leucócitos no leito da ferida. (A-F) imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti-CD45 (verde) e DAPI (azul) em feridas de pele coletadas 7 dias após as lesões para quantificação de leucócitos. (A, C e E) escala de barra 200 µm; (B,D e F) escala de barra 20 µm.

5.4 Análise por imunofluorescência da presença de miofibroblastos no leito da ferida em animais RAG KO.

Através do marcador α - actina de músculo liso (α -SMA), expresso em miofibroblastos, realizamos análise da intensidade de fluorescência na ferida de animais RAG KO no dia 7 pós lesão. Os resultados nos mostram que todos os grupos RAG KO, independente da imunização que receberam, apresentaram alta intensidade de fluorescência. Nota-se que essa intensidade foi um pouco maior nos animais que receberam adjuvante e zeína. No entanto, as análises estatísticas não detectaram diferenças significativas como representado no gráfico da figura 15.



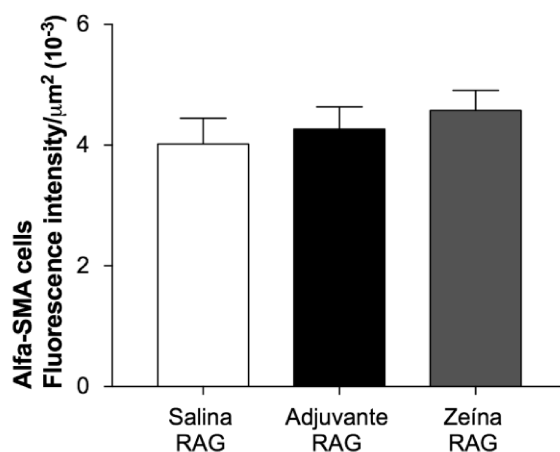


Figura 15. Análise de miofibroblastos no leito da ferida de animais RAG KO. (A, C e E) imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti α -SMA e DAPI em fragmentos de pele contendo a ferida coletadas 7 dias após as lesões para quantificação da proteína α -actina de músculo liso, produzida por miofibroblastos; escala de barra $200\mu\text{m}$. (B,D e F) imagens representativas dos miofibroblastos; escala de barra $20\mu\text{m}$. (G) Gráfico representativo da quantificação da intensidade de fluorescência.

Parte II – Avaliação do efeito do tratamento com FTY720 na cicatrização de pele

Uma vez que a cicatrização da pele nos animais RAG KO é diferente dos animais WT e que a injeção de zeína não promoveu maior fechamento das lesões, nos perguntamos se o bloqueio da migração dos linfócitos poderia alterar a cicatrização e o efeito positivo da injeção de zeína. Para responder a essas perguntas, utilizamos o FTY720, capaz de reter os linfócitos nos órgãos linfoides secundários, impedindo assim que essas células migrem para o local da inflamação.

5.5 Administração intraperitoneal de FTY720 reduz drasticamente a quantidade de linfócitos circulantes de animais C57BL/6 e prejudica o fechamento das feridas na pele.

Inicialmente realizamos um experimento para verificar se a aplicação do FTY720 por si só teria algum impacto no reparo de lesões na pele, ou seja, não aplicamos a proteína tolerada zeína. Utilizamos o esquema de aplicação dividido em três doses, cada uma contendo 1mg/Kg do fármaco. O início da aplicação do FTY720 ocorreu dois dias antes da realização das lesões (dia -2), seguida da segunda dose no dia da lesão (dia 0) e a terceira e última dose foi aplicada dois dias após a lesão (dia 2) (Figura 3). O sangue coletado dos animais no dia da eutanásia (dia 7) nos permitiu realizar a análise da citometria de fluxo (tamanho X granulosidade), e com isso verificamos que os animais que receberam as três doses de FTY720 tiveram a população de linfócitos circulantes drasticamente reduzida para cerca de 25% (Figura 16A).

Além disso, também realizamos análise de hemograma para avaliar o efeito cinético da droga na redução de linfócitos no sangue. Foi observado que antes da primeira aplicação do fármaco os animais apresentavam uma média de 7 linfócitos/ml de sangue e após a primeira aplicação essa média diminuiu para 1.2 linfócitos/ml. No dia da eutanásia (dia 7) os animais que já haviam recebido as 3 doses do FTY720 apresentaram uma média de 0.65 linfócitos/ml circulantes no sangue (Figura 16B). O acompanhamento desses animais nos mostrou que somente após 24 dias da primeira aplicação do FTY720, foi possível observar que o número de linfócitos havia retornado aos valores semelhantes encontrados nos animais WT (Dados não apresentados).

Esses dados mostram a eficácia do fármaco em reter os linfócitos nos linfonodos impedindo sua migração e recirculação. Também foi possível observar essa redução com a contagem de leucócitos globais. Vale ressaltar que tanto na análise de citometria de fluxo quanto na análise do hemograma, obtivemos indícios de que a população de granulócitos circulantes nos animais FTY720 estava aumentada (Figura 16A e B).

Após essas análises do sangue, avaliamos como estariam as lesões macroscópicas dos animais FTY720 no dia 7 pós lesão. Podemos observar que os animais tratados com FTY720 apresentaram maior área da ferida quando comparadas com o grupo controle Salina, feridas estas com características que indicam que as mesmas apresentam um atraso no fechamento quando comparadas com as feridas dos animais controle (Figura 16C).

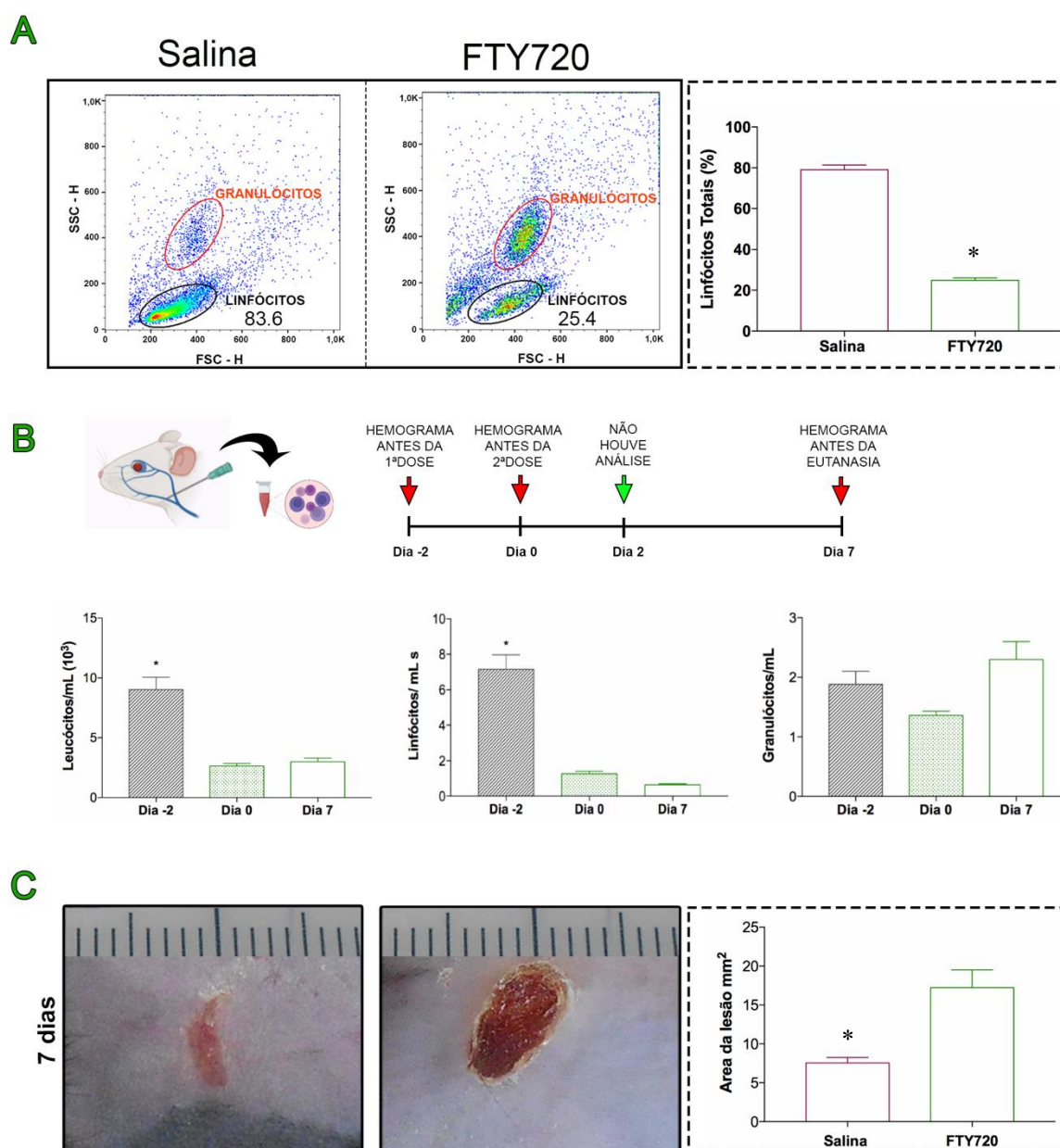


Figura 16. A administração de FTY720 promove redução drástica dos linfócitos circulantes e prejudica o fechamento de lesões na pele. (A) FACS realizado no dia 7 pós lesão em animais que receberam 3 doses de salina i.p ou FTY720 i.p

mostram redução significativa de linfócitos; gráfico representa os valores em %. (B) Esquema da coleta de sangue dos animais que receberam injeções de FTY720 para análise de hemograma; gráficos representam os valores encontrados de leucócitos totais, linfócitos/mL e granulócitos/mL. (C) Imagens macroscópicas representativas das lesões após 7 dias e gráfico representativo da medida da área das lesões em mm². * representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação ao grupo salina (A), aos dias 0 e 7 (B) e em comparação ao grupo FTY720 (C). Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

Analisando microscopicamente os fragmentos de pele coletados no dia 7 pós lesão, cortados e corados em H&E e Azul de Toluidina observamos aspectos comuns entre os grupos controle e o que foi tratado com FTY720, tais como: extensa área do tecido de granulação, grande quantidade de células inflamatórias (Figura 17C e D – setas vermelhas) no leito na ferida e também no tecido adjacente; grande número de fibroblastos (Figura 17C e D – setas amarelas) e mastócitos (Figura 17E e F – setas verdes) e deposição de colágeno bastante discreta com fibras finas. No entanto, os animais que receberam as doses de FTY720 apresentaram algumas características que indicam uma inflamação mais intensa e um atraso no processo de reparo em comparação aos animais controle como por exemplo, vários pontos de hemorragia, fibroblastos com características morfológicas de intensa ativação, maior presença de neutrófilos e monócitos, grande número de novos vasos inseridos no leito da ferida, além de reepitelização incompleta.

A análise morfométrica de leucócitos, fibroblastos e mastócitos no leito da ferida mostrou que não houve diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle e grupo tratado com o FTY720 (Figuras 17G, H e I).

