

ISABELA BEATRIZ CABACINHA NÓBREGA

ESTUDO DA TEMPORALIDADE DOS EFEITOS DA INJEÇÃO  
PARENTERAL DE PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS  
NO EPARO DE FERIDAS NA PELE

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2019

ISABELA BEATRIZ CABACINHA NÓBREGA

**ESTUDO DA TEMPORALIDADE DOS EFEITOS DA INJEÇÃO  
PARENTERAL DE PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS NO  
REPARO DE FERIDAS NA PELE**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Junho/2019

ISABELA BEATRIZ CABACINHA NÓBREGA

**ESTUDO DA TEMPORALIDADE DOS EFEITOS DA INJEÇÃO  
PARENTERAL DE PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS NO  
REPARO DE FERIDAS NA PELE**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Cláudia Rocha Carvalho

Co-orientador: Dr. Thiago Cantaruti Anselmo

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2019



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**ISABELA BEATRIZ CABACINHA NÓBREGA**

318/2019  
entrada  
2º/2017  
2017720385

Às oito horas e trinta minutos do dia 24 de junho de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "ESTUDO DA TEMPORALIDADE DOS EFEITOS DA INJEÇÃO PARENTERAL DE PROTEÍNAS IMUNOLOGICAMENTE TOLERADAS NO REPARO DE FERIDAS NA PELE", requisito final para obtenção do grau de Mestre 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. Thiago Cantaruti Anselmo	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga	UFSJ	Aprovada
Dr. Andre Klein	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, 24 de junho de 2019.**

Dr.<sup>a</sup> Cláudia Rocha Carvalho (Orientadora) Cláudia Rocha Carvalho

Dr. Thiago Cantaruti Anselmo (Coorientador) Thiago Cantaruti Anselmo

Dr.<sup>a</sup> Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga

Dr. Andre Klein Andre Klein

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

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).

## Resumo

A tolerância oral resulta de uma modificação sistêmica da atividade imunológica frente a proteínas previamente ingeridas que inibe respostas imunes ao antígeno específico. Diferentes proteínas como a ovalbumina (OVA) e zeína, são muito utilizadas em estudos sobre a tolerância oral. A OVA não faz parte da dieta usual dos camundongos, mas camundongos que ingerem Ova voluntariamente ou por gavagem antes de imunizações parenterais com Ova em adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , mostram redução dos anticorpos anti-OVA no soro em comparação com animais controle que não ingeriram OVA previamente. Injeções de zeína promovem estes efeitos sem tratamento prévio porque a dieta usual contém milho. Além dos efeitos sobre respostas imunes específicas, injeções parenterais de proteínas toleradas em  $\text{Al}(\text{OH})_3$  inibem respostas imunes para antígenos não relacionados injetados simultaneamente. Uma única injeção intraperitoneal de OVA ou de Zeína em  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , concomitante a lesões na pele em animais tolerantes a estas proteínas, reduz a inflamação e resulta na formação de cicatrizes menores e melhores do ponto de vista estético. Aqui, testamos se a injeção de proteínas toleradas por via subcutânea (s.c) até 7 dias antes de lesões na pele também reduz a inflamação e melhora o reparo destas lesões. Os resultados mostram que a injeção de zeína por via s.c. 3 ou 5 dias antes das lesões diminui o número total de leucócitos, reduz o número de mastócitos e neutrófilos e aumenta o número de linfócitos T na área de reparo aos sete dias após a lesão. A injeção de zeína 7 dias antes da lesão não reduz o número total de leucócitos nem aumenta o número de linfócitos T, mas ainda reduz o número de mastócitos. Aos 40 dias após a lesão, a reorganização do colágeno na área da cicatriz está semelhante ao da pele intacta nos animais que receberam a proteína tolerada até 5 dias, mas não 7 dias antes das lesões. Esses resultados indicam que a injeção parenteral de proteínas toleradas até 5 dias antes de lesões pode ser utilizada para melhorar a cicatrização. Visando a aplicação clínica, estes resultados podem vir a ser importantes principalmente em situações de intervenções cirúrgicas programadas.

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

## Abstract

Oral tolerance results from a systemic modification of immunological responsiveness to previously ingested proteins that inhibit specific antibody responses. Different proteins such as ovalbumin (OVA) and the maize protein zein are widely used in oral tolerance studies. Administration of OVA either by continuously feeding or by gavage can turn mice orally tolerant to this protein; due to the ingestion of regular mouse chow, mice are tolerant to zein. In addition to decreasing specific immune responses, parenteral injection of orally-tolerated proteins in adjuvant also inhibits immune responses to unrelated antigens injected simultaneously. Our previous studies show that intraperitoneal injections of OVA or Zein in Al(OH)<sub>3</sub> adjuvant, concomitantly with skin lesions in animals tolerant to these proteins, reduce inflammation and result in the formation of smaller and better looking scars. Herein, we tested if subcutaneous (s.c.) injection of orally-tolerated proteins up to 7 days before skin lesions also reduced inflammation and improved the repair. Our results show that subcutaneous injection of zein either 3 or 5 days before skin lesions results in lower number of leukocytes, of mast cells and neutrophils, and in higher numbers of T lymphocytes in the wound bed. Injection of zein 7 days before skin lesions does not reduce the total number of leukocytes nor increases the number of T lymphocytes, but still reduce the number of mast cells. At 40 days after injury, the reorganization of collagen in the scar area was similar to that of intact skin in the animals that received the tolerated protein up to 5 days before the lesions. These results indicate that parenteral injection of orally-tolerated proteins up to 5 days before skin lesions can be used to improve healing. These results may become important in situations of programmed surgical interventions.

**Keywords:** Oral Tolerance, Indirect Effects, Skin, Zein, Inflammation.

## Lista de Abreviações

Al(OH)<sub>3</sub> – Hidróxido de Alumínio

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

BSA - Albumina de soro bovino

C° - Celsius

CEBIO – UFMG – Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CAPI – Centro de Aquisição e Processamento de Imagem

d – dia (s)

DCs – Células Dendríticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNP – Dinitrofenil

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

Fig. – Figura

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Intestino

GI – Gastrointestinal

g – Força g

HGG- Agregados de Globulina Humana

HE - Hematoxilina e Eosina

HETAB / HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

h – horas

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- Ácido Sulfúrico

i.p. – Via intraperitoneal

IEL - Linfócitos Intraepiteliais

IFN – Interferon

IGF – Fator de Crescimento Insulina

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

KLH – Hemocianina

Kg- quilogramas

LP- Lâmina Própria

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

NaCl- Cloreto de Sódio

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>- Fosfato Trissódico

Na<sub>2</sub> EDTA- Ácido Etilenodiaminotretacético, Sal Dissódico

OVA – Ovalbumina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

pH - potencial hidrogeniônico

PMN – Polimorfonucleares

s.c – Via subcutânea

SUS- Sistema Único de Saúde

T  $\gamma\delta$  – linfócito T gamma delta

TG- Tecido de Granulação

TGF-  $\beta$  - Fator de crescimento Transformante beta

Th - Células T helper

Tregs- Células T reguladoras

TNF - Fator de necrose tumoral

TRIS – trisaminometano

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

ug- Microgramas

ul- Microlitros

Vs- Versus

VEGF - Fator Endotelial de Crescimento Vascular

$\alpha$ -SMA – Actina Alfa de Músculo Liso

## Lista de Figuras

Figura 1 – Protocolo experimental de ferida excisional no dorso .....	31
Figura 2 – Protocolo experimental para análise do efeito da injeção s.c coletada após 7 dias .....	33
Figura 3 – Protocolo experimental para análise do efeito da injeção s.c coletada após 40 dias .....	33
Figura 4- Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas após 7 dias.....	34
Figura 5- Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas após 40 dias.....	35
Figura 6- Retículo utilizado para análises morfométricas .....	41
Figura 7- Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo excisional.....	42
Figura 8- Protocolo experimental para análise da atividade da enzima MPO..	43
Figura 9- Injeção s.c de zeína dias antes de lesões na pele de camundongos reduz a áreas da ferida.....	47
Figura 10- Injeção subcutânea de zeína reduz o infiltrado inflamatório e o número de mastócitos no leito da lesão de animais que receberam a proteína tolerada até 5 dias antes.....	50
Figura 11- Análise de leucócitos, linfócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida de animais que receberam a injeção s.c de zeína dias antes da lesão no dorso.....	52

Figura 12 - Atividade da enzima mieloperoxidase em 100 mg de pele contendo a área lesionada.....53

Figura 13 - A injeção subcutânea de zeína dias antes da realização de lesões no dorso melhora a deposição de colágeno.....55

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta.....	39
--	----

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 TOLERÂNCIA ORAL .....	13
1.2 EFEITOS INDIRETOS DA TOLERÂNCIA ORAL .....	16
1.3 REPARO DE LESÕES NA PELE .....	18
1.4 AS FASES DO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS .....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 ANIMAIS .....	30
4.2 DIETA .....	30
4.3 INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE ZEÍNA EM ADJUVANTE .....	30
4.4 REALIZAÇÃO DE LESÃO EXCISIONAL NA PELE .....	31
4.5 PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO .....	32
4.6 ORGANIZAÇÃO E DENOMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	33
4.7 COLETA DA REGIÃO LESIONADA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	35
4.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA DE LUZ .....	36
4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	37
4.10 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	38
4.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA ÁREA DA LESÃO .....	40
4.12 AQUISIÇÃO DE IMAGENS .....	41
4.13 MEDIDA DA ÁREA, EM VISTA MACROSCÓPICA, DA FERIDA EXCISIONAL .....	41
4.14 ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ .....	42
4.15 ANÁLISE EM MICROSCÓPIO CONFOCAL .....	43
4.16 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) EM FRAGMENTOS DE PELE CONTENDO A ÁREA DA LESÃO .....	44
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	47
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1 ANÁLISE DO FECHAMENTO DAS LESÕES .....	48
5.2 ANÁLISES MICROSCÓPICAS QUALITATIVAS E MORFOMÉTRICAS DAS ALTERAÇÕES PRODUZIDAS PELA INJEÇÃO S.C DA PROTEÍNA ZEÍNA DIAS ANTES DA REALIZAÇÃO DE LESÕES NA PELE DE CAMUNDONGOS. ....	49
5.3 ANÁLISE DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS, MACRÓFAGOS E MIOFIBROBLASTOS NO LEITO DA FERIDA .....	52
5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE EM EXTRATO DE PELE CONTENDO A LESÃO .....	53

5.5 ANÁLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR 40 DIAS APÓS A LESÃO.....	55
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 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).

Na década de 1970, a diminuição da resposta imune a partir de proteínas que foram previamente ingeridas foi denominada tolerância oral (VAZ et al., 1977). Embora proteínas contactadas por via oral penetrem o organismo e possam desencadear reações em animais previamente sensibilizados por estas proteínas, elas não são usualmente sensibilizantes por si mesmas (VERDOLIN et al., 2001). A tolerância oral pode ser adotivamente transferida por linfócitos T (RICHMAN et al., 1978), tem efeitos sistêmicos que inibem a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos específicos (OLIVEIRA et al., 2015). Estes efeitos sistêmicos são considerados importantes mecanismos fisiológicos capazes de inibir 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 (VAZ et al., 1977).

O epitélio intestinal é constantemente exposto a uma grande quantidade de materiais que podem ser prejudiciais ou benéficos para o organismo (WORBS et al., 2006). Estima-se que 2% das proteínas alimentares possam permanecer intactas e atravessar o epitélio intestinal de animais adultos saudáveis, sendo disseminadas sistemicamente através da circulação sanguínea e linfática. As células do epitélio intestinal formam uma barreira seletiva onde o transporte paracelular e transcelular é altamente controlado, e condiciona as respostas imunes apropriadas ao intestino. Há abundantes linfócitos T residentes (T  $\gamma\delta$ ) no epitélio intestinal que desempenham um papel crucial na tolerância oral (WAMBRE; JEONG, 2018).