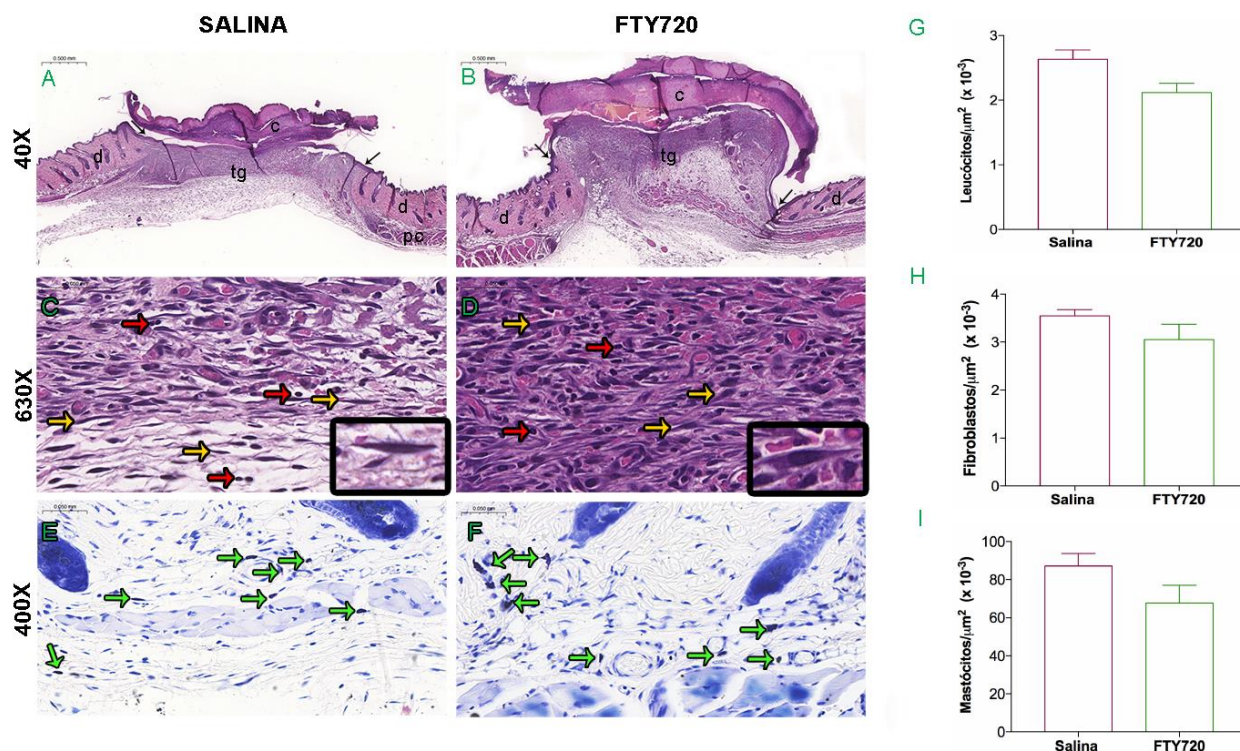


Figura 17. A administração de FTY720 não alterou a quantidade de células no infiltrado inflamatório. (A-D) Coloração histológica em H&E em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesões no dorso. As setas pretas nas micrografias em menor aumento (A,B 40x) indicam o local onde foi realizada a lesão e as letras pequenas representam: c, crosta; e, epiderme, tg, tecido de granulação; d, derme; pc, panículo carnosos. Nas micrografias em maior aumento. Em maior aumento (C,D 630x) as setas indicam leucócitos (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas) e os painéis pretos destacam diferenças morfológicas dos fibroblastos. (E-F) Coloração histológica de Azul de Toluidina em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesão no dorso de camundongos, para análise de mastócitos (setas verdes). Barra de escala: painéis superiores, 500 μm ; painéis centrais, 200 μm ; painéis inferiores, 50 μm . Análises morfométricas de leucócitos (G) fibroblastos (H) e mastócitos (I). Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

5.6 Administração intraperitoneal de FTY720 impede o efeito positivo da zeína na cicatrização de feridas na pele.

Uma vez que a aplicação intraperitoneal de FTY720 inibe a recirculação de linfócitos, testamos nos animais tratados com este fármaco, os efeitos indiretos da tolerância oral, através da aplicação subcutânea da proteína zeína, na cicatrização de lesões na pele. Assim como mostrado em trabalhos anteriores (Cantaruti 2016 e Franco Valencia, 2022), a injeção de zeína em animais WT promoveu um melhor fechamento da lesão, com redução do infiltrado inflamatório. Entretanto, a injeção de FTY720 impediu o efeito positivo da injeção de zeína, como descrevemos a seguir. A análise macroscópica da lesão (Figura 18) mostrou que os animais Salina FTY720 e Zeína FTY720 tinham área da lesão maior quando comparadas com seus respectivos grupos controle. Além disso essas feridas estavam com presença de crosta mais aderida, sinal de que não houve fechamento completo após os 7 dias, principalmente no grupo Zeína FTY720 (Figura 18 C-D). Essas observações foram confirmadas através da medida da área da lesão (Figura 18E).

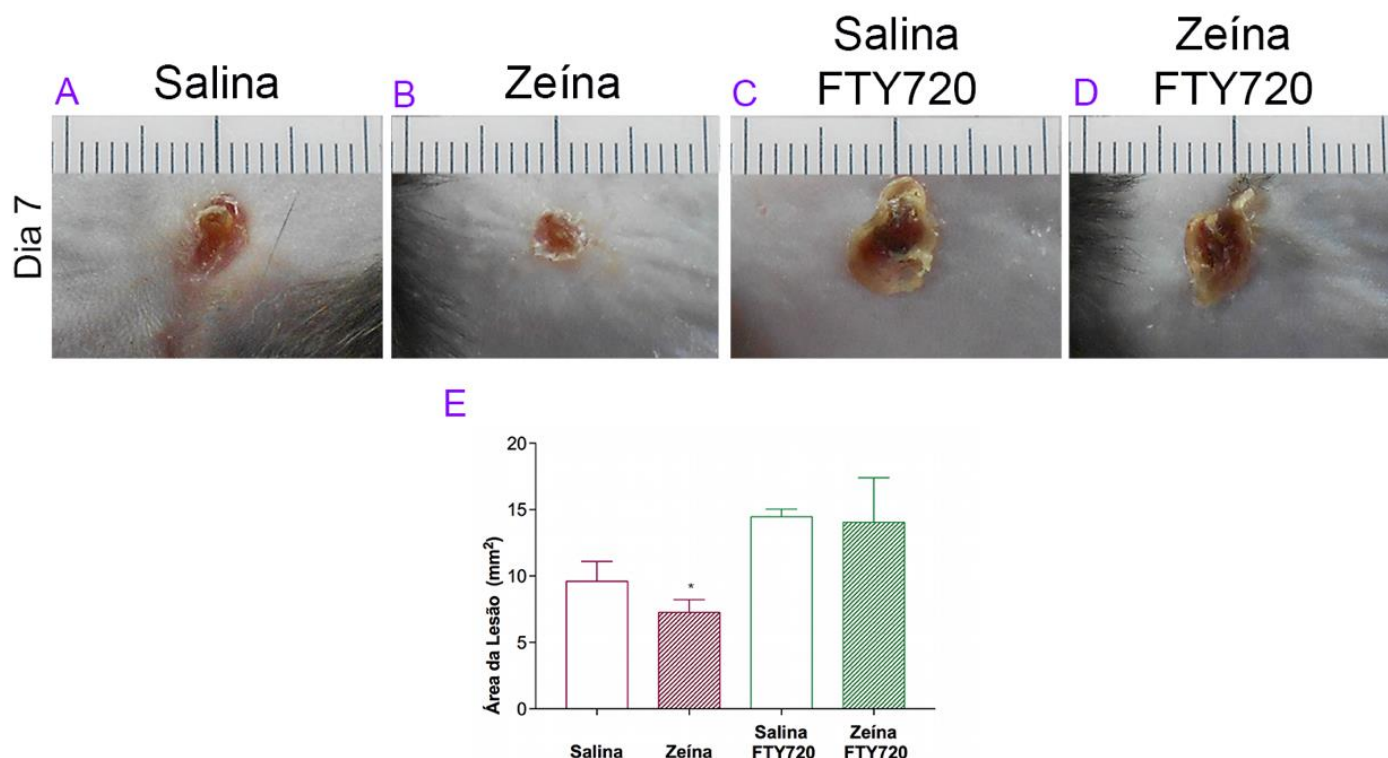


Figura 18. Administração de FTY720 impediu os efeitos positivos da aplicação de zeína durante o fechamento de lesões no dorso. (A-D) Imagens representativas

das lesões após 7 dias em animais controles que não receberam FTY720 mas foram imunizados com salina ou zeína respectivamente; e animais que receberam três doses de FTY720 e foram imunizados com salina ou zeína. (E) Gráfico mostra área da lesão no dia 7 pós lesão. * representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos demais grupos. Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

A análise qualitativa das lâminas coradas em H&E (Figura 19) mostrou que os animais que receberam as doses do fármaco (Salina FTY720 e Zeína FTY720), apresentaram extensa área da lesão e tecido de granulação. O tecido estava tomado por um grande número de células inflamatórias (setas vermelhas), com predominância de neutrófilos e monócitos. Vale ressaltar que observamos também a presença discreta de linfócitos. Os animais que receberam FTY720, destacando o grupo Zeína FTY720, apresentaram fibroblastos com características morfológicas de intensa ativação (setas amarelas), com núcleo grande, arredondado, cromatina descondensada, permitindo a visualização do nucléolo. A análise quantitativa do infiltrado inflamatório nos mostra que a administração de FTY720 promoveu aumento de leucócitos, assim como observado nos animais salina controle (Figura 19E). O número de fibroblastos dos animais FTY720 também estava aumentado, dando destaque para o grupo zeína FTY720 que apresentou diferenças estatísticas com o grupo salina controle e zeína controle (Figura 19F).

Além disso, os fibroblastos do grupo salina FTY720 apresentavam tamanho maior e citoplasma vesicular quando comparamos com os fibroblastos dos animais controle Salina. Já os fibroblastos dos animais zeína FTY720 apresentavam-se estrelados assim como observamos no grupo zeína. E mais, os animais Zeína FTY720 apresentavam diversos pontos de hemorragia e grande número de vasos inseridos no leito ferida. Além disso, também pudemos observar que houve um prejuízo no que se refere ao fechamento da ferida, onde a grande maioria dos animais Zeína FTY720 não apresentavam o fechamento completo da ferida.

A coloração de Azul de Toluidina nos mostrou que a administração de FTY720 promoveu aumento do número de mastócitos assim como observado nos animais

salina controle. Esse aumento foi mais expressivo nos animais FTY720 que foram imunizados com Zeína (Figura 19G).

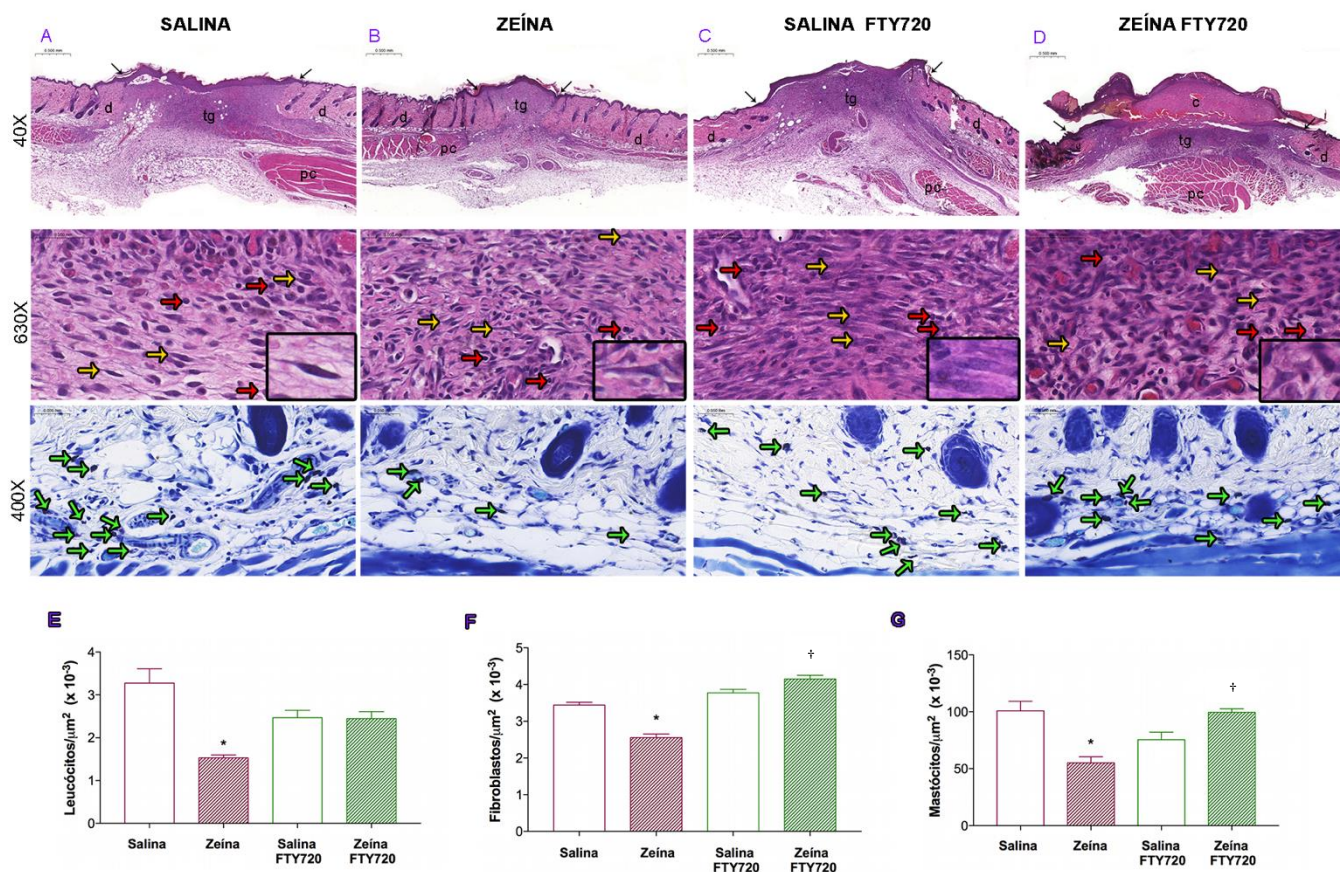


Figura 19.A administração de FTY720 promove atraso no reparo de lesões e impede os efeitos positivos da imunização com zeína na cicatrização da pele.