Alguns componentes presentes nos alimentos podem ser resistentes a degradação no estômago, apesar do baixo pH e das enzimas proteolíticas presentes no trato gastrointestinal, fazendo com que o material imunogênico entre no lúmen intestinal sendo detectado na lamina própria (LP) do epitélio intestinal minutos após a alimentação (PABST; MOWAT, 2012).

Para ativar o sistema imune associado à mucosa, o antígeno deve ter acesso a células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas (CDs), que coletam amostras do conteúdo luminal sem romper as junções intercelulares. Além disso, esse processo conta com a participação de

outro importante componente do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que são os linfócitos intraepiteliais (IELs). Os IELs auxiliam na regulação da homeostase intestinal e mantêm a função da barreira epitelial (COMMINS, 2015).

Os estudos sobre a tolerância oral contribuíram significativamente para a compreensão de que materiais antigênicos intactos podem ser absorvidos em quantidades suficientes para promover uma modificação na resposta imune do organismo. As macromoléculas ingeridas como alimento, portanto, não são totalmente degradadas no intestino, podendo ser detectados no epitélio intestinal e na lâmina própria (LP) poucos minutos após o consumo, sugerindo um papel importante do trato gastrointestinal (GI) no desenvolvimento da tolerância oral (WAMBRE; JEONG, 2018).

A tolerância oral afeta a reatividade a antígenos exógenos como os da dieta e produtos de bactérias comensais, além dos componentes próprios do corpo na superfície da mucosa (REZENDE; WEINER, 2017). A tolerância oral pode ser induzida através da exposição do antígeno à mucosa oral ou nasal. Estados de tolerância também podem ser induzidos através da injeção do antígeno na veia porta, que tem semelhança com a tolerância oral, ou, na câmara anterior do olho, que atua por mecanismos diferentes (MAYER; SHAO, 2004).

Outro fator importante é a idade dos animais, podendo influenciar na indução da tolerância, sendo mais difícil em animais neonatos e senis, no entanto, se esses animais receberem transferência de linfócitos de animais

normais jovens adultos, a indução da tolerância pode ser facilitada (LAHMANN et al., 1992). Este fato indica que a tolerância oral varia em paralelo com a imunocompetência do indivíduo (CARVALHO; VERDOLIN; VAZ, 1997; FARIA et al., 2003; FARIA; WEINER, 2008). A tolerância oral pode ser entendida como um fenômeno imunológico ativo que modifica as respostas imunes específicas a antígenos encontrados no trato gastrointestinal (PESSATO et al., 2019).

## **1.2 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)<sub>3</sub> concomitante a lesões na pele reduziu significativamente o infiltrado inflamatório e melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme (CANTARUTI et al., 2017). 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 (CANTARUTI et al., 2017).

Recentemente, Karen Franco e colaboradores (2019) testaram se injeção de proteínas toleradas por via s.c., uma via comumente utilizada para aplicação de vacinas, afetava o reparo de lesões na pele de camundongos. Observou-se que a injeção de zeína por via s.c. concomitante com lesões na pele também reduziu o infiltrado inflamatório e melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme (FRANCO, K et al; dados não publicados).

### **1.3 Reparo de lesões na pele**

A pele possui diversas funções fisiológicas, como por exemplo a proteção contra a perda de água, a penetração de patógenos e a absorção de raios ultravioleta. É importante para a síntese de vitamina D, além de regular a temperatura por excreção de suor em algumas espécies animais como no camundongo e nos humanos (WONG et al., 2016). As lesões na pele alteram as

suas funções e o reparo com o mínimo de cicatriz permite o restabelecimento da função.

O reparo de lesões na pele é considerado um processo altamente dinâmico, que envolve vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Além disto, envolve a participação de diversos tipos celulares, que interagem de maneira bem orquestrada com a matriz extracelular e usualmente restauram a integridade do tecido. Esse processo envolve três fases distintas, marcadas pela inflamação, proliferação e remodelamento. Um desequilíbrio em qualquer uma dessas fases pode levar à ruptura da harmonia do processo de cicatrização da ferida, resultando em feridas crônicas, que não fecham no tempo esperado, e na formação de cicatrizes anormais (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; KANJI; DAS, 2017).

A pele humana é composta por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme, com graus variados de especialização dentro de cada camada. A epiderme, a mais superficial, é a camada mais ativa biologicamente, uma vez que a camada basal do epitélio (estrato basal) está em constante renovação. A célula primária da epiderme é o queratinócito, que é derivado de células-tronco na camada basal da epiderme. Na medida em que os queratinócitos migram através das camadas espinhosa e granular, eles se diferenciam, perdem seus núcleos e, eventualmente, morrem e formam o estrato córneo, ou camada cornificada. O processo de migração dos queratinócitos a partir da camada basal até a sua saída da superfície do estrato córneo é de aproximadamente 41 dias. Os queratinócitos estão intimamente ligados uns aos outros e limitam o acesso

ao ambiente interno e, como consequência, essas conexões estreitas limitam o movimento dentro dessa camada e, portanto, outros tipos de células que residem lá, incluindo células estromais e derivadas da medula óssea, ficam basicamente fixadas em sua posição (RICHMOND; HARRIS, 2014; WONG et al., 2016).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, região rica em proteínas da matriz extracelular que dão estrutura e elasticidade à pele. A derme possui áreas regionalmente distintas: a derme papilar (superficial) e a derme reticular (mais profunda). Estudos de rastreamento de linhagem demonstraram que a derme papilar e a derme reticular são formadas a partir de linhagens distintas de fibroblastos, o que pode explicar as diferenças na arquitetura de suas fibrilas—fibras de colágeno de pequeno diâmetro intercaladas com fibras elásticas, que são encontradas na derme papilar. Já a derme reticular é composta predominantemente de grandes fibras de colágeno que são organizados em grandes feixes de fibras entrelaçadas e ramificadas, e fibras elásticas que formam uma superestrutura em torno das fibras de colágeno. Ao contrário da epiderme, a derme permite a livre migração de populações celulares. A epiderme e derme são separadas pela membrana basal, uma fina camada de proteínas da matriz extracelular que regula o movimento de células e proteínas entre essas duas camadas (RICHMOND; HARRIS, 2014; WONG et al., 2016).

Por fim, a camada mais profunda da pele, a chamada hipoderme, tem uma camada de gordura subcutânea composta principalmente de adipócitos, mas também contém nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Os adipócitos sequestram ácidos graxos potencialmente inflamatórios e os incorporam em

lipídios, mas são também capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias (RICHMOND; HARRIS, 2014).

#### **1.4 As fases do reparo de lesões cutâneas**

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 ( $TGF\beta$  3) (WONG; GURTNER; LONGAKER, 2013).

Conseqüentemente, pensa-se que a cicatrização anormal ou patológica de feridas seja atribuída a uma ruptura dos eventos celulares, tais como inflamação prolongada, uma característica primária de feridas que não se fecham. Também deve-se reconhecer a importância de componentes não celulares, tais como as proteínas da matriz extracelular (MEC) e alterações na força mecânica que elas podem promover (WONG; GURTNER; LONGAKER, 2013).

A inflamação é um processo biológico complexo, que ocorre como resultado de uma alteração nas interações entre os componentes dos tecidos, podendo ocorrer em casos de infecções, lesões teciduais e em situações fisiológicas como na implantação embrionária. Nos casos de lesões e infecções, a inflamação é classicamente caracterizada por sinais físicos como inchaço, dor, vermelhidão e aumento da temperatura local desencadeados por vasodilatação, extravasamento de fluidos (PASTWIŃSKA et al., 2017).

Uma lesão leva a ativação imediata da cascata de coagulação que através da montagem de um coágulo de fibrina, fornece a arquitetura básica da matriz para iniciar a invasão e o recrutamento de células inflamatórias através da liberação de fatores de crescimento e quimiocinas no ambiente da ferida (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). As plaquetas e mastócitos liberam fatores difusíveis, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que têm efeitos inflamatórios. Agentes inflamatórios ativados no local, como componentes ativados do sistema complemento e histamina, causam vermelhidão e inchaço. A matriz é rapidamente invadida por neutrófilos, seguidos por macrófagos que removem tecidos mortos e reduzem o potencial de infecção. As células polimorfonucleares (PMNs) são as primeiras células inflamatórias a chegar ao local de uma ferida cutânea em grande número entre 24 e 48 horas. Os leucócitos são a fonte principal de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1  $\alpha$  , IL-1  $\beta$  , IL-6, e TNF- $\alpha$ , que são responsáveis por desencadear uma cascata de reações inflamatórias que podem evitar o progresso da infecção. Além de eliminar micróbios e detritos, estas células inflamatórias também medeiam a angiogênese à medida que a ferida sai da sua fase inflamatória (KANJI; DAS, 2017).

Assim, durante o reparo de lesões, a fase inflamatória é caracterizada pelo influxo de leucócitos na área da ferida, e é normalmente estabelecida nas primeiras 24 horas podendo se estender por até 7 dias (GONZALEZ et al., 2016). Os leucócitos desempenham um papel importante na cicatrização de feridas e contribuem também para a liberação de enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio (GONZALEZ et al., 2016).

Células residentes no tecido que participam de processos imunológicos também são rapidamente ativadas, como acontece com mastócitos, células T gama-delta e células de Langerhans, que secretam quimiocinas e citocinas.

Os mastócitos são células secretoras, residentes no tecido que se originam de células progenitoras da medula óssea. No início de uma lesão cutânea, ocorre o acúmulo de mastócitos que contribuem para o aumento da permeabilidade endotelial e vasodilatação, facilitando a migração de células inflamatórias, principalmente monócitos e neutrófilos para o local da inflamação. Os mastócitos também são capazes de ativar os fibroblastos e queratinócitos e também estimulam a proliferação de fibroblastos durante a fase proliferativa via IL-4, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) para produzir uma nova Matriz extracelular (MEC). Os mediadores derivados do mastócitos, incluindo FGF-2, VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , fator de crescimento nervoso (NGF), IL-4 e IL-8 contribuem para neoangiogênese, fibrinogênese ou reepitelização durante o processo de reparo (KOMI; KHOMTCHOUK; SANTA MARIA, 2019).

Células inflamatórias que se encontram em circulação na corrente sanguínea infiltram em locais inflamados através de mecanismos precisamente definidos. O mecanismo de extravasamento celular para o tecido tem vários estágios, descritos como: marginação, rolamento, ativação, adesão firme, diapedese e quimiotaxia (MULLER, 2013). Os mastócitos contribuem significativamente para esse movimento. Quando os mastócitos são ativados, eles degranulam liberando uma ampla gama de mediadores já armazenados e/ou secretam derivados lipídicos recém sintetizados e citocinas. Várias funções, principalmente pró-inflamatórias, de substâncias liberadas fazem com que os mastócitos afetem diferentes estágios da inflamação, incluindo sua iniciação e manutenção, mas também sua resolução, sugerindo um papel fundamental dos mastócitos no processo inflamatório (PASTWIŃSKA et al., 2017).

Após a fase inflamatória, normalmente o processo de reparo passa para uma fase proliferativa onde ocorre a redução da área do tecido lesionado através da ação dos miofibroblastos e estabelecimento de uma barreira epitelial viável e ativa dos queratinócitos. Esta etapa é responsável pelo fechamento da lesão, e inclui a reepitelização, angiogênese e fibrose (GONZALEZ et al., 2016). Durante esta fase as células inflamatórias promovem o recrutamento e a proliferação de fibroblastos, células endoteliais vasculares e queratinócitos. Na fase proliferativa, a matriz extracelular provisória da fase inflamatória começa a ser substituída pelo tecido de granulação (TG). Este tecido é composto de fibroblastos, colágeno, vasos sanguíneos e macrófagos. A formação dos novos vasos transportam células circulantes para o local da ferida (KANJI; DAS, 2017).

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- $\beta$ , 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 terceira fase da cicatrização consiste na remodelação, que se inicia duas a três semanas após o início da lesão e pode durar um ano ou mais. Nesta etapa desenvolve-se a máxima resistência à tração por meio de reorganização, degradação e da síntese de uma nova matriz extracelular. Nesse estágio final da cicatrização da lesão o tecido de granulação é gradativamente remodelado, formando tecido cicatricial menos celular e vascular e que apresenta aumento progressivo da concentração de fibras colágenas (GONZALEZ et al., 2016).

Trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os efeitos da administração parenteral de uma proteína tolerada, ou seja, previamente administrada pela via oral, minutos antes de uma lesão cutânea, reduzem o infiltrado inflamatório no local da lesão. Além disto, estes efeitos melhoraram o reparo da lesão, através de uma melhor organização da deposição das fibras de colágeno na neoderme. À partir destes resultados, perguntamos se a injeção parenteral da proteína tolerada também reduz o infiltrado inflamatório e melhora o reparo, mesmo quando aplicadas dias antes da lesão ser realizada.

## 2 Justificativa

Uma lesão cutânea leva a uma sequência de eventos complexos e já bem definidos para reestabelecer a integridade da pele. A resposta inflamatória é uma fase de extrema importância durante o processo de reparo de lesões, visto que uma desregulação durante esta fase pode acarretar em complicações durante o fechamento da lesão e até mesmo na formação de cicatrizes patológicas. As feridas crônicas, aquelas que não se fecham no tempo esperado, estão associadas a um excesso de inflamação, trazendo consigo um grande ônus biológico, psicológico, social e financeiro (ZHAO et al., 2016). Com o aumento do número de cirurgias eletivas no Brasil e no mundo, aumenta também o número de pacientes que apresentam a cura deficiente ou insuficiente de feridas. Isso pode influenciar na qualidade de vida e na sobrevivência do paciente submetido a um procedimento cirúrgico (SUS) (HINZ, 2016). Existe um grande interesse clínico no desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para solucionar complicações durante o processo de cicatrização de feridas.

Estudos do nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a aplicação da proteína tolerada, via i.p, até 6 horas após a realização de lesão no dorso de camundongos é capaz de reduzir o número de leucócitos no leito da ferida. No entanto, quando administrada 24 horas depois da lesão, não ocorre redução do processo inflamatório já em curso (dados ainda não publicados). Além disso, sabe-se que a proteína tolerada inibe a produção de anticorpos para outra proteína injetada até 3 dias depois da proteína tolerada (CARVALHO;

VERDOLIN; VAZ, 1997). A caracterização dos efeitos indiretos da tolerância oral é importante para entender como o sistema imune pode afetar o reparo de lesões.

Uma vez que estudos anteriores mostraram que os efeitos indiretos da tolerância oral podem melhorar o reparo de lesões cutâneas, uma maior caracterização destes efeitos pode fornecer informações importantes sobre a participação do sistema imunológico durante o reparo de lesões, além de sugerir novas terapias.

Assim, realizamos este estudo de cinética para verificar por quanto tempo dura a ação da injeção da proteína tolerada no reparo de lesões cutâneas.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar por quanto tempo os efeitos indiretos da tolerância oral persistem com capacidade de modificar o infiltrado inflamatório e o arranjo da matriz extracelular durante o reparo de lesões na pele.

### **3.2 Objetivos Específicos**

Verificar se a injeção s.c. de zeína 7, 5 ou 3 dias antes de lesões na pele de camundongos modifica:

- A área da cicatriz;
- O número total de leucócitos na área da lesão;
- O número de mastócitos na área da lesão;
- O número de fibroblastos e de miofibroblastos na área da lesão;
- A reorganização da matriz extracelular;

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Animais**

Camundongos C57BL/6 machos com 6 semanas de idade foram obtidos do CEBIO da UFMG. Os animais permaneceram alojados na sala de experimentação do Departamento de Morfologia, onde foram alimentados com ração para camundongos e água a vontade. O ambiente possui ar refrigerado e um ciclo de claro/escuro de 12 horas. A lesão foi feita em camundongos com 8 semanas de idade. Experimentos aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CETEA) da UFMG (protocolo 137/2017).

### **4.2 Dieta**

Os camundongos foram alimentados com ração (NUVILAB) para animais de laboratório, que contém milho em sua composição.

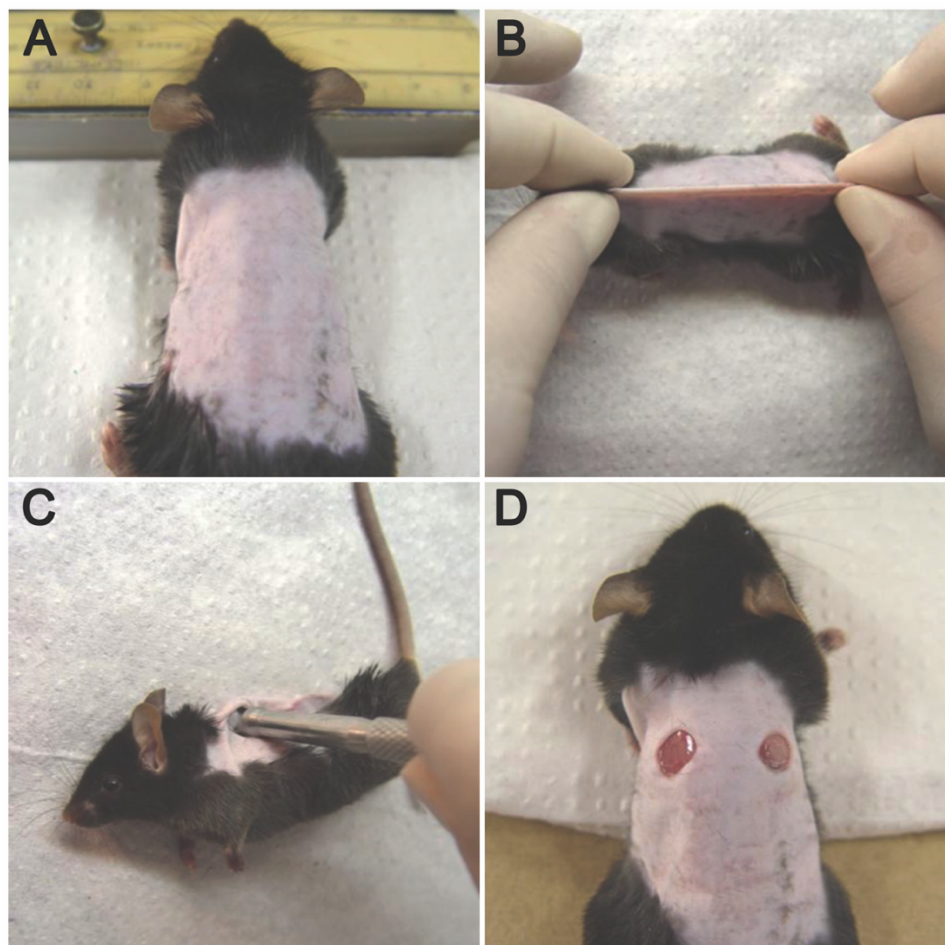
### **4.3 Injeção subcutânea de zeína em adjuvante**

Para desencadear os efeitos indiretos da tolerância oral os animais receberam uma injeção subcutânea, na base da cauda, de 10 µg de zeína (Sigma Aldrich St. Louis, MO) + 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub>. A partir da zeína purificada, foi feita uma solução estoque onde 5 mg da proteína foi diluída em 700µL de álcool absoluto + 300 µL de água destilada para se obter uma concentração de

5 mg/mL. Desta solução inicial, foi preparada uma solução final contendo 10 µg de zeína e 1,6 mg de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> num volume final de 100 µL de salina fisiológica para cada camundongo. Os animais do grupo controle receberam uma injeção subcutânea de 100 µL de salina.

#### **4.4 Realização de lesão excisional na pele**

Os camundongos receberam anestesia via intraperitoneal de 0,10 mL de uma solução de cloridato de Ketamina (80 mg/Kg) e Xilasina (15mg/Kg) diluídos em salina fisiológica. Nos animais anestesiados realizou-se a tricotomia dos pelos na região dorsal de cada animal e posteriormente realizou-se a ferida com o auxílio de um *punch* dermatológico de 6,5 mm de diâmetro .



**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**.

#### **4.5 Período pós-operatório**

Após a realização das feridas, para recuperação da anestesia os camundongos foram acondicionados em uma estufa com temperatura de 37°C, até o momento em que apresentaram mobilidade para serem realojados em caixas individuais no biotério de experimentação. Estes animais foram diariamente avaliados durante 7 dias após a cirurgia.

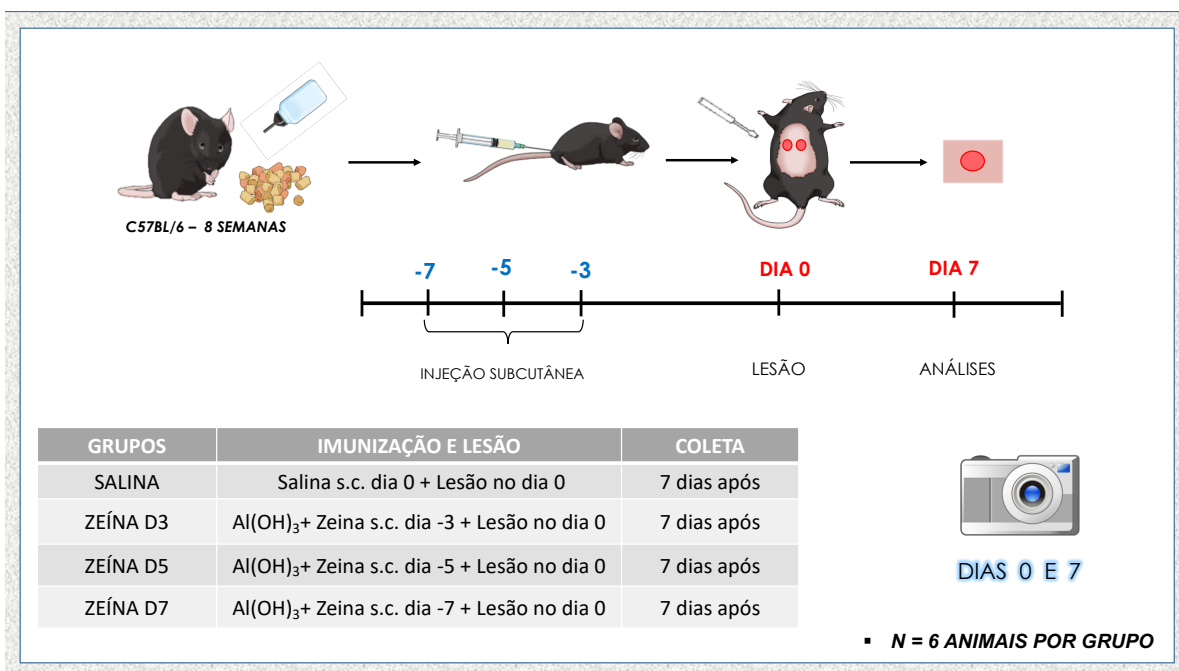
#### 4.6 Organização e denominação dos grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 6 indivíduos que receberam os seguintes tratamentos: Grupo **Salina**, onde os animais receberam uma injeção de salina via s.c., 5 minutos antes da realização de lesão no dorso. O grupo denominado **Zeína D3** recebeu injeção s.c contendo 10 µg de zeína + 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, **3** dias antes da realização da lesão. Já o grupo **Zeína D5** recebeu a injeção contendo 10 µg de zeína + 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, **5** dias antes da lesão, e por fim o grupo denominado **Zeína D7** recebeu a injeção contendo 10 µg de zeína + 1,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, **7** dias antes da realização de lesões no dorso dos camundongos.

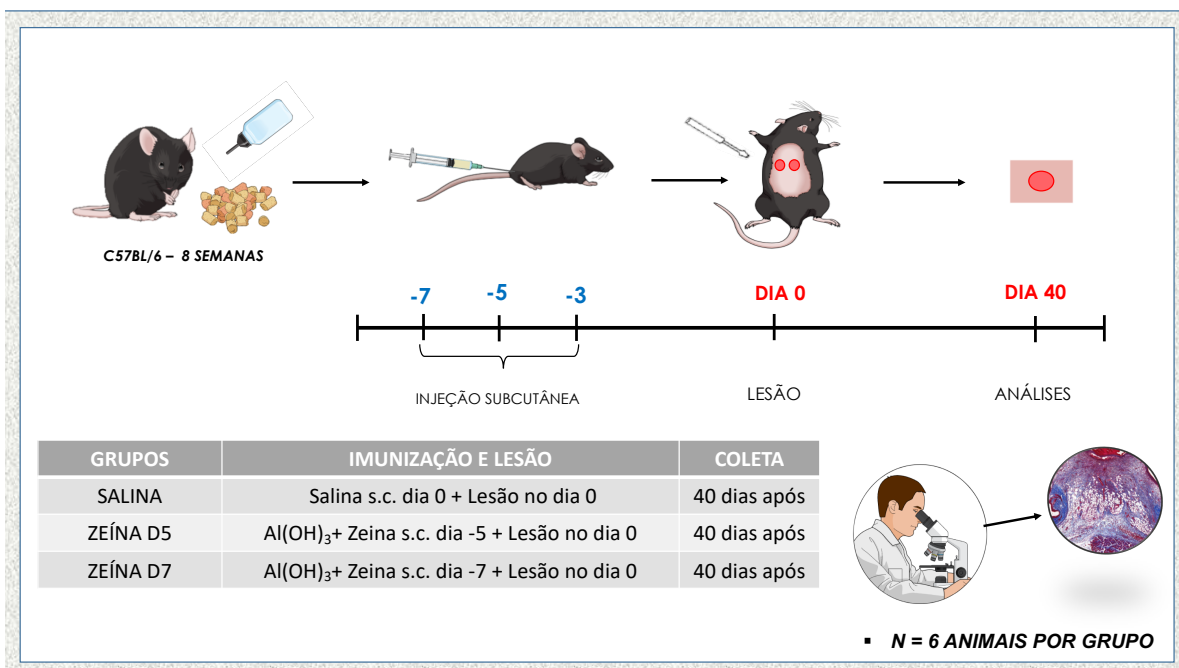
Após a realização das lesões, os animais foram mantidos em gaiolas individuais por 7 dias, com água e ração comercial à vontade até o momento da eutanásia, para coleta da pele com a região lesionada.

As lesões foram fotografadas para avaliação macroscópica nos dias 0 e 7 e coletadas nos dias 7 (Figura 2) e 40 (figura 3) para avaliação histológica.

Os grupos Zeína controle (Zeína dia 0) e controle adjuvante não foram incluídos neste estudo pois dados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa indicam que os efeitos da injeção por via s.c. nestas condições são semelhantes aos da injeção por via i.p. mostrado por Cantaruti e col (2017).



**Figura 2:** Protocolo experimental para análise do efeito da injeção subcutânea da proteína tolerada injetada dias antes da realização de lesões no dorso de camundongos e coletada após 7 dias de lesão.



**Figura 3:** Protocolo experimental para análise do efeito da injeção subcutânea da proteína tolerada injetada dias antes da realização de lesões no dorso de camundongos e coletada após 40 dias de lesão.

#### 4.7 Coleta da região lesionada e processamento histológico

No dia 7 (Figura 4) após a realização das feridas, os animais foram eutanaziados e a pele contendo a lesão foi coletada para análise histopatológica. Em todos os experimentos, as lesões do lado direito dos animais foram colocadas em papel filtro, para evitar que a pele se enrolasse, fixadas em Formalina de Carson (pH 7.2-7.4) por 24h e em seguida transferidas para um recipiente contendo álcool 70%. As lesões do lado esquerdo dos animais foram colocadas em papel filtro, fixadas em DMSO 20% + Metanol 80% e colocadas no congelador à -80°C. Após a fixação cada amostra de pele foi cortada ao meio antes da inclusão em parafina ou paraplast.

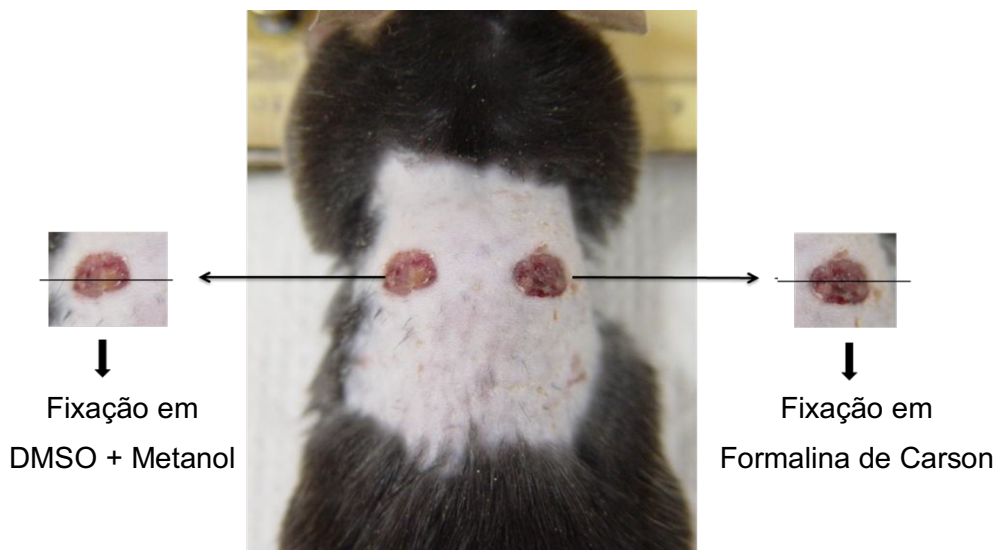
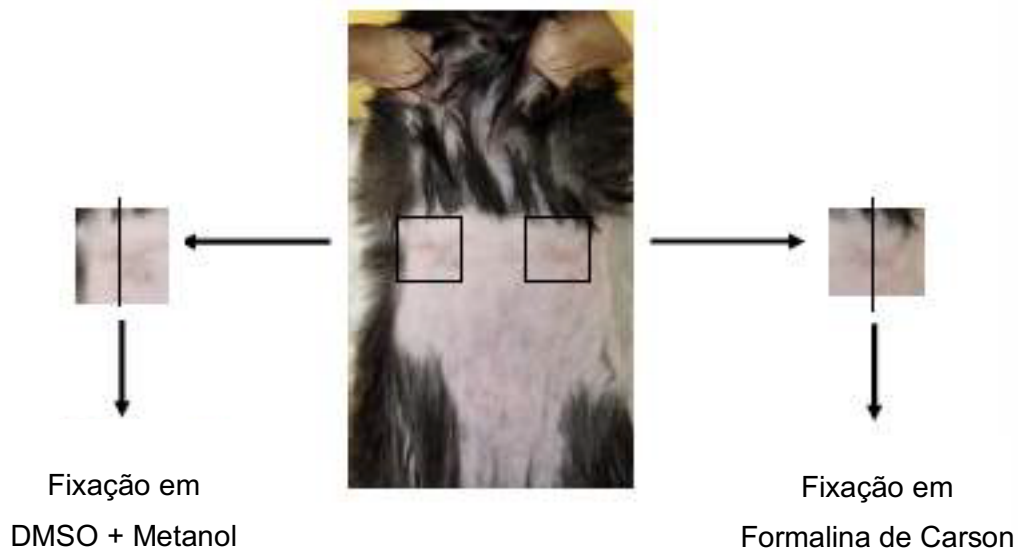


Figura 4. Coleta das áreas contendo as feridas cutâneas 7 dias após a sua realização.



**Figura 5. Coleta da pele contendo a cicatriz, 40 dias após a realização das lesões.**

#### **4.8 Processamento histológico para microscopia de luz**

Para realização da análise histológica em microscopia de luz, as feridas fixadas em Formalina de Carson foram submetidas aos seguintes procedimentos.

**1º) Desidratação:** imersão em uma série gradual de álcoois (de 80% a 100%), a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

**2º) Diafanização:** imersão em uma sequência de três recipientes contendo xilol em temperatura ambiente, por 20 minutos cada.

**3º) Infiltração:** imersão em uma sequência de três recipientes contendo parafina a uma temperatura de 56°C, por 20 minutos cada.

**4º) Inclusão:** em parafina a uma temperatura de 56°C.

Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5  $\mu$ m. Esses cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricromático de Masson e Alcian Blue + Safranina para avaliação histopatológica.

#### **4.9 Processamento histológico para microscopia de fluorescência**

Para realização da técnica de imunofluorescência, os tecidos fixados após imersão em DMSO 20% + metanol 80%, e acondicionados a -80°C por seis dias para criosubstituição, foram transferidos para uma temperatura de -20°C onde permaneceram por 24h.

Posteriormente foram submetidos às seguintes etapas:

**1ª) Desidratação:** imersão em uma sequência de três recipientes contendo álcool absoluto, a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

**2ª) Diafanização:** imersão em uma sequência de dois recipientes contendo xilol a temperatura ambiente, por 30 minutos cada.

**3ª) Infiltração:** imersão em recipientes contendo 50% de Xilol+50% de Paraplast Plus, a uma temperatura de 63°C, por 12 horas. Posteriormente os tecidos foram imersos em uma sequência de dois recipientes contendo somente paraplast, a

uma temperatura de 63°C, por trinta minutos cada.

**4ª) Inclusão:** em Paraplast a uma temperatura de 63°C.

Posteriormente à inclusão, foram realizados cortes histológicos com uso do Micrótomo Semi Automático (Microm – HM 335 E) na espessura de 5 µm. Na sequência, os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência.

#### **4.10 Técnica de imunofluorescência indireta**

Depois de seccionados, os tecidos foram submetidos às seguintes etapas:

- 1º) As fitas contendo os cortes foram mantidas dentro de caixas de papel cartão devidamente separadas por grupo e por animal.
- 2º) Os cortes contendo a pele são colocados em uma lâmina específica para imunofluorescência (espessura 0,1mm) em cima de uma gota de água Milli Q.
- 3º) As lâminas preparadas devem ser colocadas sobre uma placa aquecida (temperatura de 39,4 °C) até o dia seguinte.

No dia seguinte, as lâminas contendo os cortes foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- 1ª) **Desparafinização:** imersão em uma sequência de três recipientes contendo xilol a temperatura ambiente, por 5 minutos.

**2ª) Hidratação:** imersão em uma série gradual de álcoois (de 25% a 100%). Posteriormente em água milli Q à temperatura ambiente por 3 minutos e em seguida em PBS a temperatura ambiente por 3 minutos.

**3ª) Bloqueio:** primeiramente a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução de bloqueio constituída de PBS/BSA 1,25% + Tween 20 0,1%, a temperatura ambiente, foi adicionada e permaneceu sobre os mesmos por 60 minutos.

**4ª) Incubação: anticorpo primário:** a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionado e os mesmos acondicionados a 4°C overnight.

**5ª) Lavagem:** as lâminas foram imersas três vezes em PBS, a temperatura ambiente, por 5 minutos cada.

**6ª) Incubação: anticorpo secundário:** a região ao redor dos cortes foi seca, os mesmos circundados com uma caneta hidrofóbica e, posteriormente, 50 µL de uma solução contendo os anticorpos secundários (Tabela 1) diluídos em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% foi adicionada e permaneceu sobre os mesmos por 60 minutos.

**7ª) Lavagem:** as lâminas foram imersas três vezes em PBS, a temperatura ambiente, por 5 minutos cada.

**8ª) Montagem das lâminas:** as lâminas foram montadas utilizando uma solução de glicerina 90%/TRIS 1M 10%, pH 9,0, a 25 °C.