(A-D) Coloração histológica em H&E em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesões no dorso. As setas pretas nas micrografias em menor aumento indicam o local onde foi realizada a lesão e as letras pequenas representam: c, crosta; e, epiderme, tg, tecido de granulação; d, derme; pc, panículo carnososo. Em maior aumento (630x), as setas indicam leucócitos (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas). Painéis pretos nas imagens em aumento de 630x, destacam diferenças morfológicas dos fibroblastos. Nos painéis da terceira linha, a coloração histológica de Azul de Toluidina em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesão no dorso de camundongos, para análise de mastócitos (setas verdes). Barra de escala: painéis superiores, 500 μm ; painéis centrais, 200 μm ; painéis inferiores, 500 μm . Análises morfométricas de leucócitos (E) fibroblastos (F) e mastócitos (G). * representam

diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos demais grupos e † representa diferença significativa em comparação ao grupo salina FTY720. Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

5.7 Análise por imunofluorescência mostra que administração de FTY720 modifica o perfil de células imunes no leito da ferida.

Os dados encontrados na histologia, nos mostraram que os animais que receberam FTY720, independente se foram imunizados com salina ou zeína, apresentavam maior infiltrado de células no leito da ferida aos 7 dias após a lesão. Além disso, observamos também que essas células eram em grande parte compostas por neutrófilos e macrófagos. Utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, marcamos essas células com anticorpos específicos para leucócitos (anti-CD45), linfócitos (anti-CD3), macrófagos (anti-F480), neutrófilos (anti-Ly6G) e macrófagos alternativamente ativados, também conhecidos como macrófagos M2 (Anti-RELM).

Nossos resultados confirmaram o que observamos nas análises histológicas, pois os animais tratados com FTY720 tinham maior intensidade de fluorescência para CD45, F480 e Ly6G (Figura 20 A, C e D e Figura 21 C e D). Análise de macrófagos alternativamente ativados (M2) nos mostra que os animais zeína controle apresentam maior expressão dessas células quando comparadas aos demais grupos (Figura 20 E e Figura 21 B).

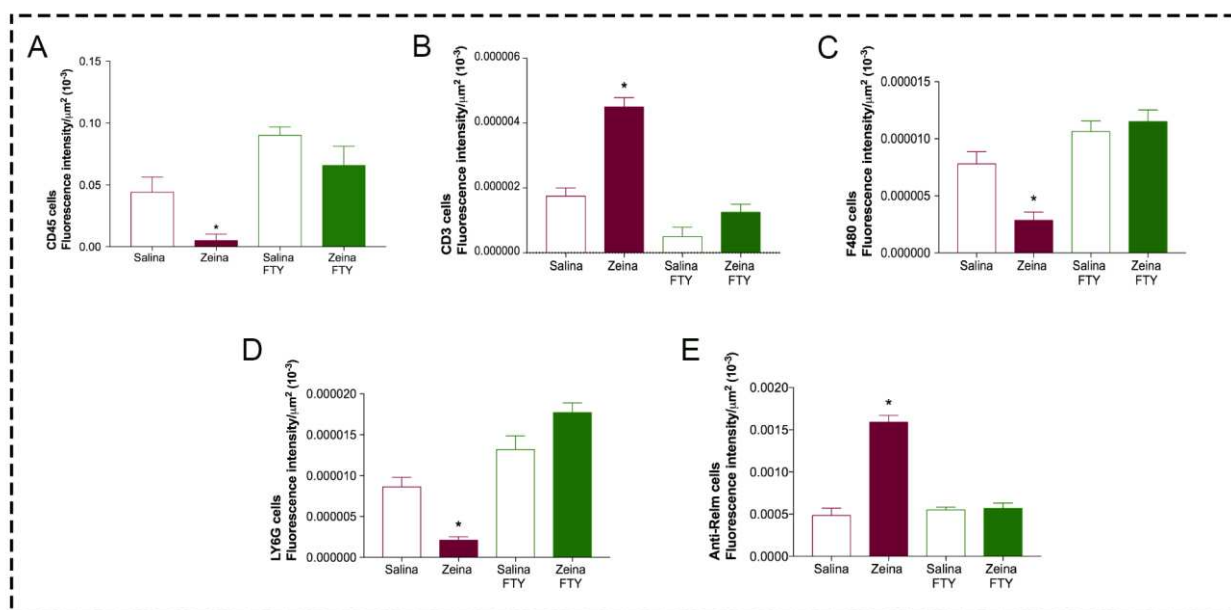


Figura 20. A administração de FTY720 modifica o perfil das células imunes no leito da ferida no dia 7 após a lesão. (A-E) Gráficos representativos da intensidade de fluorescência de fragmentos de pele no dia 7 após a realização das lesões marcados com anticorpos para leucócitos (CD45), linfócitos (CD3), macrófagos (F480), neutrófilos (Ly6G) e macrófagos alternativamente ativados – M2 (Anti-RELM) no leito da ferida.* representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos demais grupos. Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 6 animais.

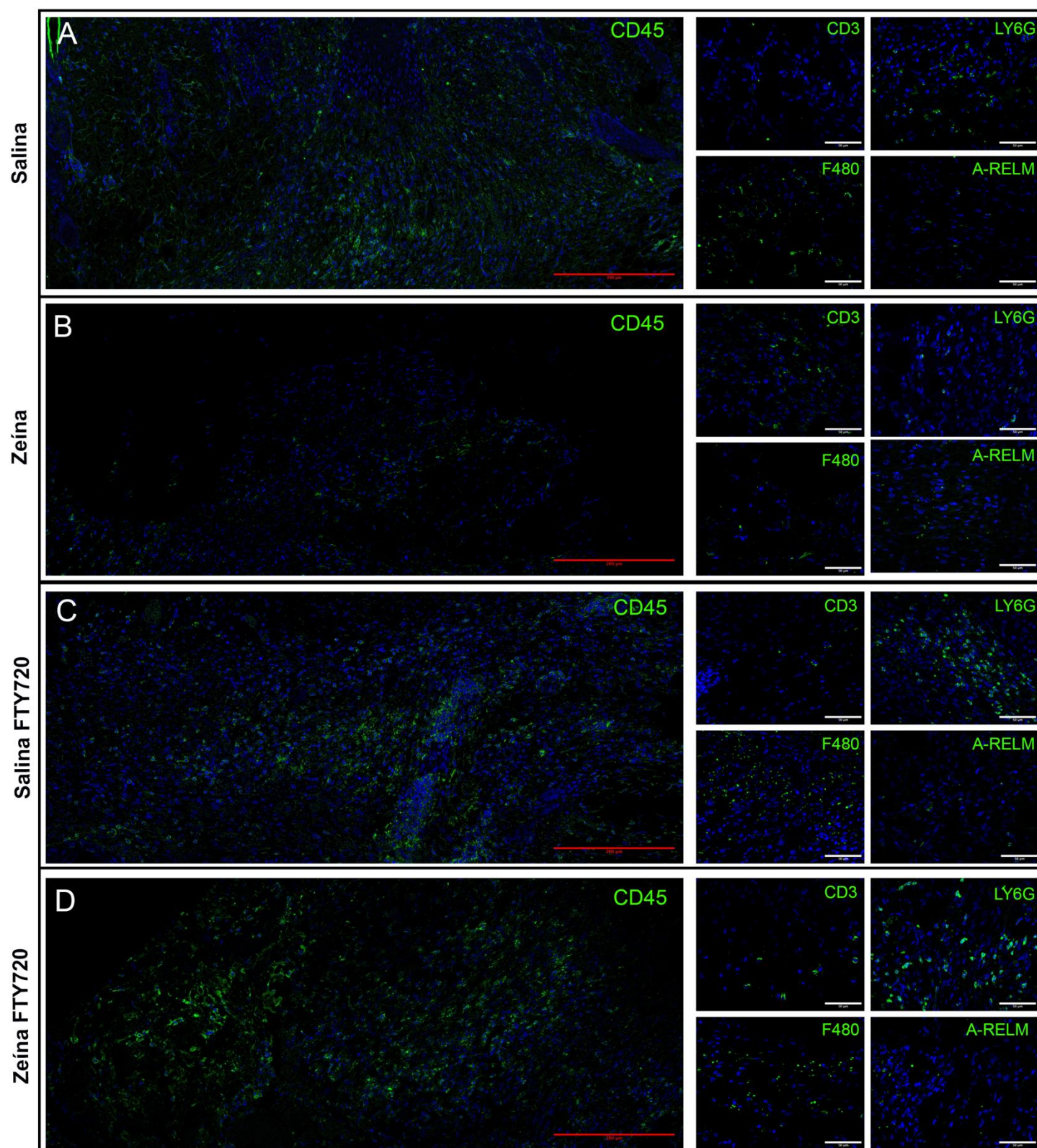


Figura 21. A administração de FTY720 modifica o perfil das células imunes no leito da ferida no dia 7 após a lesão. (A-D) imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti-CD45, anti-CD3 , anti-F4/80, anti-Ly6G e anti-

RELM e DAPI em feridas de pele coletadas 7 dias após as lesões para quantificação respectivamente de leucócitos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos e macrófagos M2.

5.8 Análise por imunofluorescência demonstra que a administração de FTY720 aumenta o número de miofibroblastos no leito da ferida e altera a sua forma.

Para verificar a presença de miofibroblastos no leito da ferida, utilizamos o marcador específico para α -actina de músculo liso (α -SMA). Nossos dados nos mostraram que os animais que receberam FTY720, independente se foram imunizados com salina ou zeína (Figura 22, 23E e G), apresentavam maior intensidade de fluorescência do que os animais controle. E mais, corroborando com os resultados observados previamente na histologia, os miofibroblastos dos animais FTY720 se apresentavam maiores (Figura 22 F e H) do que os do grupo salina (Figura 22 B), onde seus miofibroblastos se apresentavam mais finos e alongados. Já os animais tolerantes a proteína zeína, tiveram menor intensidade de fluorescência e os seus miofibroblastos apresentavam características morfológicas mais estreladas como também observamos na histologia com H&E. (Figura 22 e 23 C e D)

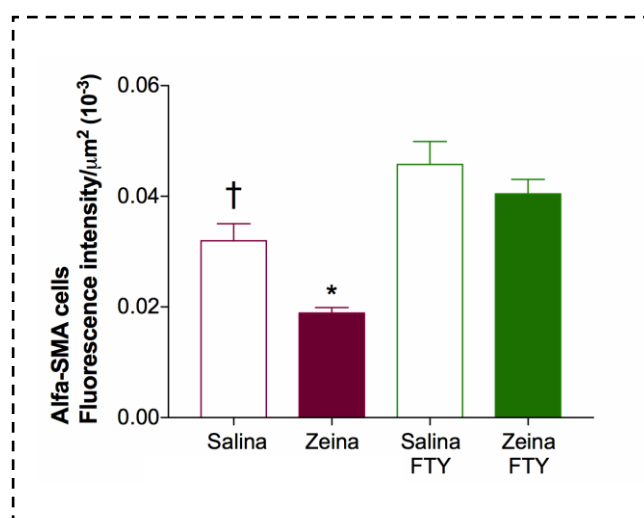


Figura 22. A injeção de zeína reduz o número de miofibroblastos em animais controle mas não em animais que receberam FTY720. (A-E) Gráficos representativos da intensidade de fluorescência de fragmentos de pele no dia 7 após a realização das lesões marcados com anticorpos para α -SMA. * representam

diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos demais grupos. Os dados representam a média $\pm$ SEM. $n = 6$ animais.

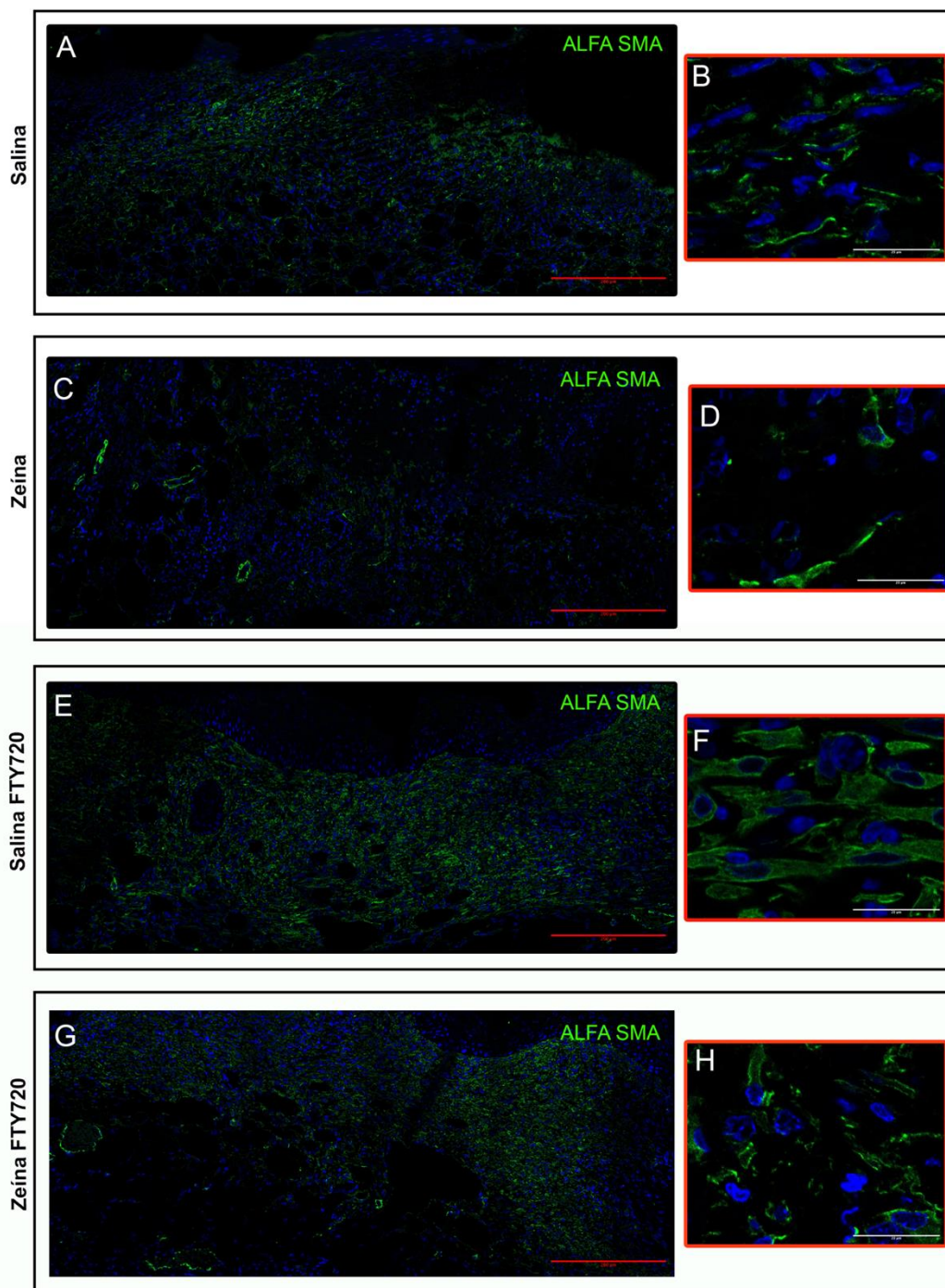


Figura 23. A injeção de zeína reduz o número de miofibroblastos em animais controle mas não em animais que receberam FTY720. (A,C,E e G) imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti α -SMA e DAPI em fragmentos de pele contendo a ferida coletadas 7 dias após as lesões para quantificação da proteína α -actina de músculo liso, expressa em miofibroblastos no

leito da ferida; escala de barra 200 μ m. (B,D, F e H) imagens representativas dos miofibroblastos em maior aumento, escala de barra 20 μ m.

5.9 A administração intraperitoneal de FTY720 modifica a deposição de colágeno 40 dias após lesões no dorso.

Para verificar o impacto da aplicação intraperitoneal de FTY720 na formação da cicatriz de animais com lesões no dorso, realizamos o protocolo padrão de aplicação do FTY720 (dias -2, 0 e 2), seguida de imunização e lesão no dorso (dia 0), porém esperamos 40 dias para a coleta das lesões. A análise macroscópica da área da cicatriz nos revela que os animais que receberam o FTY720, tiveram a formação de uma cicatriz muito mais evidente do que quando comparamos com os animais salina (Figura 24 A). Essa diferença se torna ainda mais perceptível, quando comparamos as cicatrizes dos animais FTY720 com os animais tolerantes a zeína, onde dificilmente vemos a cicatriz.

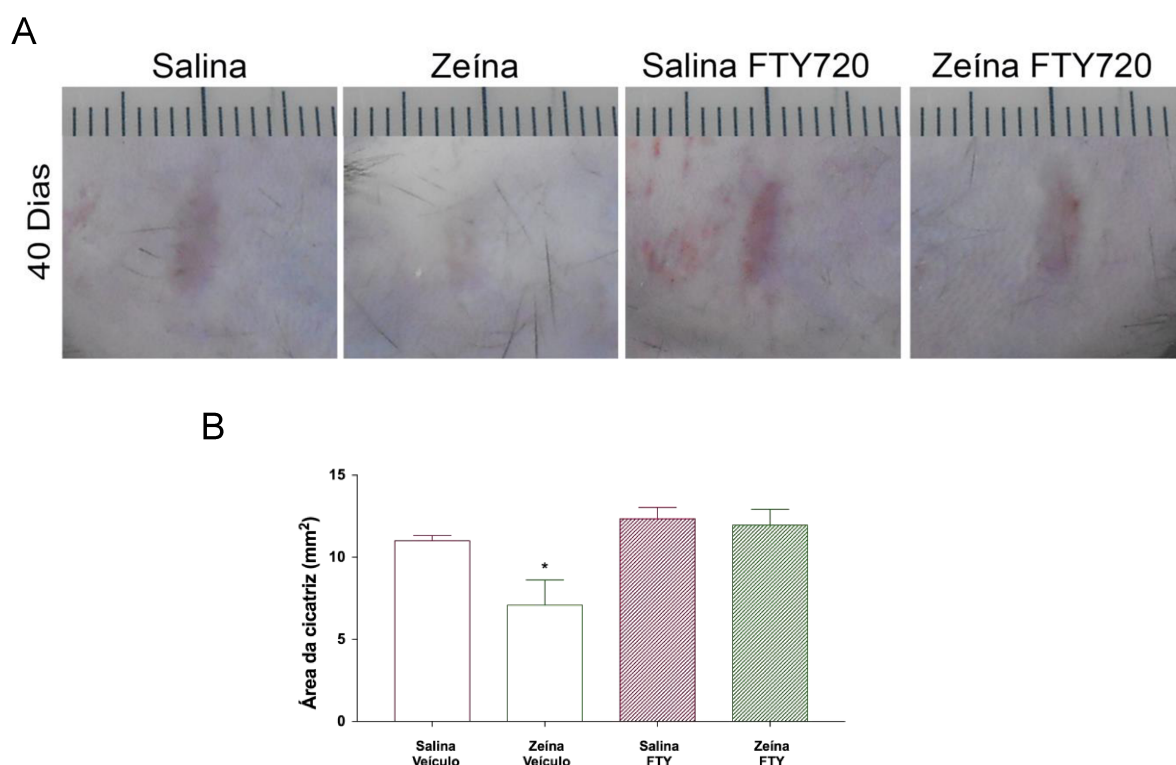


Figura 24. Injeção de zeína reduz a cicatriz do animal controle, mas não do animal tratado com FTY720. (A) Imagens representativas das cicatrizes 40 dias após

a lesão. (B) Gráfico mostra área das cicatrizes no dia 40 pós lesão. * representa diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos grupos salina, salina FTY720 e zeína FTY720.

Aos 40 dias pós lesão também fizemos análises microscópicas da deposição das fibras colágenas na área onde haviam sido feitas as lesões no dorso. Podemos observar que uma pele intacta (Figura 25 A) é constituída por fibras expeças de colágeno e estas por sua vez se orientam em diversos sentidos. Além disso, a pele intacta apresenta na coloração de Picrosirius Red, maior birrefringência vermelho – alaranjada, característico de fibras maduras.

Os animais tolerantes à proteína zeína (Figura 25 C), apresentam características de deposição de fibras mais espessas e dispostas em diversos sentidos além maturidade das fibras colágenas se apresentarem semelhantes ao que observamos na pele intacta, características estas que não observamos nos animais salina controle. No entanto, quando administramos o FTY720, observamos que a deposição de colágeno desses animais está prejudicada pois não observamos a formação de feixes de fibras, mas sim de uma “massa” compacta de colágeno (Figura 25 D e E). A coloração de Picrosirius nos animais FTY720 nos mostra uma predominância da birrefringência amarela – esverdeada, o que indica a predominância de fibras mais imaturas, com maior intensidade nos animais salina FTY720 do que nos animais zeína FTY720.

Apesar da deposição das fibras colágenas se apresentarem alteradas nos animais zeína FTY720, não pudemos deixar de notar ao compararmos este grupo com o grupo zeína controle, que ambos apresentam semelhanças na intensidade do azul e também na prevalência da birrefringência vermelho -alaranjada.

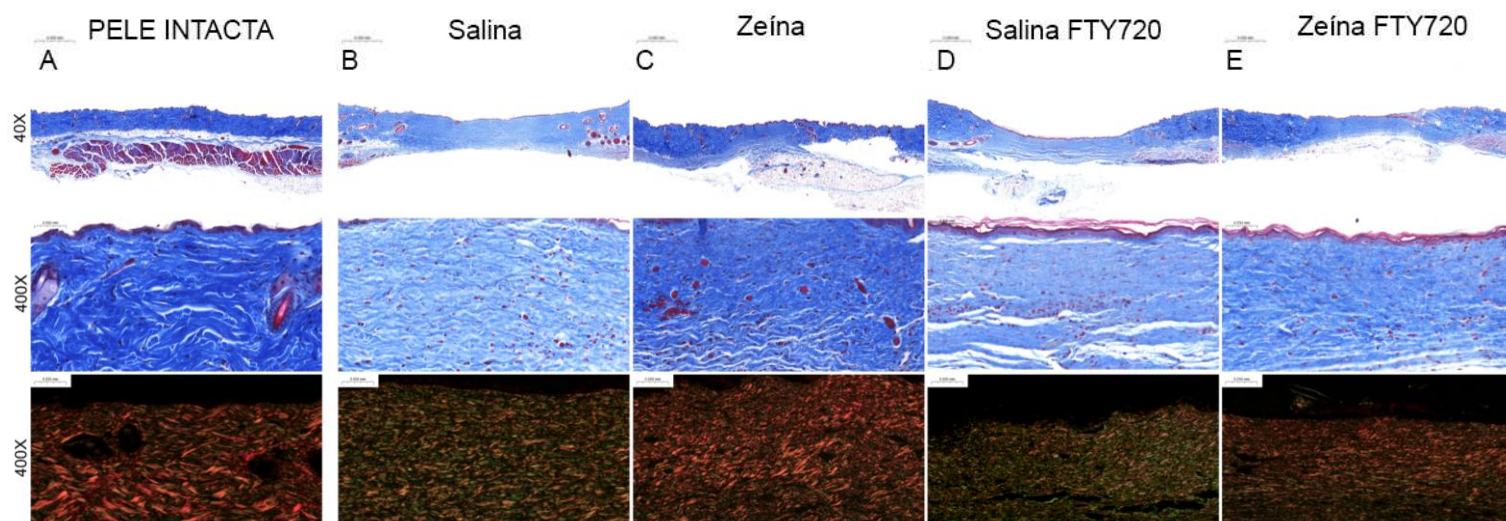


Figura 25. Injeção de zeína melhora o remodelamento de colágeno da pele de animais controle, mas não de animais tratados com FTY720. Coloração histológica com Tricômico de Masson (primeira e segunda linha) e Picrosirius Red (terceira linha), em fragmentos de pele coletados 40 dias após a realização das lesões no dorso. Tricômico de Masson para análise da deposição de colágeno e Picrosirius Red para avaliação da maturidade das fibras.

Parte III – Avaliação do efeito da reconstituição de linfócitos nos animais RAG no reparo de lesões

Uma vez que os animais RAG KO podem ser reconstituídos de linfócitos através da transferência de células do baço de animais WT e que a tolerância oral pode ser adotivamente transferida com células do baço de animais tolerantes, nos perguntamos se a transferência de células de animais WT para os animais RAG KO poderia alterar a cicatrização da pele e o efeito positivo da injeção de zeína.