ANTICORPOS	ESPECIFICAÇÕES	DILUIÇÃO	FONTE
PRIMÁRIOS	Anticorpo purificado anti-CD45 produzido em rato	1:50	Biologend (103-102)
	Anticorpo monoclonal anti-F4/80 produzido em rato	1:50	eBioscience (14-4801)
	Anticorpo purificado anti-CD3 produzido em rato	1:50	BD Pharmingen (555273)
	Anticorpo Monoclonal Anti-actina $\alpha$ -SMA produzido em camundongo	1:100	Sigma-Aldrich (A2547)
	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em coelho, anti- IgG de rato	1:150	Molecular Probes (A21210)
SECUNDÁRIOS	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em cabra anti- IgG de camundongo	1:200	Molecular Probes (A21131)
	DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	1:300	Molecular Probes (D1306)

**Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta.**

Para esta técnica utilizamos duas lâminas controles, onde a primeira chamada de controle negativo não recebeu no corte nenhum anticorpo, isto nos permitiu verificar se o tecido possuía autofluorescência. A segunda lâmina controle é o controle do anticorpo secundário, no qual o corte não recebeu anticorpo primário mas recebeu anticorpo secundário. Com isso conseguimos verificar se o mesmo é capaz de se ligar a outra molécula, que não o anticorpo primário.

#### **4.11 Análise histopatológica qualitativa e quantitativa da área da lesão**

Através da coloração de H&E, foi possível realizar uma descrição qualitativa do reparo de pele, bem como quantificar o infiltrado de leucócitos e fibroblastos presentes nas lesões e a verificação da presença ou não de estruturas como glândulas sebáceas, folículo piloso, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo, infiltrado inflamatório e tecido de granulação. A coloração de

Alcian Blue + Safranina permitiu a quantificação de mastócitos presentes na área da lesão e na derme adjacente a lesão. O Tricromático de Masson possibilitou a visualização do tecido conjuntivo para análise qualitativa da disposição das fibras colágenas depositadas na área de reparo da lesão.

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal LSM 880 da ZEISS, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagem (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### **4.12 Aquisição de imagens**

As imagens representativas dos cortes corados com H&E, Alcian Blue + Safranina e Tricromático de Masson foram obtidas utilizando o Scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary).

As imagens dos cortes utilizados na técnica de imunofluorescência foram adquiridos com a utilização do microscópio confocal LSM 880 da Zeiss.

#### **4.13 Medida da área, em vista macroscópica, da ferida excisional**

Fotografias da área da ferida foram feitas nos dias 0 e 7 dias após a realização das lesões. Para isso os animais foram anestesiados e posicionados ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram feitas com máquina digital Nikon Coolpix S3100, mantida todo tempo a uma distância constante da região fotografada, por intermédio de um tripé, sendo as imagens posteriormente analisadas com o programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio,

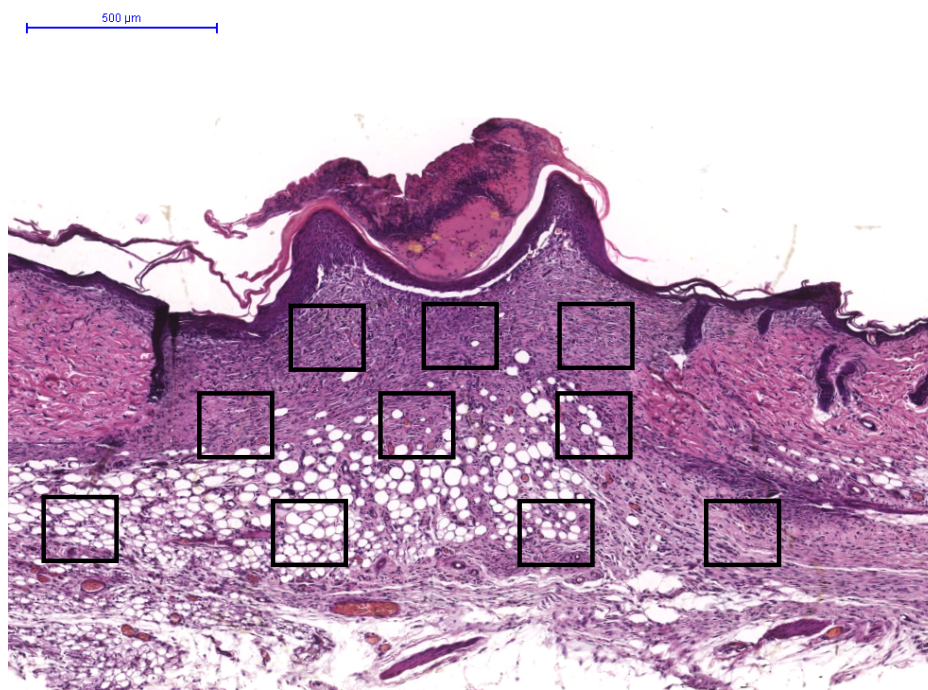
Texas USA), através do qual a área da lesão foi determinada em mm<sup>2</sup>.

#### 4.14 Análise morfométrica em microscopia de luz

O número de leucócitos, mastócitos, fibroblastos, foram determinados na área lesionada 7 dias após realização da ferida. Para isso, foi utilizada a objetiva de 100x e contadas dez áreas de 100 µm<sup>2</sup> cada uma dentro da região lesionada, com auxílio de um retículo acoplado à ocular do microscópio (Figura 6). As áreas analisadas foram determinadas seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido, com espaçamento de 100 a 300 µm entre diferentes regiões a depender da característica da região de reparo, conforme ilustrado na figura 7.



Figura 6. Retículo utilizado para análises morfométricas. O retículo apresenta uma área de 100 µm<sup>2</sup> e é acoplado à ocular do microscópio.



**Figura 7. Posição de campos para análise morfométrica na área da lesão do tipo excisional.**

#### **4.15 Análise em microscópio confocal**

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscópio confocal Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Foram capturadas 5 imagens em diferentes áreas da região de reparo. A escolha das áreas foi feita seguindo uma linha reta, sempre deslocando o campo em um único sentido. A intensidade de fluorescência foi analisada com auxílio do programa Image Tool Version 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA) e do programa Zeiss LSM ImageExaminer.

A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade “Nível de Cinza”, que varia do valor zero (preto) ao valor 255 (branco). Quanto mais próximo ao valor 255, maior a intensidade fluorescência. Para a análise

quantitativa todos os parâmetros de configuração do microscópio obtidos no início da aquisição dos dados foram mantidos para cada anticorpo usado para as amostras de todos os grupos experimentais e controle do anticorpo secundário, tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e possível de comparação.

#### 4.16 Análise da atividade da enzima mieloperoxidase (mpo) em fragmentos de pele contendo a área da lesão

A dosagem de MPO permite uma quantificação indireta de neutrófilos. Para realização desta técnica, utilizamos animais C57BL/6 com 8 semanas de idade, divididos cinco grupos conforme representado pela figura 8.

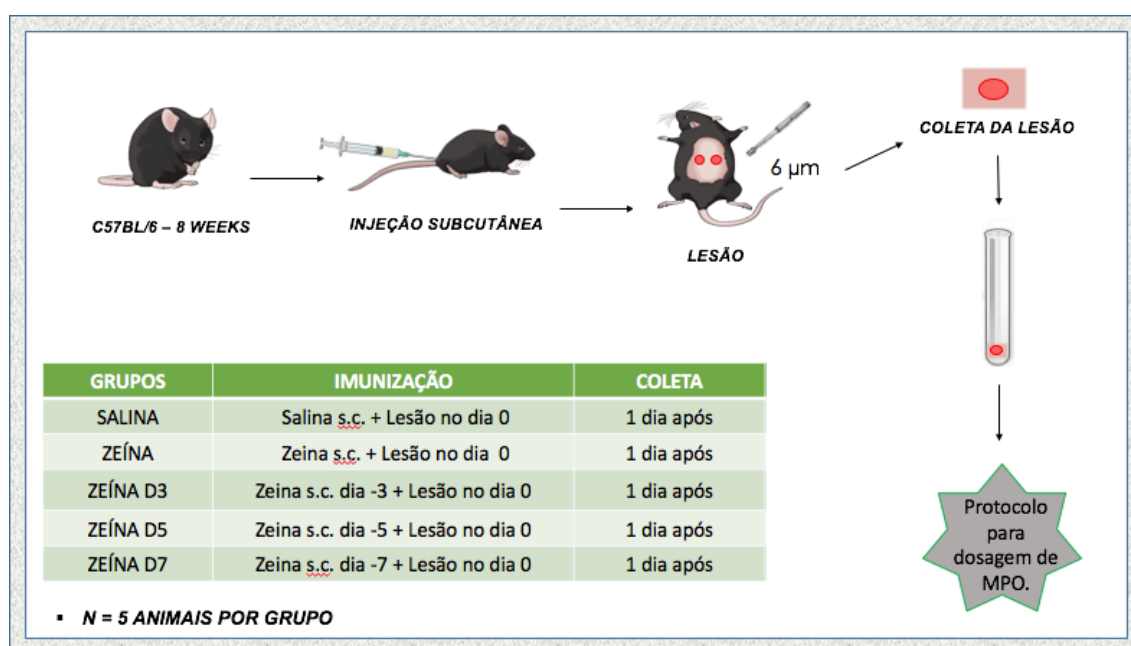


Figura 8. Protocolo experimental para análise da atividade da enzima MPO em fragmentos de pele contendo a área lesionada.

Para quantificação de MPO, a pele foi coletada 1 dia após a realização das lesões e as amostras frescas foram colocadas em tubos de microcentrífuga e submetidos aos seguintes procedimentos:

**1ª)** Pesagem e homogeneização do tecido em solução tampão 1. Procedimento realizado no gelo.

**2º).** Centrifugação: 10.000 x g por 10 min 4°C.

**3º).** O sobrenadante deve ser eliminado e o sedimento submetido a lise hipotônica como se segue: Ressuspender o sedimento em 1 ml de NaCl a 0,2% durante 30s, e depois adicionar 1 ml de uma solução de NaCl a 1,6% glucose 5%.

**4º).** Centrifugação: 10.000 xg por 10 min 4°C.

**5º).** O sobrenadante de ser eliminado e ressuspensionado em tampão 2 (1 ml de tampão).

**6º).** Vórtex e, em seguida, congelar e descongelar três vezes usando nitrogênio líquido. O degelo pode ser realizado sob água corrente.

**7º).** Centrifugação: 10.000 x g por 10 min 4°C.

**8º).** Os sobrenadantes para ensaio enzimático devem guardados se o ensaio enzimático de MPO não for realizado imediatamente, a uma temperatura de -20°C até serem utilizados).

**9º).** As amostras amostras devem ser diluídas em tampão 2 a temperatura ambiente (Diluição 1:3)

**10º).** Para testar, adicione 25 µl de amostras de sobrenadantes diluídos (ou tampão 2, usado com branco) por poço em microplacas de 96 poços. Todas as amostras devem ser executadas em duplicato.

**11º).** Adicione 25 µl de solução de substrato de MPO.

12º). Incubação: 5 min a 37°C.

13º). Adicione 25 µl de 0,002% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

14º). Incubação: 5 min a 37°C.

15º). Interromper a reação com 25 µl de 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

16º). Leia a 450 nm.

17º). Calcule a atividade relativa da MPO como segue: (Espectro de absorção da amostra - Espectro de absorção em branco) x fator de diluição da amostra. Exprese resultados como unidades relativas (atividade de MPO/100 mg) que denotam atividade de MPO por 100 mg de tecido.