5.10 A injeção de zeína em animais RAG KO reconstituídos de linfócitos reduz a área da ferida.

De acordo com os nossos resultados, podemos observar que a ausência dos linfócitos interfere de forma negativa para o fechamento da feridas, sejam em animais

RAG KO ou em animais injetados com FTY720, prejudicando o reparo final da cicatriz. Decidimos investigar se a transferência de linfócitos provenientes do baço de animais WT para animais RAG KO seria capaz de reconstituir essas células nos animais receptores e também se acarretaria alguma influência no reparo de lesões do dorso. Inicialmente realizamos citometria de fluxo do baço de animais imunizados com salina, reconstituídos de células e não reconstituídos, para verificar se os linfócitos seriam detectados ou não. O resultado da citometria nos mostrou a presença tanto de linfócitos TCD4⁺ quanto de linfócitos TCD8⁺ no baço dos animais reconstituídos, o que não foi observado nos animais controle que não receberam essas células denominados como salina controle, 10 dias após a transferência (Figura 26 A-C).

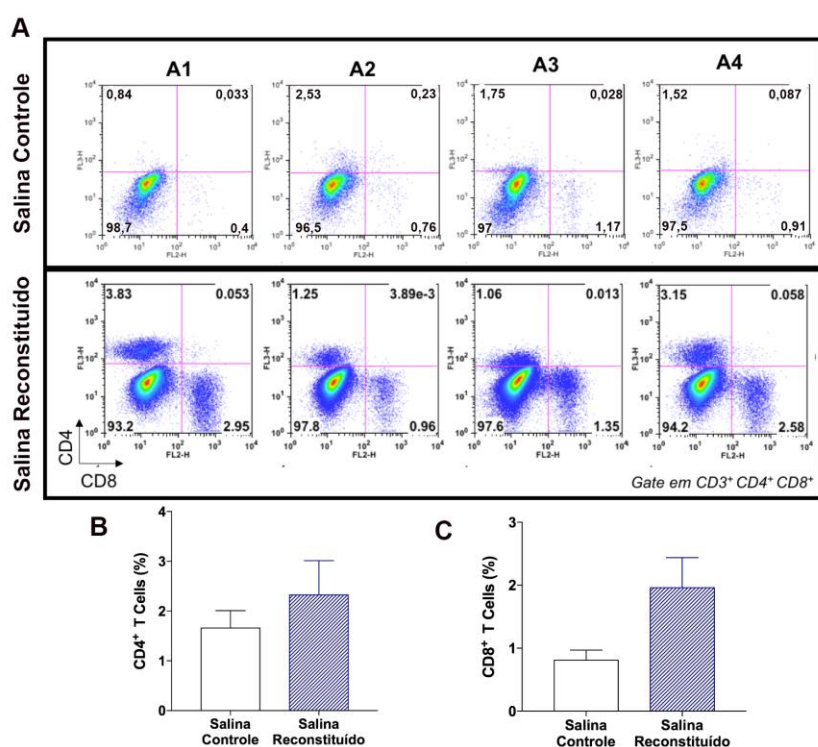


Figura 26. A transferência de linfócitos promoveu reconstituição dessas células no baço de animais RAG KO. (A) Gráficos representativos obtidos por citometria de fluxo do baço coletado 10 dias após a transferência de células. Células marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. (B-C) Gráficos representam a porcentagem de linfócitos. Os dados representam a média $\pm$ SEM. n= 4 animais.

A análise macroscópica da ferida nos mostra que os animais RAG KO Reconstituídos (RAG KO-R) apresentaram redução da área da lesão quando

comparados com os animais RAG KO que não receberam células dos doadores. Essa redução não se equipara ao que observamos nos animais WT, principalmente nos animais zeína, mas ainda assim podemos afirmar que a transferência de linfócitos para animais RAG KO- R teve um efeito positivo no fechamento da lesão (Figura 27), como representado no gráfico através da medida em mm². Esse efeito positivo observado ainda é mais evidente quando comparamos os animais RAG KO-R imunizados com salina e zeína, onde os animais que receberam a proteína tolerada depois da reconstituição de linfócitos, tiveram maior redução da área da lesão do que o grupo salina controle.

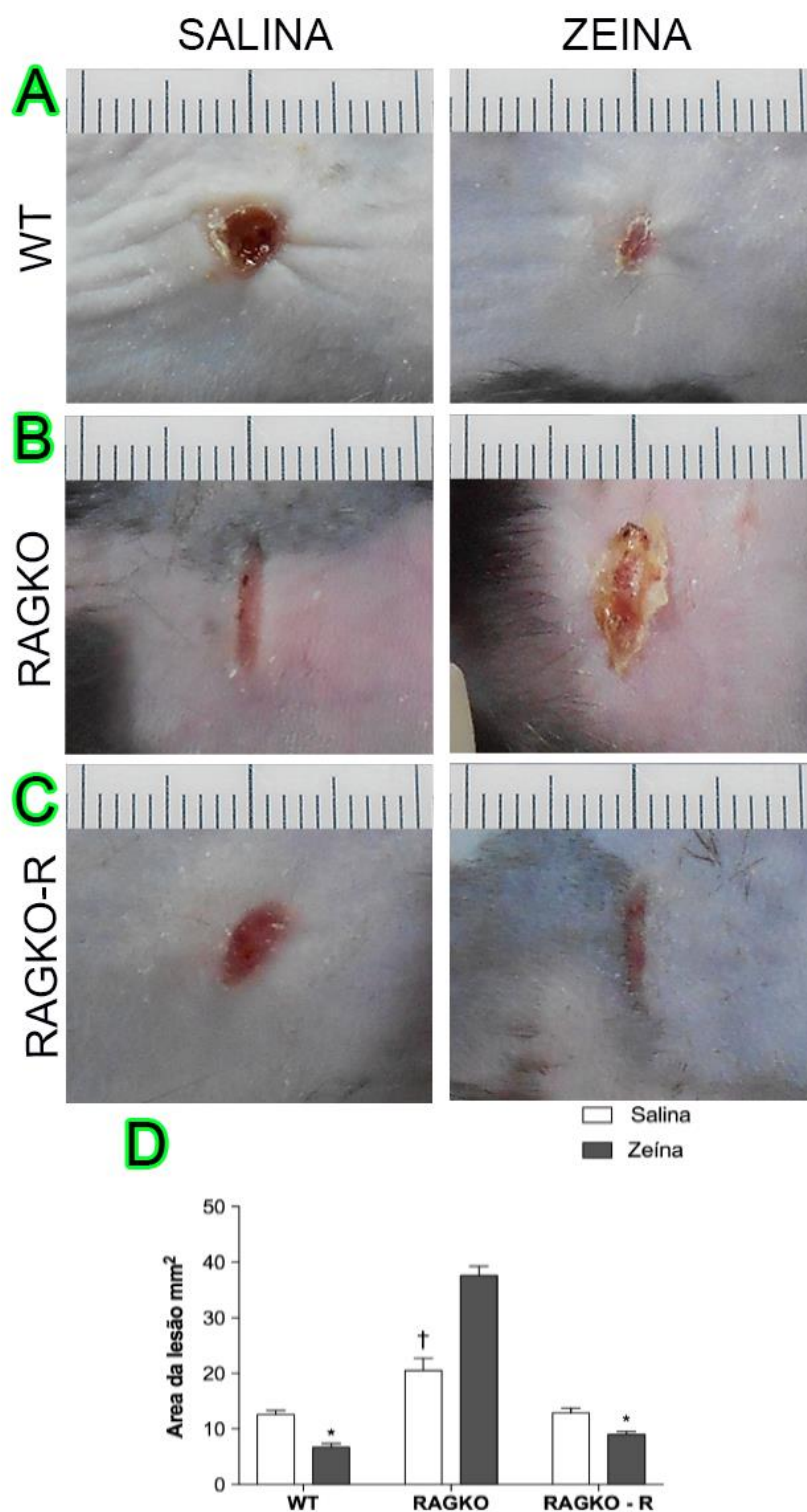


Figura 27. A injeção de zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz a área das lesões. (A-C) Imagens representativas das feridas de animais com linfócitos (WT), sem linfócitos (RAGKO) e animais reconstituídos de linfócitos (RAG KO -R) após 7 dias da realização. (D) Gráfico mostra área das lesões em mm² após 7 dias da

realização. * representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos grupos salina e † em comparação ao grupo zeína.

5.11 A imunização com zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz o número de fibroblastos e mastócitos no leito da ferida.

Como vimos anteriormente, a reconstituição de linfócitos em animais RAG KO teve um impacto positivo no fechamento das lesões, principalmente nos animais reconstituídos imunizados com a proteína tolerada zeína. Com isso, partimos então para as análises microscópicas destes animais utilizando as colorações de H&E e Alcian Blue + Safranina para avaliar o infiltrado de células no leito da ferida como, os leucócitos, os fibroblastos e mastócitos. Podemos observar na figura 28 (F e G), que os animais RAG KO-R imunizados com zeína, apresentaram redução da área onde foi feita a lesão, indicado pelas setas pretas, além de redução da extensão do tecido de granulação, quando comparamos com os animais zeína RAG KO, que não receberam linfócitos de animais doadores. Essas características observadas nos animais RAG KO-R não são tão intensas como podemos observar nos animais zeína WT, mas nos indicam que os linfócitos transferidos tiveram ação positiva no controle da formação do tecido de granulação.

Algo que nos chamou muita atenção quando observamos o infiltrado de células em maior aumento, (Figura 28 H – M), foi que os animais que foram reconstituídos, independente se foram imunizados com salina ou zeína, não apresentavam mais o infiltrado de neutrófilos que é tão evidente nos animais RAG KO. Além disso, podemos encontrar mais linfócitos pelo tecido de granulação, nos indicando que essas células migraram para o local da ferida (Figura 28 J-M). Observamos também que os animais apresentavam redução do números de fibroblastos e principalmente de mastócitos como representados na figura 28 S e também pelos gráficos da Figura 29.

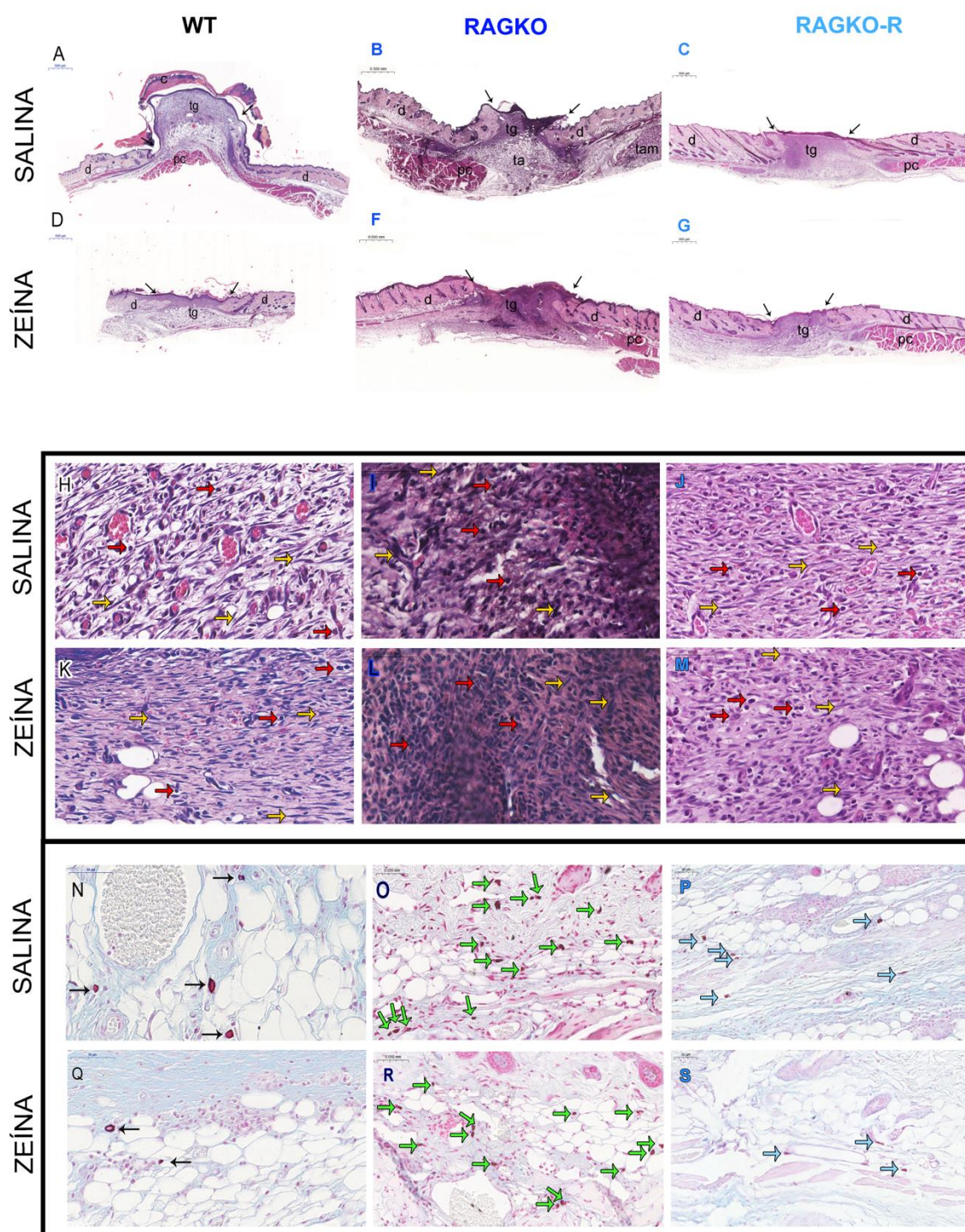


Figura 28. A imunização com a proteína tolerada zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz a área do tecido de granulação, o número de fibroblastos e mastócitos. (A-G) Coloração histológica em H&E em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesões no doso. As setas pretas em menor aumento indicam o local onde foi realizada a lesão e as letras pequenas representam: c, crosta; e, epiderme; tg, tecido de granulação; ta, tecido adiposo; tam, tecido adiposo marrom; d, derme; pc, panículo carnos. (H-S) Painéis em maior aumento (630x) indicam

leucócitos (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas) e mastócitos (setas pretas e verdes) em animais WT, RAG KO e RAG KO-R. Barra de escala: (A-F) 500µm; (G-R) 50µm.

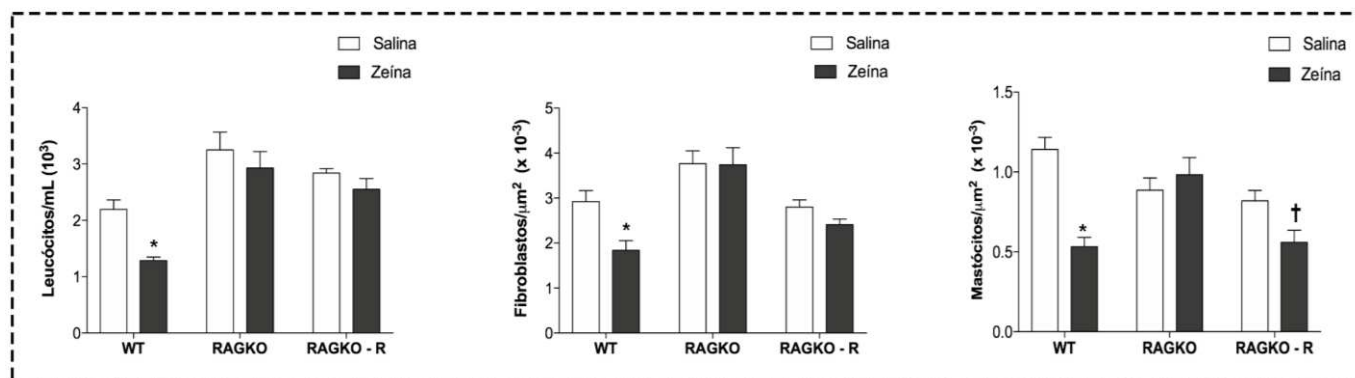


Figura 29. A imunização com a proteína tolerada zeína em animais RAG KO reconstituídos reduz o número de fibroblastos e mastócitos no leito da ferida. Gráficos representam a morfometria das células inflamatórias na área das lesões após 7 dias. * e † representam diferença significativa ($P \leq 0,05$) em comparação aos grupos salina.

6 DISCUSSÃO

As feridas na pele geram um imenso impacto negativo nos sistemas de saúde e na economia no mundo todo. Devido às terapias ineficazes, os custos gerados para tratamentos de feridas aumentam a cada ano. (RAZIYEVA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2019). A falta de terapias eficazes pode ser justificada pelo fato do processo de cicatrização de feridas ser considerado um processo altamente complexo, pois envolve a participação de diversos tipos celulares e mediadores químicos. Portanto intervir de maneira eficaz para assim alcançar um bom reparo, têm sido um grande desafio para os pesquisadores.

As células e fatores imunológicos que constituem a pele, são os principais atores e reguladores durante a cicatrização de feridas agudas (RAZIYEVA et al., 2021). Devido ao intenso envolvimento do sistema imunológico durante o reparo, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias que intervenham nas interações entre células inflamatórias e os demais componentes teciduais, com o objetivo de alcançar melhores resultados para o tratamento de feridas. Através da tolerância oral pode-se interferir e promover alterações sistêmicas anti-inflamatórias nos indivíduos acometidos por lesões na pele. Ademais, este fenômeno pode nos ajudar a compreender melhor a interação entre as células imunes residentes e as células imunes que chegam no sítio inflamatório, além de nos permitir compreender como estas células influenciam e atuam sob os componentes teciduais conduzindo o reparo para um perfil pro-regenerativo ou não. Nosso grupo já demonstrou, através da utilização de diferentes modelos inflamatórios, que os efeitos indiretos da tolerância oral têm repercussão sistêmica e modificam a resposta imunológica de tal forma que não se observa inflamação exacerbada, acarretando num melhor reparo tecidual com redução da cicatriz e melhora na deposição de colágeno (CANTARUTI et al., 2017b; COSTA et al., 2011, 2016).

Vários estudos têm demonstrado que a administração oral de antígenos é uma das formas mais eficazes de induzir a diferenciação de linfócitos T e promover o estado de tolerância (GUERRA et al., 2021). A participação desta célula no processo de reparo de feridas na pele ainda é muito controverso. Alguns autores relatam que os linfócitos são abundantes na pele ferida, mas podem não ser necessários nem

suficientes para a cicatrização, pois as feridas cicatrizam mais rapidamente em camundongos nude -nus atímicos (que não possuem células T) e na pele fetal (que é relativamente pobre em linfócitos) (BOOTHBY; COHEN; ROSENBLUM, 2020). Em contrapartida, também é possível encontrar na literatura trabalhos que relatam a participação dos linfócitos T na ativação de outras células e secreção de mediadores pró inflamatórios, participando de forma ativa na recuperação da homeostase após lesões (LI et al., 2018; XU et al., 2017). É importante ressaltar que os estudos de cicatrização de feridas na pele de camundongos nude-nus foram feitos utilizando o modelo de feridas incisionais, com cicatrização por primeira intenção, onde não ocorre muita perda tecidual e as bordas das feridas são aproximadas através da utilização de cliques metálicos. Além disso, os camundongos nude-nus apesar de serem atímicos, apresentam uma população de linfócitos T extratímicos e linfócitos B, que podem interferir no processo de reparo.

Um trabalho recente do nosso grupo investigou se os efeitos indiretos da tolerância oral à proteína zeína seria capaz de melhorar o reparo de feridas excisionais em camundongos nude (Balb/c Foxn1^{-/-}). Os resultados deste trabalho elucidaram que houve alterações na resposta inflamatória destes animais, de forma mais branda do que observada em animais tolerantes WT. Esses dados nos indicam que a ausência de linfócitos tímicos altera, mas não impede, a ocorrência dos efeitos indiretos da tolerância oral, e que os efeitos observados podem ter sido por ação dos linfócitos extratímicos (Keylla Ribeiro de Almeida, dissertação de mestrado, UFMG 2022).

Como demonstrado por Richman e colaboradores em 1978, é possível transferir o estado tolerante através da transferência adotiva de células T do baço para animais receptores irradiados, mesmo sem estes nunca terem tido contato prévio com a proteína tolerada. Este fato demonstra a participação ativa dos linfócitos T para que a tolerância oral seja instaurada no organismo do indivíduo, no entanto, não se sabe ainda os mecanismos moleculares pelos quais isso ocorre. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que animais tolerantes à proteína zeína, quando imunizados até 5 dias antes das realizações de lesões no dorso, apresentam um melhor reparo da lesão na pele com aumento do número de linfócitos T no leito da ferida, assim como redução dos aspectos inflamatórios (FRANCO-VALENCIA et al.,

2022b). No entanto, os mecanismos pelos quais a interação entre os linfócitos T e as outras células que compõe o tecido ainda não foram elucidados.

No presente estudo, buscamos elucidar a participação dos linfócitos no processo de reparo de feridas excisionais feitas em animais tolerantes a proteína de zeína. Para isso, a utilização dos animais RAG KO foi de extrema importância tendo em vista que esses animais não possuem nenhum tipo de linfócito, o que permitiu a melhor compreensão do papel dessas células para o estabelecimento da tolerância e a sua participação no processo de reparo de feridas na pele.

Os animais RAG KO imunizados com a proteína tolerada de zeína não foram capazes de redirecionar as respostas imunes de maneira a reduzir os aspectos inflamatórios e otimizar o reparo tecidual. Esse dado confirma a importância dos linfócitos para a ocorrência do estado de tolerância e consequentemente reduzir a inflamação. Como já demonstramos em trabalhos anteriores utilizando animais WT, submetidos aos mesmos protocolos de injeção de zeína os animais WT que receberam injeção de zeína apresentaram menor área de tecido de granulação, menor número de células inflamatórias, maior número de linfócitos no leito na ferida e deposição de colágeno de forma mais parecida com a pele normal (FRANCO-VALENCIA et al., 2022a). Diferentes subconjuntos de linfócitos T e B, além de células inatas estão envolvidas no processo de cicatrização de feridas normais e diabéticas. Em condições de imunossupressão sistêmica, podem haver prejuízos ainda maiores para o fechamento das lesões (SERAPHIM et al., 2020).

As análises macroscópicas das lesões dos animais RAG KO mostraram atraso no fechamento, principalmente quando comparamos as lesões dos animais de zeína RAG KO com as lesões dos animais também imunizados com a proteína tolerada, porém com linfócitos. E não foi somente o atraso no fechamento que podemos destacar, mas também o tamanho dessas feridas que eram maiores quando comparadas com as feridas dos animais WT. A ausência de linfócitos pode estar influenciando para este atraso na formação do novo epitélio pois os animais RAG KO não possuem os linfócitos $T\gamma\delta$ residentes da epiderme. Este subtipo de linfócitos têm participação ativa na proliferação dos queratinócitos através da secreção de fatores de crescimento como fator de crescimento de queratinócitos (KGF e KGF2) e fator de

crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1) que juntos promovem reepitelização da ferida. Quando não há a liberação desses fatores de crescimento derivados dos linfócitos T $\gamma\delta$, observa-se a intensa apoptose dos queratinócitos. (PIIPPONEN; LI; LANDÉN, 2020).

Nossos estudos foram realizados utilizando o adjuvante hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), principal adjuvante licenciado para uso humano a mais de 70 anos. Como já demonstramos em trabalhos anteriores, a associação da proteína zeína ao $\text{Al}(\text{OH})_3$ em animais que se alimentaram previamente da proteína tolerada, promoveu um melhor reparo de feridas cutâneas de animais WT, porém seu uso não associado a proteína tolerada, exacerbou ainda mais a inflamação (CANTARUTI et al., 2017b; FRANCO-VALENCIA et al., 2022a). Os adjuvantes são componentes indispensáveis das vacinas pois estimulam respostas imunes a antígenos sendo capazes de reter o antígeno por mais tempo no local onde houve a imunização. Isso faz com que o antígeno seja liberado lentamente, aumentando a sua imunogenicidade e como consequência promove uma potente ativação local das respostas imunes (LEE; SURESH, 2022). Nossos dados com animais RAG KO mostraram que estes também apresentaram características de intensa inflamação e isso inclui os animais que receberam a injeção da proteína zeína. Podemos sugerir que a zeína nos animais sem linfócitos não gera nenhum efeito positivo pois estes animais não se tornam tolerantes. Já é bem descrito que os antígenos associados aos adjuvantes promovem apresentação por células dendríticas via MHC-II e estas por sua vez ativam os linfócitos T para gerar as respostas imunes adequadas. No caso dos animais RAG KO está ativação não acontece e o adjuvante por si só pode desencadear a liberação de DAMPs, como ácido úrico e alarminas que irão promover a exarcebação das respostas imunológicas (LEE; SURESH, 2022). E mais, como já relatado anteriormente os efeitos sistêmicos da tolerância oral são dependentes da presença de linfócitos (CUNHA et al., 2009). No caso dos animais RAG KO, por não possuírem tais células, mesmo se alimentando previamente da proteína tolerada e posteriormente sendo imunizados com a mesma em adjuvante, a proteína tolerada não vai gerar nenhum efeito imunomodulador.

Durante a fase inicial do processo de reparo de feridas, mediadores locais são liberados para atrair células imunes para o sítio inflamatório. A cinética de migração

dessas células já é bem descrita na literatura, portanto qualquer alteração nesse processo torna-se evidente. Nossos dados com animais RAG KO nos indicam que houve uma alteração nessa cinética tendo em vista que observamos células que deveriam ter entrado em apoptose por volta do 3º dia pós lesão, ainda presentes, como os neutrófilos por exemplo.