#### - Soluções Tampão:

Tampão 1 (pH 4,7)

NaCl 5,84 g (concentração final 0,1 M)

de Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> 3,12 g (concentração final de 0,02 M)

de Na<sub>2</sub> EDTA 5,58 g (adicionar esta apenas após ajustamento do pH) (0,015 M de concentração final)

MilliQ qsp água 1000 ml

Tampão 2 (pH 5,4)

Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> 7,8 g (concentração final de 0,05 M)

HTAB 5 g (adicionar somente após ajuste de pH) (0,5% p / v concentração final)

MilliQ água qsp 1.000 ml

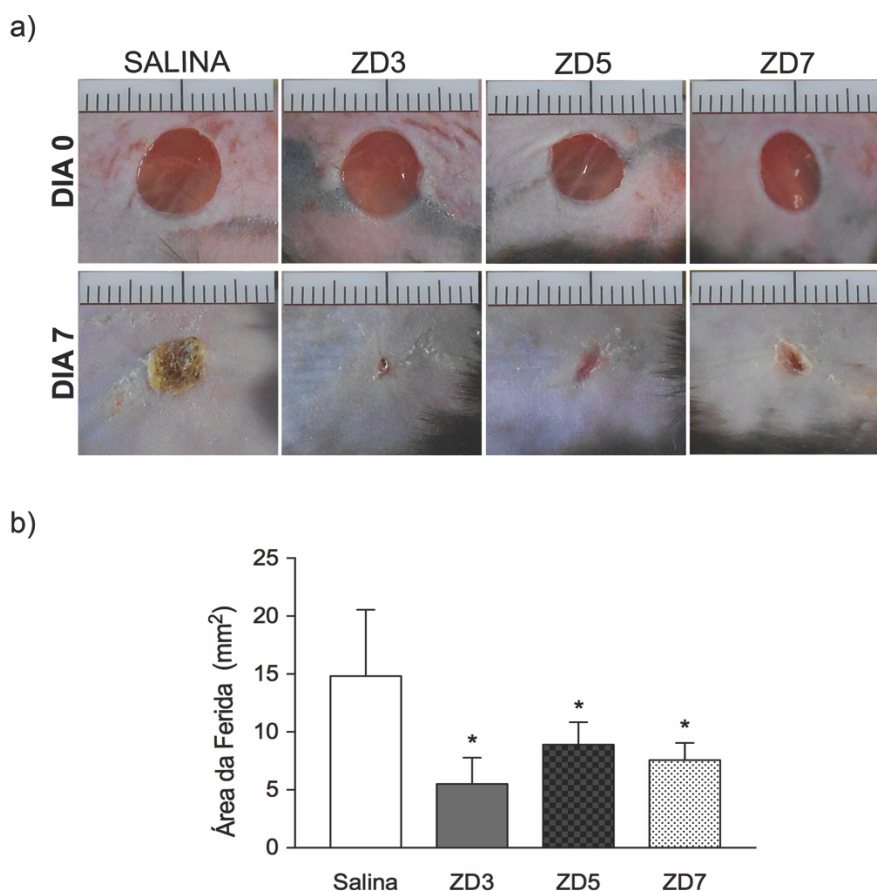
#### **4.16 Análise estatística dos resultados**

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graphpad Prism7 (GraphPad Software, CA, USA). A significância das diferenças entre os grupos foi determinada através da análise de variância utilizando o teste One way ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn's ou teste T de Student não pareado. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos e os resultados serão expressos como a média  $\pm$  SEM.

## 5 Resultados

### 5.1 Análise do fechamento das lesões

A injeção s.c da proteína Zeína nos dias 3, 5 e 7 antes da realização das lesões reduziu a área da ferida no sétimo dia da realização das mesmas, quando comparadas a área das feridas dos animais do grupo controle Salina (Figura 9).



**FIGURA 9. A injeção subcutânea de zeína dias antes de lesões na pele de camundongos reduz a área da ferida.** a) Imagens representativas das lesões no dia em que foram feitas (dia 0) e 7 depois. Os camundongos receberam injeção s.c. de salina ou zeína nos dias 3, 5 e 7 antes da realização das lesões no dorso. b) Gráfico mostra área das lesões no dia 7 pós-lesão. Asteriscos representam diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) em comparação ao grupo salina. Dados representam a média  $\pm$  SEM.  $n = 6$  animais, 12 lesões.

## 5.2 Análises microscópicas qualitativas e morfométricas das alterações produzidas pela injeção s.c da proteína Zeína dias antes da realização de lesões na pele de camundongos.

No dia 7 após as lesões, foi feita a análise qualitativa na pele corada com H&E para avaliação dos aspectos gerais do tecido como: reepitelização, infiltrado inflamatório, maturidade do tecido formado, dentre outros aspectos (Figura 9A).

No grupo controle **Salina** (fig.10 A), foi observado que todos os animais apresentavam reepitelização completa e que todos os animais apresentavam uma crosta sobre a área da lesão. Além disso, o epitélio neoformado apresentava-se hiperplásico e acima da linha normal em comparação ao epitélio da derme adjacente. A área da lesão desses animais era extensa, preenchida por um tecido de granulação com alta celularidade de leucócitos e fibroblastos, além da deposição de colágeno apresentar características de pouca maturidade. A derme adjacente à lesão e a camada muscular da derme tinham leucócitos espalhados, indicando que a inflamação não se limitou à área lesionada. Também foi observada a presença de tecido adiposo abaixo da área da lesão e a presença de vasos sanguíneos na área lesionada.

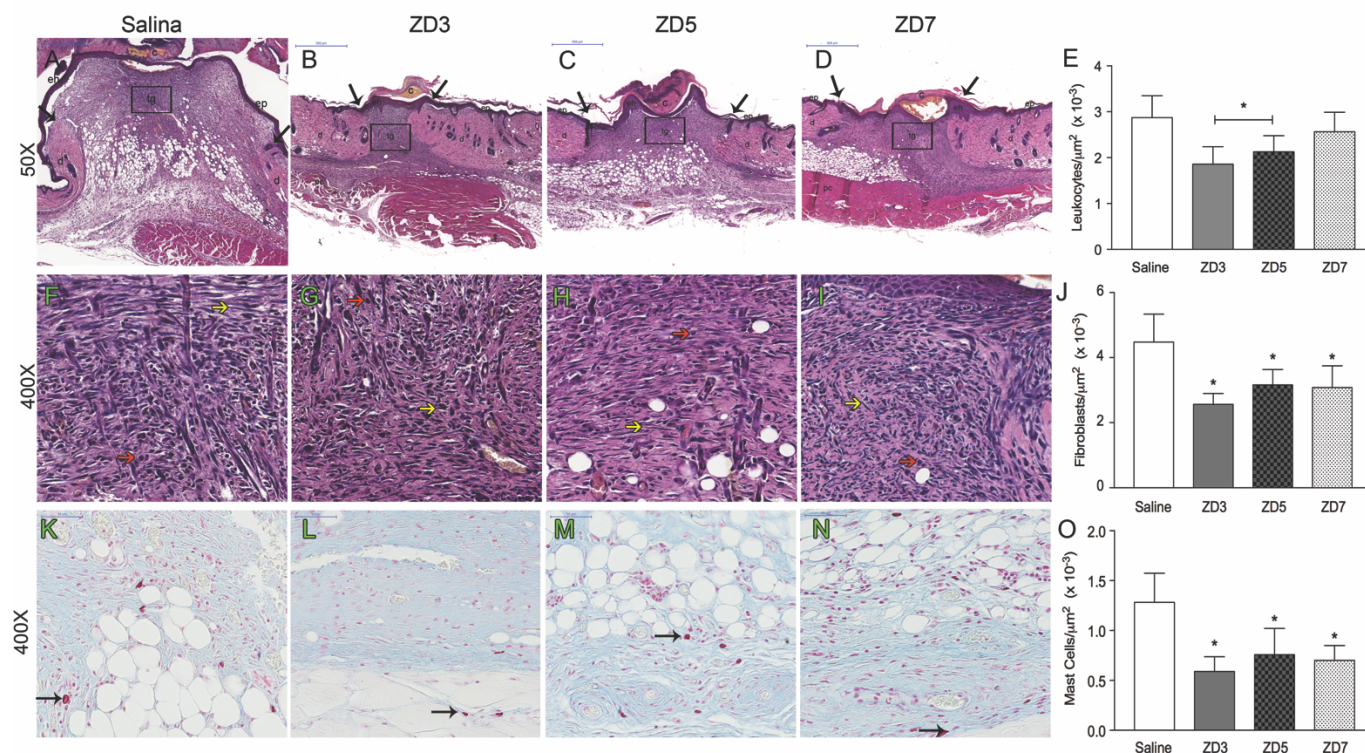
No grupo **Zeína dia 3** (fig.10 B), todos os animais apresentavam reepitelização completa e pequena ou nenhuma crosta sobre a área da lesão. O novo epitélio formado apresentava-se pouco hiperplásico e pouco acima da linha normal em comparação ao epitélio da derme adjacente e ao grupo Salina. A área da lesão exibia um pequeno e contido tecido de granulação, com menor

celularidade leucocitária e de fibroblastos em relação ao controle salina. Essa região apresentava características de maior deposição de colágeno, o que torna esse tecido menos frouxo e mais maduro. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular apresentaram menor número de células inflamatórias espalhados em relação ao grupo salina. Em todos os animais pode se observar a presença de tecido adiposo.

No grupo **Zeína dia 5** (fig.10 C), todos os animais deste grupo tiveram reepitelização completa e os animais tinham pequenas crostas sobre a área da lesão. O novo epitélio formado apresentava-se hiperplásico e acima da linha normal em comparação ao epitélio da derme adjacente. A área da lesão apresentava um pequeno e contido tecido de granulação, que continha menor celularidade de leucócitos e fibroblastos quando comparados ao grupo Salina. Essa região apresentava características de maior deposição de colágeno, o que torna esse tecido menos frouxo e mais maduro. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular apresentavam células inflamatórias espalhados. Em todos os animais pode se observar a presença de tecido adiposo.

No grupo **Zeína dia 7** (fig.10 D), a maioria dos animais tiveram reepitelização completa e tinham pequenas crostas sobre a área da lesão. O novo epitélio formado apresentava-se hiperplásico e acima da linha normal em comparação ao epitélio da derme adjacente. A área da lesão apresentava um extenso tecido de granulação, que continha maior número de leucócitos e fibroblastos, assim como observado no grupo Salina. No entanto, essa região apresenta características de maior deposição de colágeno, o que torna esse

tecido menos frouxo e mais maduro. A derme adjacente à área da lesão e a camada muscular apresentaram células inflamatórias espalhados. Em todos os animais pode se observar a presença de tecido adiposo.