Como já citado anteriormente, os neutrófilos são as primeiras células a chegar no sítio inflamatório e sua atividade está diretamente relacionada com a manutenção da inflamação e o aumento do estresse oxidativo tecidual durante os estágios iniciais. Os neutrófilos apoptóticos fornecem sinal para resolução da inflamação através da expressão de receptores que ao se ligarem em seus ligantes, esgotam moléculas inflamatórias. Além disso a ingestão de neutrófilos apoptóticos leva os macrófagos pró-inflamatórios a adotarem um fenótipo anti-inflamatório e reparador. Portanto, a permanência dos neutrófilos no ambiente inflamatório leva a uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) associada a uma infiltração prolongada de macrófagos pró-inflamatórios, função prejudicada de fibroblastos dérmicos e queratinócitos na área da ferida, dano celular e cicatrização prejudicada. Além disso, estudos demonstram que animais RAG KO apresentam níveis aumentados de ROS em resposta a cicatrização de feridas (ANDRÉ-LÉVIGNE et al., 2017; LINDSEY; BECIROVIC-AGIC, 2023; PITOCCHO et al., 2013). Com isso, podemos concluir que o aumento dessas células e sua permanência por um período prolongado no local da lesão, como observamos nos animais RAG KO, gera um ambiente altamente pró inflamatório e agudo, que vai influenciar de maneira negativa no processo de cicatrização de feridas.

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que os animais tolerantes a zeína apresentam menor atividade de neutrófilos um dia após a realização das lesões. Essa atividade foi medida através da análise da presença da enzima mieloperoxidase (MPO) nas feridas coletadas (FRANCO-VALENCIA et al., 2022a). Esse dado nos mostra que os animais tolerantes são capazes de controlar a inflamação desde a fase inicial. Este controle é de extrema importância para que não ocorra a manutenção de um ambiente pró-inflamatório, fator este determinante para que reparo gere cicatrizes com padrões não desejáveis.

Não são apenas as células do sistema imunológico que servem como parâmetro para indicar se o reparo de uma ferida vai seguir para um reparo inadequado do ponto de vista funcional e estético. Existem outros componentes no tecido que são de extrema importância para deliberar o resultado final do processo de cicatrização. Os fibroblastos são um exemplo disto, pois são células importantes na reparação tecidual e desempenham um papel considerável em todas as fases da cicatrização de feridas (MONIKA et al., 2021). Nossos dados mostraram que os animais RAG KO, de todos os grupos, apresentaram alto número de fibroblastos no leito da ferida, números estes similares aos observados nos animais salina e adjuvante WT. Também podemos observar através da marcação de α -actina de músculo liso sintetizada pelos miofibroblastos, que todos os animais RAG KO tinham intensa presença deste marcador. A ativação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos produtores de colágeno e positivos para α -actina de músculo liso contrátil resulta na formação de tecido de granulação rico em colágeno, que fornece resistência à tração da ferida em cicatrização. Embora a deposição de colágeno seja uma parte necessária e reversível da cicatrização de feridas, a ativação dos miofibroblastos pode resultar no acúmulo excessivo de matriz extracelular e no desenvolvimento progressivo de fibrose dérmica irreversível (NISSINEN; KÄHÄRI, 2023). Estudo de medicina regenerativa demonstrou pela primeira vez em mamíferos, nos chamados ratos espinhosos africanos (*Acomys*), a capacidade de autotomia da pele seguida de regeneração, incluindo a regeneração dos apêndices da pele. Importante ressaltar que os ratos *Acomys* não expressam nenhum fibroblasto positivo para α -actina de músculo liso (SEIFERT et al., 2012).

Os dados com animais RAG KO nos mostraram que a ausência de linfócitos tem um impacto negativo para o processo de cicatrização de feridas. Com isso nos perguntamos quais seriam os linfócitos que estariam atuando durante o processo de cicatrização de feridas na pele. Seriam os linfócitos circulantes que migram para o local da inflamação ou poderiam ser os linfócitos residentes da pele localizados na região dos folículos pilosos e também os linfócitos intradérmicos, chamados de linfócitos $T\gamma\delta$.

Para responder a essas perguntas, utilizamos o fármaco imunossupressor Fingolimode, mais conhecido como FTY720, que tem como principal mecanismo de ação reter a saída de linfócitos circulantes nos órgãos linfoides secundários, impedindo então que estas células migrem para sítios inflamatórios quando necessário.

Nossos dados nos mostraram que os linfócitos residentes da pele não são capazes por si só de modular a resposta inflamatória gerada pelas lesões no dorso. Fazemos essa afirmação pois observamos nos animais que receberam o FTY720 um atraso significativo na formação de uma nova epiderme, assim como na deposição inicial de uma nova matriz. Além disso, estes animais apresentaram um extenso infiltrado de células inflamatórias com a presença marcante de neutrófilos, assim como já havíamos observado nos animais RAG KO. Esses dados nos levam a sugerir que os linfócitos circulantes, ativados nos linfonodos, e que migram para o sítio inflamatório, têm influência direta na permanência de células que promovem a inflamação por mais tempo no tecido, na proliferação dos queratinócitos responsáveis pelo fechamento da ferida e na deposição inicial de colágeno.

Em 2016, Wai Sun e colaboradores demonstraram que a aplicação epicutânea de FTY720 na pele de camundongos e pele humana desafiada por histamina e alérgenos, atenuou o recrutamento de neutrófilos e a migração de leucócitos (SUN et al., 2016). Em outros contextos o FTY720 também teve efeitos positivos como demonstrado por Gabriela Nores e colaboradores em 2018, que utilizaram o FTY720 para controlar o desenvolvimento de uma doença chamada linfedema no qual os linfócitos T CD4⁺ têm papel crucial para o desenvolvimento da fisiopatologia (GARCÍA NORES et al., 2018). Os diferentes efeitos do imunossupressor podem ser dependentes da via de aplicação, da dose, do momento em que ocorre a aplicação e até mesmo dependente do modelo inflamatório estudado. Em doenças autoimunes e até mesmo em inflamações alérgicas, o FTY720 pode promover um ambiente linfopênico desejado nessas situações. No caso de cicatrização de feridas excisionais, é necessário que essas células participem de maneira não exacerbada, mas ainda sim sua presença é de vital importância para que o fechamento da pele ocorra e que novo tecido seja formado. Portanto, impedir que essas células cheguem ao local da inflamação influencia de forma negativa para o reparo de feridas excisionais.

Esses resultados nos mostraram que a aplicação de FTY720 prejudicou o reparo de feridas na pele, com isso nos perguntamos se a imunização com a proteína tolerada zeína seria capaz de reverter esse cenário. Ou, se os efeitos indiretos da injeção de proteínas toleradas podem ocorrer mesmo com a inibição da recirculação dos linfócitos.

De acordo com o que observamos, a imunização com zeína não gerou efeitos positivos em modular os aspectos inflamatórios por nós analisados, pois os animais injetados com FTY720, independente da imunização que receberam, apresentaram reepitelização incompleta e características de intensa inflamação.

Outro ponto que chamou bastante atenção nos animais que receberam o FTY720, foi relacionado a morfologia dos fibroblastos na pele inflamada. Quando comparamos os fibroblastos dos animais que não receberam injeção de FTY720 com os animais que receberam o fármaco, imunizados com salina, observamos que essas células apresentaram características típicas de quando estão em intensa atividade, como citoplasma abundante, núcleo ovóide, grande e fracamente corado, com cromatina fina e nucléolo proeminente. Em 2019, Karen Franco e colaboradores demonstraram que os fibroblastos de animais tolerantes a proteína zeína, apresentavam características de ativação com formato mais estrelado quando comparados aos animais controle Salina, cujos fibroblastos se mantem finos e alongados.

A variação da morfologia do fibroblasto observada nos animais salina FTY720 indica que essas células são influenciadas por diferentes contextos inflamatórios, tendo em vista que estão sob influencia de uma variedade de outros tipos celulares que podem modular o perfil de ativação dos fibroblastos durante a cicatrização de feridas na pele. Os fibroblastos representam uma população extremamente diversificada de células com origens embrionárias distintas e funções heterogêneas. Essa diversidade de possibilidades evidencia a quão complexo pode ser papel destas células na saúde e na doença (WOODLEY; LAMBERT; ASECIO, 2022). Apesar dos animais zeína FTY720 apresentarem aspectos inflamatórios exacerbados, a alteração na morfologia dos fibroblastos neste grupo não foi tão evidente, se assemelhando mais aos observado no grupo zeína controle. Serão necessários mais estudos para verificar se seriam os linfócitos T residentes de memória encontrados na pele que

poderiam estar influenciando na manutenção da morfologia estrelada dos fibroblastos assim como observamos nos animais zeína tolerantes.

Para verificar qual seria o impacto dessa intensa inflamação e da ativação diferencial dos fibroblastos na formação da nova matriz e também da cicatriz, realizamos a lesão nos animais FTY720 imunizados com salina e zeína, e acompanhamos até 40 dias após a lesão. As análises histológicas nos mostraram que em ambos os grupos FTY720, os animais apresentaram deposição de colágeno modificada, pois não vimos nestes animais a capacidade de formar feixes entrelaçados de fibras colágenas. Vale ressaltar que essas observações são mais evidentes e intensas no grupo salina FTY720. É bastante notável que os animais FTY720 formaram uma “massa compacta” de colágeno no leito da ferida. Através de análises com luz polarizada, conseguimos confirmar que os animais salina FTY720 apresentavam alterações mais evidentes na deposição de colágeno por apresentarem fibras mais imaturas que do que os animais zeína FTY720. Portanto, o estado “super” ativado dos fibroblastos observados nos animais salina FTY720 com 7 dias pós lesão não influencia de forma positiva na deposição de colágeno a longo prazo.

Acredita-se que os fibroblastos são os principais mediadores da cicatrização através da síntese e organização da MEC. Feridas adultas geralmente desenvolvem tecido cicatricial fibrótico, sem apêndices dérmicos e com fibras organizadas de maneira paralela à epiderme. Estudo publicado em 2018, revelou a existência de duas linhagens distintas de fibroblastos que coexistem na pele do dorso e na cavidade oral de camundongos, onde uma é positiva para o gene *Engrailed-1* (EPFs) e a outra negativa (ENFs). Os fibroblastos que expressam esse gene (EPFs) emergem na fase tardia durante o desenvolvimento no útero e são os principais contribuintes para a formação de cicatrizes em vários modelos de cicatrizes patológicas. Por outro lado, os fibroblastos ENFs não participam da formação de cicatrizes. Ao longo do desenvolvimento ocorre uma alteração entre a proporção desses dois tipos de fibroblastos, onde o aumento da população de fibroblastos EPFs é proporcional a redução da população de ENFs, e isso está diretamente relacionado com a perda da capacidade regenerativa para a cicatrização em resposta à lesão (JIANG et al., 2018; MASCHARAK et al., 2021). Analisando os nossos resultados e também o de trabalhos anteriores, podemos dizer que o perfil de ativação dos fibroblastos é dependente do ambiente inflamatório em que ele se encontra, e isso vai determinar a longo prazo

como será a formação do novo tecido. Mais estudos serão necessários para identificar se os fibroblastos encontrados nos animais tolerantes são os fibroblastos ENFs ou não.

Nossos resultados demonstraram até o momento que os linfócitos são células importantes durante o processo de cicatrização de feridas, e também que a ausência dessas células circulantes em animais imunizados com a proteína tolerada, não gera nenhum efeito positivo no controle da inflamação advindo. Por outro lado, nossos resultados com FTY720 em animais imunizados com zeína nos mostrou que apesar da ausência de linfócitos circulantes, o reparo da ferida foi melhor do que observado nos animais RAG KO. Esse dado levante a hipótese de que os linfócitos residentes da pele podem de certa forma auxiliar durante o processo de cicatrização, mesmo que de forma mais branda. Como já relatado, o estado de tolerância pode ser transferido através da transferência adotiva de linfócitos encontrados no baço para animais que nunca tiveram contato prévio por via oral com a proteína tolerada. Com base nessas informações, nos perguntamos se a transferência de células do baço de animais WT, que comem diariamente a proteína zeína, para animais RAG KO, iria reconstituir a população de linfócitos destes animais, visando promover um melhor o reparo de feridas.

Nossos dados de citometria de fluxo realizados apenas nos grupos salina, confirmaram a presença de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço dos animais receptores após 10 dias da realização da transferência (Figura 26). Podemos afirmar que os linfócitos transferidos para os animais RAGKO-R tiveram influência positiva no fechamento das lesões e também nas células imunes que compõem o infiltrado inflamatório, tanto nos animais receptores imunizados com salina, quanto com zeína. A redução dos aspectos inflamatórios observados no animais RAG reconstituídos não são tão intensas quando comparados com os animais WT, mas quando comparamos com os animais RAG KO essa diferença se torna ainda mais evidente. As análises microscópicas qualitativas das lesões indicaram que havia linfócitos no tecido inflamado. Um fato que chamou bastante a nossa atenção foi que o infiltrado de neutrófilos observado anteriormente com bastante intensidade nos animais RAG KO e também nos animais injetados com FTY720, já não era mais visto nesses animais RAG reconstituídos. Esses resultados nos indicam que os linfócitos são células

determinantes para o controle da inflamação, principalmente das fases iniciais onde os componentes pró inflamatórios são predominantes. Ainda será necessário confirmar através de marcações específicas a presença dos linfócitos na pele, além de das outras células imunes que participam do processo de reparo.

Comparando os dados obtidos dos animais RAG KO-R, podemos dizer que os animais receptores imunizados com a proteína tolerada zeína, apresentaram características de melhor reparo e menos inflamação do que os animais receptores imunizados com salina. Essas observações nos indicam que os linfócitos transferidos para estes animais, foram capazes promover o estado de tolerância, mesmo que de forma mais branda do que observado nos animais WT. Experimentos de transferência adotiva de células do baço para investigar padrões espaço-temporais de ativação de células T CD4⁺ após lesão linfática, mostraram que os linfócitos virgens migram inicialmente para os linfonodos próximo a zona onde ocorreu a lesão, tornam-se ativados, e parte deles migram para os tecidos periféricos porém a maioria desta células são liberadas na circulação sistêmica (GARCÍA NORES et al., 2018).

Existe uma população de células T que possui um perfil funcional muito diversificado, são as chamadas células T reguladoras. Esse subtipo de linfócito T CD4⁺ pode ser amplamente distribuído em tecidos não linfóides como no músculo, na pele e na lâmina própria (LP) do cólon. São células que dialogam dinamicamente com outras células imunológicas e não imunológicas em seu microambiente, com isso promovem homeostase tecidual, regulam metabolismo local e sistêmico além de serem importantes no processo de reparo tecidual. Em um estudo publicado em 2023, foi demonstrado que linfócitos T reguladores se acumulam rapidamente em resposta a lesão muscular e promovem a regeneração do órgão tecidual através do controle das outras células imunes inatas e adaptativas, além de aumentarem a capacidade regenerativa das células musculares satélites. Ao aprofundar mais no papel dessas células frente uma lesão, os pesquisadores descobriram que os linfócitos que se acumulam na lesão, são linfócitos provenientes do intestino que são induzidas localmente em respostas a antígenos microbianos e alimentares (HANNA et al., 2023).

Com base nesses dados acreditamos que a interação entre linfócitos intestinais e antígenos alimentares são determinantes para ativação diferencial destas células

quando o indivíduo é reexposto à mesma proteína por uma via parenteral. Esses estudos elucidaram que os linfócitos T reguladores migram para o local da lesão e atuam de forma ativa para a resolução da inflamação. Nos sugerimos que nos animais tolerantes, essa ação pode ser ainda mais presente devido ao contato prévio destas células T reguladoras com a proteína da dieta, fazendo com que o reparo seja ainda mais eficiente após reexposição por via parenteral à proteína. Além disso, já demonstramos em diversos modelos experimentais que a ação reguladora da inflamação nos animais tolerantes, acontece de forma sistêmica, e isso pode ser por ação desses linfócitos que circulam e recirculam do intestino para outros locais do corpo através das vias linfáticas. Ainda são necessários mais estudos para melhor caracterizar quais são os subtipos de linfócitos que estão sendo ativados e estão promovendo o melhor reparo dos animais tolerantes.

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir através dos dados encontrados neste trabalho, que os linfócitos são células importantes para o processo de reparo de feridas na pele, e que estas células são indispensáveis para promover os efeitos positivos no reparo de feridas através dos efeitos indiretos da tolerância oral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ-LÉVIGNE, D. et al. **Reactive oxygen species and NOX enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repair** *International Journal of Molecular Sciences*, 2017.
- ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS, L. et al. Zein nanoparticles for drug delivery: Preparation methods and biological applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 635, p. 122754, mar. 2023.
- AZEVEDO, G. M. et al. Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.
- BEHARA, M.; GOUDY, S. FTY720 in immuno-regenerative and wound healing technologies for muscle, epithelial and bone regeneration. **Frontiers in Physiology**, v. 14, n. May, p. 1–14, 2023.
- BERTOLINI, T. B. et al. Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. **Cellular Immunology**, v. 359, p. 104251, jan. 2021.
- BOOTHBY, I. C.; COHEN, J. N.; ROSENBLUM, M. D. **Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair** *Science Immunology*, 2020.
- BOOTUN, R. Effects of immunosuppressive therapy on wound healing. **International Wound Journal**, v. 10, n. 1, p. 98–104, 2013.
- CANTARUTI, T. et al. Parenteral re-exposure to an immunologically tolerated protein up to 6h after skin injuries improves wound healing in diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 6, 2019.
- CANTARUTI, T. A. et al. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. **Immunology**, 2017a.
- CANTARUTI, T. A. et al. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. **Immunology**, v. 151, n. 3, 2017b.
- CARVALHO, C. R. et al. Indirect Effects of Oral Tolerance in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1994.
- CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1996.
- CASTRO-JUNIOR, A. B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of

- lymphocyte activity. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 171–181, dez. 2012.
- CHAMBERS, E. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**, v. 160, n. 2, p. 116–125, 2020.
- COLLINS, N. et al. Skin CD4⁺ memory T cells exhibit combined cluster-mediated retention and equilibration with the circulation. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11514, 10 maio 2016.
- COSTA, B. H. et al. Systemic effects of oral tolerance in bone healing. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6296, 18 abr. 2023.
- COSTA, R. A. et al. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 4, 2011.
- COSTA, R. A. et al. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, 2016.
- CUNHA, A. P. D. et al. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. **Cellular Immunology**, 2009.
- DEBES, G. F.; MCGETTIGAN, S. E. Skin-Associated B Cells in Health and Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 6, p. 1659–1666, 15 mar. 2019.
- DYRING-ANDERSEN, B. et al. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
- FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral Tolerance: Mechanisms and Therapeutic Applications. In: [s.l.: s.n.]. p. 153–264.
- FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 232–259, 28 ago. 2005.
- FRANCO-VALENCIA, K. et al. Subcutaneous injection of an immunologically tolerated protein up to 5 days before skin injuries improves wound healing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, 2022a.
- FRANCO-VALENCIA, K. et al. Subcutaneous injection of an immunologically tolerated protein up to 5 days before skin injuries improves wound healing. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, 2022b.
- GARCÍA NORES, G. D. et al. CD4⁺ T cells are activated in regional lymph nodes and migrate to skin to initiate lymphedema. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1970, 17 maio 2018.
- GAWRONSKA-KOZAK, B. et al. Scarless skin repair in immunodeficient mice.

Wound Repair and Regeneration, v. 14, n. 3, 2006.

GERARDUZZI, C.; DI BATTISTA, J. A. **Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective***Inflammation Research*, 2017.

GUERRA, P. V. et al. Oral Tolerance Induced by Heat Shock Protein 65-Producing *Lactococcus lactis* Mitigates Inflammation in *Leishmania braziliensis* Infection.

Frontiers in Immunology, v. 12, 2021.

GÜTGEMANN, I. et al. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. **Immunity**, v. 8, n. 6, 1998.

HAJAM, E. Y. et al. The expanding impact of T-reg^s in the skin. n. September, p. 1–15, 2022a.

HAJAM, E. Y. et al. The expanding impact of T-reg^s in the skin. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 15 set. 2022b.

HANNA, B. S. et al. The gut microbiota promotes distal tissue regeneration via ROR γ ⁺ regulatory T cell emissaries. **Immunity**, v. 56, n. 4, p. 829–846.e8, abr. 2023.

JIANG, D. et al. Two succeeding fibroblastic lineages drive dermal development and the transition from regeneration to scarring. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 422–431, 28 abr. 2018.

LAHMANN, W. M. et al. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 25, n. 8, p. 813–21, 1992.

LEE, W.; SURESH, M. Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1 ago. 2022.

LI, J. et al. **Regulatory T-cells: Potential regulator of tissue repair and regeneration***Frontiers in Immunology*, 2018.

LINDSEY, M. L.; BECIROVIC-AGIC, M. Skin wound healing as a mirror to cardiac wound healing. **Experimental Physiology**, v. 108, n. 8, p. 1003–1010, 24 ago. 2023.

MARTÍNEZ-MORALES, J. C. et al. S1P1 receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: Effects of sphingosine 1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 6, p. 11–17, 2018.

MASCHARAK, S. et al. Preventing Engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring. **Science**, v. 372, n. 6540, 23 abr. 2021.

MOMTAZI, M. et al. Morphologic and Histologic Comparison of Hypertrophic Scar in Nude Mice, T-Cell Receptor, and Recombination Activating Gene Knockout Mice.

Plastic and Reconstructive Surgery, v. 136, n. 6, 2015.

MONIKA, P. et al. Myofibroblast progeny in wound biology and wound healing studies. **Wound Repair and Regeneration**, v. 29, n. 4, p. 531–547, 31 jul. 2021.

MORO-GARCÍA, M. A. et al. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes.

Frontiers in immunology, v. 9, p. 339, 2018.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. **The dynamics of the skin's immune system****International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

NIELSEN, M. M.; WITHERDEN, D. A.; HAVRAN, W. L. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 12, p. 733–745, 18 dez. 2017.

NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V.-M. Targeting Myfibroblasts in Dermal Fibrosis: A Retinoid Connection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 143, n. 9, p. 1629–1631, set. 2023.

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **Journal of Immunological Methods**, v. 421, 2015a.

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **Journal of Immunological Methods**, v. 421, p. 36–43, jun. 2015b.

PIIPPONEN, M.; LI, D.; LANDÉN, N. X. **The immune functions of keratinocytes in skin wound healing****International Journal of Molecular Sciences**, 2020.

PITOCCO, D. et al. **Oxidative stress in diabetes: Implications for vascular and other complications****International Journal of Molecular Sciences**, 2013.

RAMOS, G. C. et al. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. **Immunology**, v. 126, n. 3, 2009.

RAZIYEVA, K. et al. **Immunology of acute and chronic wound healing****Biomolecules**, 2021.

REINKE, J. M.; SORG, H. **Wound repair and regeneration****European Surgical Research**, 2012.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: an updated review. **Immunology Letters**, v. 245, n. February, p. 29–37, 2022.

RODRIGUES, M. et al. Wound healing: A cellular perspective. **Physiological**

Reviews, v. 99, n. 1, 2019.

SEIDEL, J. A. et al. Skin resident memory CD8⁺ T cells are phenotypically and functionally distinct from circulating populations and lack immediate cytotoxic function. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 194, n. 1, p. 79–92, 26 set. 2018.

SEIFERT, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 561–565, 26 set. 2012.

SERAPHIM, P. M. et al. Lack of lymphocytes impairs macrophage polarization and angiogenesis in diabetic wound healing. **Life Sciences**, v. 254, p. 117813, ago. 2020.

SHIMURA, E. et al. Epidermal $\gamma\delta$ T cells sense precancerous cellular dysregulation and initiate immune responses. **International Immunology**, v. 22, n. 4, p. 329–340, abr. 2010.

SPEZIALI, E. F. et al. Lifelong Maintenance of Oral Tolerance and Immunity Profiles in Mice Depends on Early Exposure to Antigen. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 87, n. 2, p. 73–79, 3 fev. 2018.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 173–181, abr. 1998.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 11, p. 631–640, nov. 2015.

SUN, W. Y. et al. Topical Application of Fingolimod Perturbs Cutaneous Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 9, 2016.

VAZ, N. et al. **Immaturity, ageing and oral tolerance** **Scandinavian Journal of Immunology**, 1997.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 1977.

VERDOLIN, B. A. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 2, 2001.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiological Reviews**, 2017.

WEST, H. C.; BENNETT, C. L. Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 5 jan. 2018.

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 2016.

WOODLEY, J. P.; LAMBERT, D. W.; ASENCIO, I. O. Understanding Fibroblast Behavior in 3D Biomaterials. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 28, n. 3, p. 569–578, 1 jun. 2022.

XU, P. et al. Involvements of $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Acute and Chronic Skin Wound Repair. **Inflammation**, v. 40, n. 4, 2017.