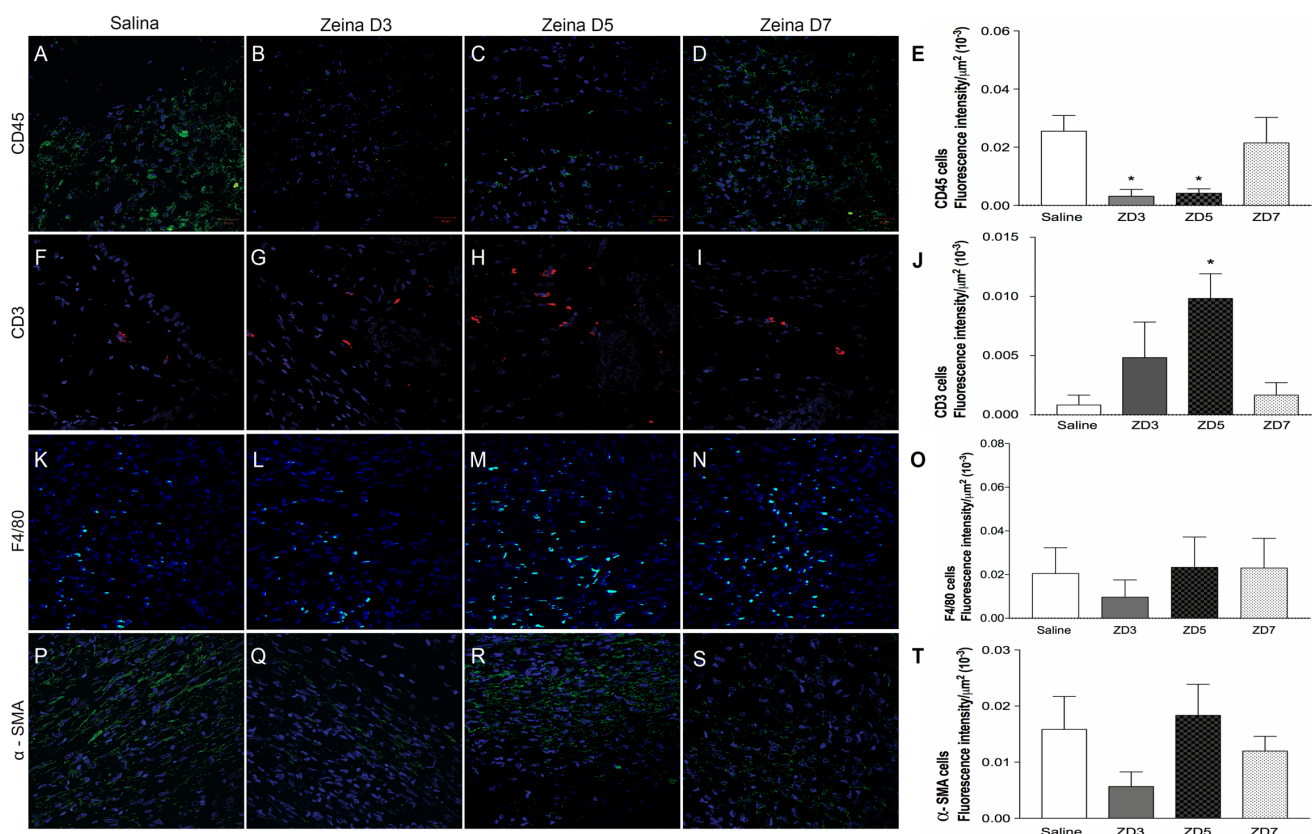


**FIGURA 10. Injeção subcutânea de zeína até 5 dias antes das lesões reduz o infiltrado leucocitário.** A-I) Coloração histológica de H&E em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesão no dorso de camundongos que foram injetados com salina minutos antes da lesão, e de animais que foram injetados com zeína + adjuvante nos dias 3, 5 e 7 antes da lesão. As setas pretas em menor aumento indicam o local onde foi realizada a lesão e as letras pequenas representam: c, crosta; e, epiderme; he, epiderme hipertrófica; tg, tecido de granulação; d, derme; pc, panículo carnoso. Caixas nos painéis superiores indicam a área onde as regiões são mostradas em maior ampliação para ilustrar leucócitos (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas). K-N) Coloração histológica de Alcian Blue + Safranina em fragmentos de pele 7 dias após a realização de lesão no dorso de camundongos, para análise de mastócitos (setas pretas). Barra de escala: painéis superiores, 500 $\mu\text{m}$ ; painéis centrais, 200 $\mu\text{m}$ ; painéis inferiores, 50 $\mu\text{m}$ . Análises morfométricas de leucócitos (E) fibroblastos (J) e mastócitos (O). Os dados representam a média  $\pm$ SEM \*  $P \leq 0,05$  quando comparados com o grupo salina. n= 6 animais.

Análises morfométricas (Figura 10) dos cortes corados com H&E ou com Alcian Blue + Safranina mostraram que os animais que receberam injeção de zeína dias 3 (ZD3) ou 5 (ZD5) antes das lesões, apresentaram uma redução significativa do número leucócitos, fibroblastos e mastócitos, quando comparados ao grupo controle Salina. O grupo que recebeu a injeção de zeína 7 dias (ZD7) antes das lesões, apresentou redução do número de mastócitos e de fibroblastos mas não do total de leucócitos.

### **5.3 Análise de leucócitos, linfócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida**

Os leucócitos (CD45), linfócitos (CD3), macrófagos (F4/80) e miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA) foram avaliados através da técnica de imunofluorescência (Figura 11). A intensidade de fluorescência dos leucócitos (Figura 11 E) foi maior nos grupos Salina e Zeína D7 (ZD7), confirmando o que foi encontrado na análise histológica com H&E, onde esses mesmos grupos apresentaram maior número de células inflamatórias no leito da ferida. A análise dos linfócitos nos mostrou que os grupos Zeína D3 (ZD3) e Zeína D5 (ZD5) tiveram maior intensidade de fluorescência quando comparados ao grupo controle Salina e ZD7 (Figura 11 J) . Para os macrófagos (Figura 11 O) e miofibroblastos (Figura 11 T) não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

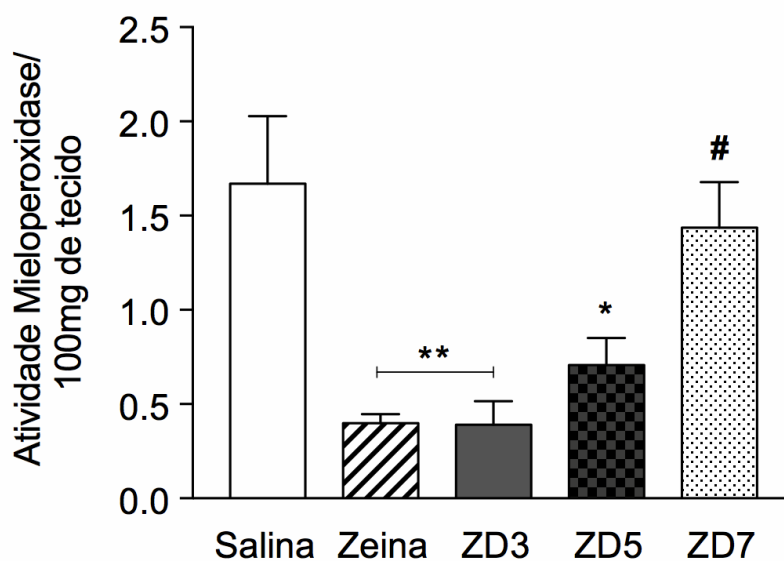


**Figura 11. Análise de leucócitos, linfócitos, macrófagos e miofibroblastos no leito da ferida de animais que receberam a injeção s.c de zeína dias antes da lesão no dorso.** A-T) imagens representativas de imunofluorescência com anticorpos anti-CD45 (A-D), anti-CD3 (F-J), anti-F4/80 (K-N), anti- $\alpha$ -SMA (P-S) e DAPI em feridas de pele coletadas 7 dias após as lesões para quantificação respectivamente de leucócitos (E) linfócitos (J) macrófagos (O) e miofibroblastos (T) cujos gráficos representam a intensidade de fluorescência ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ ) nos diferentes grupos. Em \*  $P \leq 0,05$ , estatisticamente diferente dos demais grupos. Objetivas de 63X com escala de 20  $\mu\text{m}$ . n=6 animais.

#### 5.4 Análise da atividade da enzima mieloperoxidase em extrato de pele contendo a lesão

O gráfico da figura 12 demonstra a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em 100 mg de extrato de pele, contendo a área lesionada, coletada 1 dia após a realização da lesão no dorso. Podemos observar que o grupo controle Salina e o grupo Zeína dia 7 (ZD7) apresentaram maior atividade desta enzima quando comparados aos grupos que receberam a injeção da proteína no dia da

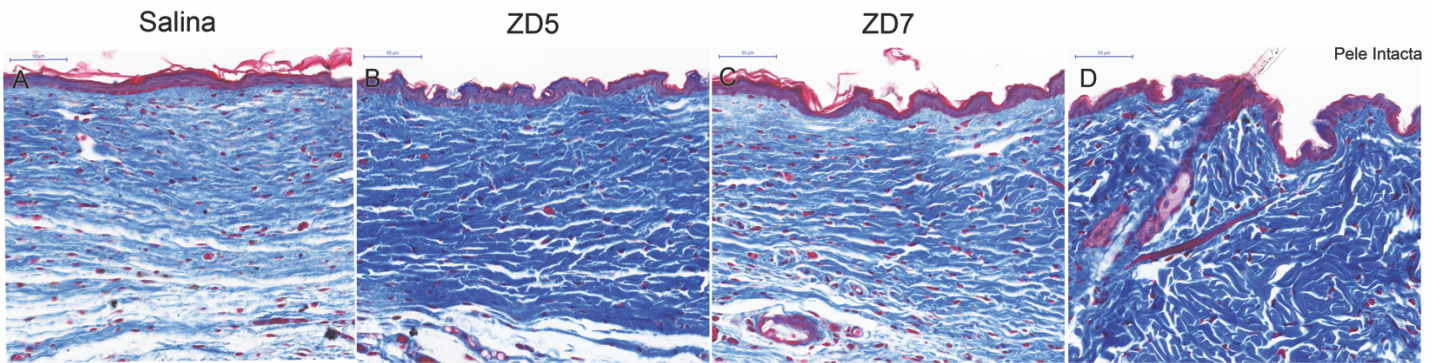
lesão (ZD0), 3 e 5 dias antes da lesão (ZD3 e ZD5). Este resultado nos confirma os resultados prévios encontrados na análise microscópica qualitativa, onde a injeção da proteína tolerada 3 e 5 dias antes da realização das lesões reduz a inflamação.



**Figura 12. Atividade da enzima mieloperoxidase em 100 mg de pele contendo a área lesionada.** Fragmentos de pele contendo a área lesionada foram coletadas após 1 dia de realização das lesões para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Média  $\pm$ SEM. Em \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,01$  estatisticamente diferente do grupo salina e em # estatisticamente diferente dos grupos Zeína e ZD3.

## 5.5 Análise da matriz extracelular 40 dias após a lesão

Aos 40 dias após a lesão, avaliamos como estava o padrão de deposição das fibras de colágeno na derme no tecido cicatricial (Figura 13). A derme de uma pele intacta apresenta deposição das fibras de colágeno em vários sentidos, denominada como do tipo cesta, além de serem mais espessas. Além disso, o epitélio de uma pele intacta apresenta projeções na derme, mais conhecida como derme papilar. O que podemos observar nas fotomicrografias representadas é que em todos os grupos houve reconstituição total do epitélio, e este epitélio se apresentava alinhado com a derme adjacente. Nos grupos que receberam a proteína zeína há uma maior reorganização da derme papilar na área da cicatriz, o que não podemos observar no grupo salina. Há diferenças em relação à deposição do colágeno nos grupos que receberam a proteína tolerada, cinco ZD5 ou sete ZD7 dias antes da lesão. No grupo ZD5 ocorreu o padrão de deposição do tipo cesta e com fibras espessas, se assemelhando bastante a uma derme intacta. Já grupo ZD7 é mais parecido com o grupo salina que apresenta fibras mais finas, com orientação paralela. Não houve regeneração dos anexos da pele, como folículo piloso e glândulas em nenhum grupo.



**FIGURA 13. A injeção subcutânea de zeína dias antes da realização de lesões no dorso melhora a deposição de colágeno** A-D) Coloração histológica de Tricomático de Masson em fragmentos de pele coletados 40 dias após a realização das lesões no dorso de camundongos que foram injetados com salina minutos antes da lesão, e de animais que foram injetados com zeína + adjuvante nos dias 5 e 7 antes da lesão. Cortes corados com Tricomático de Masson para análise da deposição das fibras de colágeno.

## 6 Discussão

De acordo com o Ministério da Saúde o número de cirurgias eletivas no Brasil cresceu 39,1% em oito meses no ano de 2016, passando de 109.720 em janeiro para 152.632 no mês de setembro. São procedimentos cirúrgicos de média e alta complexidade de todas as especialidades médicas, agendadas, sem caráter de urgência e emergência. Esses procedimentos fazem parte da rotina dos atendimentos oferecidos à população nos hospitais de todo o país, de forma integral e gratuita, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS).

A qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes são gravemente afetadas quando os processos normais de cicatrização de feridas e reparo de tecidos se tornam desregulados. A cura deficiente ou insuficiente é característica das feridas crônicas que causam mortalidade e morbidade em cerca de 2% dos pacientes afetados nos países ocidentais. Por outro lado, a cicatrização excessiva leva ao acúmulo de matriz extracelular (MEC), uma condição chamada fibrose. Estima-se que a fibrose contribua para 33% das mortes no mundo e 45% nas nações industrializadas. Os custos de assistência médica associados à cicatrização de feridas atingiram dezenas de bilhões de dólares por ano nos EUA, e estima-se que esses custos aumentem ainda mais (HINZ, 2016).

Portanto, existe um grande interesse clínico em desenvolver estratégias terapêuticas para solucionar complicações durante o processo de cicatrização de feridas, visto que, as terapias atuais possuem resultados limitados. Além

disso, é cada vez mais crescente o número de cirurgias programadas realizadas todos os anos no Brasil e no mundo, acarretando no aumento do número de pacientes com algum tipo de lesão tecidual. Logo, é necessário encontrar novas maneiras de melhorar as estratégias regenerativas e uma delas pode ser através de modificações do sistema imunológico do indivíduo.

Com isso, os estudos sobre os efeitos indiretos da tolerância oral durante o processo de cicatrização de feridas permite que novas estratégias terapêuticas possam ser desenvolvidas, pois este é um fenômeno capaz de modificar a resposta inflamatória de forma sistêmica sendo associada a melhoras em diversas patologias, dentre elas a cicatrização de feridas.

O contato com proteínas através da via oral tem efeitos imunológicos que normalmente não resultam em aumentos dos títulos de anticorpos específicos no soro, que seriam característicos da imunização (VERDOLIN et al., 2001). Além disso, a re-exposição por via parenteral a proteínas previamente dadas por via oral não resulta em imunização, caracterizando assim o fenômeno imunológico denominado, tolerância oral. Este fenômeno tem efeitos sistêmicos que inibem a proliferação de linfócitos e produção de anticorpos (OLIVEIRA et al., 2015). Embora há muito tempo estudada, a tolerância oral ainda não é bem entendida, o que provavelmente decorre da inexistência de um entendimento mais amplo das relações entre os múltiplos elementos que compõem o sistema imune.

O sistema imunológico está implicado no reparo e regeneração de tecidos. Por exemplo, a inflamação após a lesão contribui para a reparação dos

tecidos e para a formação de cicatriz, e a inflamação excessiva conduzida pelas células imunes, causa fibrose patológica que debilita a função do tecido (EMING; WYNN; MARTIN, 2017). Estudos sobre o reparo de tecidos em organismos embrionários, incluindo camundongos e pacientes humanos submetidos à cirurgia fetal, indicaram que lesões nos tecidos que ainda não produzem resposta inflamatória pode se fechar sem cicatrizes, sugerindo que a inflamação pode estar conduzindo à fibrose da ferida (MARTIN; NUNAN, 2015).

A injeção parenteral de uma proteína tolerada em adjuvante, leva a uma diminuição das respostas imunes para outras proteínas injetadas concomitantemente ou logo em seguida. Esse fenômeno é conhecido como efeitos indiretos da tolerância oral (CARVALHO et al., 1994; CARVALHO; VERDOLIN; VAZ, 1997). Através dele é possível inibir o aumento de anticorpos anti-DNP-OVA em camundongos que receberam injeção parenteral de zeína. Ou seja, camundongos que são alimentados constantemente com ração comercial contendo milho e imunizados com DNP-OVA mais zeína, produzem níveis significativamente reduzidos de anticorpos anti-DNP-OVA. (CARVALHO; VAZ, 1996). E mais ainda, os efeitos indiretos e sistêmicos da re-exposição por via parenteral a proteínas previamente contactadas por via oral diminuem a inflamação e melhoram o reparo de lesões na pele de camundongos (CANTARUTI et al., 2017; COSTA et al., 2011, 2016). Nestes trabalhos prévios (CANTARUTI et al., 2017; COSTA et al., 2011, 2016) a injeção parenteral da proteína tolerada foi realizada minutos antes das lesões.

Aqui estudamos se os efeitos anti-inflamatórios gerados pela injeção s.c da proteína tolerada zeína persistem no organismos mesmo quando esta injeção é aplicada dias antes da realização de lesões na pele de camundongos. Mostramos que a injeção s.c da proteína tolerada tem a capacidade de reduzir a área macroscópica da ferida mesmo quando injetada até 7 dias antes das lesões. No entanto, considerando todos os aspectos analisados, nota-se que a injeção da proteína tolerada 7 dias antes das lesões tem menor efeito do que quando injetada até 5 dias antes. Estudos anteriores nos mostraram que a injeção da proteína tolerada até 6 horas depois da lesão reduz o número de leucócitos no leito da ferida, no entanto, quando esta injeção é administrada 24 horas depois da lesão, não ocorre redução do processo inflamatório em curso (CANTARUTI et al., 2017). Estes resultados indicam que existe um tempo de ação da proteína tolerada, e que este tempo interfere na capacidade de modulação do sistema imune frente a uma lesão.

Curiosamente, o grupo analisado que mais chamou atenção foi o grupo ZD7, que recebeu a proteína tolerada Zeína 7 dias antes das lesões, pois mostra que com este intervalo de tempo entre a injeção da proteína tolerada e a lesão não ocorrem mais os efeitos observados com intervalos menores. Em resumo, no grupo ZD7 observamos que os aspectos inflamatórios estavam aumentados em relação aos grupos que receberam Zeína 3 e 5 dias antes, como por exemplo, o número de leucócitos globais e de neutrófilos (MPO) no leito da ferida. Além disto, o número de linfócitos T não estava aumentado no grupo ZD7 em relação ao controle salina. A deposição de colágeno no grupo ZD7 estava mais parecido com o controle salina que não recebeu injeção de Zeína. Dados da literatura

mostram que a injeção da proteína tolerada 7 dias antes de uma proteína não relacionada não mais produzem inibição dos anticorpos para a segunda proteína (CARVALHO; VERDOLIN; VAZ, 1997). Em conjunto, estes dados nos mostram que os efeitos da injeção de proteínas toleradas têm um período de ação de cerca de 5 dias para afetar de maneira indireta e sistêmica a ativação de linfócitos. Estes dados sugerem que redução dos neutrófilos e aumento de linfócitos no leito da ferida é importante para que ocorra reorganização da matriz extracelular de maneira mais parecida com a pele intacta.

Por outro lado, no grupo ZD7 o número de mastócitos estava reduzido assim como nos demais grupos que receberam a proteína tolerada, ZD3 e ZD5. Portanto, os efeitos da injeção da proteína tolerada ainda repercute na redução de mastócitos até 7 dias após a sua injeção. Uma vez que os mastócitos são células residentes na pele e a injeção da proteína tolerada foi por via s.c., na base da cauda, seria interessante verificar se há recrutamento de mastócitos para a região da injeção s.c o que poderia reduzir os mastócitos da pele no momento da lesão. De qualquer maneira, esta redução dos mastócitos no grupo ZD7 pode ser o fator que tornou este grupo com um reparo diferente do grupo salina aos 7 dias após a lesão, ou seja com menor área de tecido de granulação.

Os mastócitos podem atuar como células importantes no processo de reparo de feridas, o que já é discutido em alguns trabalhos recentes, que tem demonstrado que os mastócitos tem influência significativa no processo de reparo de pele. Segundo Lin Chen e colaboradores (2014), a ativação de mastócitos pode influenciar no remodelamento da ferida, pois o excesso de

inflamação e a produção de citocinas pró-inflamatórias podem promover a formação de cicatrizes patológicas. (CHEN et al., 2014). Dados os muitos mecanismos pelos quais os mastócitos podem mediar os efeitos imunoestimuladores, o principal papel dos mastócitos costuma ser o de ativar uma resposta imune. Entretanto, os mastócitos também têm funções que podem diminuir a inflamação, a remodelação tecidual e a lesão tecidual. Assim, essas células têm o potencial de desativar as respostas imunes, bem como ativá-las (GALLI; GRIMBALDESTON; TSAI, 2008).

Por outro lado, existem estudos que demonstram que os mastócitos não participam de forma determinante para o processo de cicatrização de feridas. Estas células possuem importantes funções que podem estar associadas a ambientes biológicos específicos, diferentes locais anatômicos, entre camundongos de diferentes cepas e entre camundongos, humanos e outras espécies (GALLI, 2014). Por esta razão não se pode afirmar que é redução dos mastócitos que está contribuindo de forma determinante para o melhor reparo da lesão nos animais que receberam a injeção da proteína tolerada, sendo necessário mais estudos sobre a participação destas células na ativação do sistema imune, manutenção e resolução da inflamação.

Os efeitos indiretos da tolerância oral interferem nos elementos celulares durante o processo de reparo tecidual, visto que este fenômeno conta com participação de diferentes células e um grande número de fatores de crescimento e citocinas (ROLFE; GROBBELAAR, 2012).

A análise quantitativa de leucócitos (CD45+) mostrou que os grupos que receberam a injeção de zeína até 5 dias antes das lesões, apresentavam menor número de leucócitos na área da lesão. Outro dado importante visto foi que estes mesmos grupos que apresentaram menor número de leucócitos, estavam com maior número de linfócitos T (CD3+).

Em muitos tecidos, os linfócitos T são recrutados para o local danificado para facilitar a resolução da inflamação e regular a imunidade após a lesão, através da regulação de células T helper, polarização de macrófagos e controle de neutrófilos. Isto tem sido amplamente demonstrado como envolvido no processo de cicatrização tecidual (LI et al., 2018). Estudos mostraram que os linfócitos T reguladores (Tregs) tem a capacidade de modular a cicatrização do tecido através do controle do comportamento dos neutrófilos, que passam a secretar moléculas anti-inflamatórias incluindo IL-10 e TGF- $\beta$  (LEWKOWICZ et al., 2013).

Através da análise da atividade da enzima Mieloperoxidases (MPO), encontrada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, e que desempenham um papel crucial na inflamação e estresse oxidativo no nível celular, foi visto que de fato a atividade desta enzima estava menor nos grupos tolerantes a zeína e que estes apresentavam aumento do número de linfócitos T (Figuras 12J e 13). Estes resultados indicam que a injeção da proteína tolerada, mesmo quando injetada dias antes de lesões na pele, pode modular a ativação e regulação das células imunes envolvidas no processo de reparo de feridas cutâneas.

Outro dado importante observado neste trabalho foi um menor número de fibroblastos e uma tendência a menor intensidade do marcador  $\alpha$ -SMA (miofibroblastos) nos animais que receberam a injeção de zeína até 3 dias antes das lesões. A ativação de fibroblastos para miofibroblastos é um evento de várias etapas controlado pelo microambiente químico e mecânico em constante mudança em tecidos em reparo. Sabe-se que a persistência da atividade dos miofibroblastos leva à deformação do tecido por retração, levando a formação de um tecido fibrótico característico de cicatrizes hipertróficas (HINZ, 2016).

Os fibroblastos são ativados para a diferenciação em miofibroblastos principalmente por fatores produzidos por macrófagos (DESMOULIÈRE et al., 1995). Nossa análise quantitativa de macrófagos mostrou que os grupos que receberam a proteína tolerada antes da lesão não tiveram redução destas células. Os macrófagos são células que apresentam fenótipos associados à ativação clássica e alternativa, cuja proporção se altera à medida que a ferida amadurece. Durante os estágios iniciais da inflamação, cerca de 85% dos macrófagos têm um fenótipo M1 e secretam proativamente mediadores pró-inflamatórios, enquanto 15% têm um fenótipo M2 que secretam citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (DALEY et al., 2010). No entanto, o marcador utilizado para macrófagos neste trabalho não permite afirmar qual fenótipo essas células estão associadas.

Historicamente, vários estudos sobre o papel dos macrófagos na cicatrização de feridas forneceram algumas dúvidas quanto à necessidade e ao papel dessas células no processo de reparo. A depleção de macrófagos

utilizando anti-soro sugeriu que os macrófagos eram necessários para o processo de reparo (MARTIN et al., 2003). Camundongos que não possuem macrófagos (camundongos PU.1) reparam a pele na mesma proporção que os camundongos controle, reduzindo a formação de cicatriz, sugerindo que os macrófagos regulam a formação de cicatriz, mas não o fechamento da ferida (HESKETH et al., 2017).

No geral, nosso estudo demonstra que a injeção s.c da proteína tolerada tem a capacidade de alterar as características morfológicas e inflamatórias envolvidas no processo de reparo da pele, mesmo quando a injeção é aplicada até 5 dias antes das lesões. Podemos dizer que o efeito da injeção diminui quando aplicado 7 dias antes da realização da lesão no dorso.

## 7 CONCLUSÕES

Os efeitos indiretos da tolerância oral são sistêmicos e interferem no reparo tecidual. Estes efeitos sistêmicos da tolerância oral persistem por até 5 dias e reduzem o infiltrado inflamatório, podendo ser aplicado na prevenção da formação de feridas patológicas.

A injeção s.c da proteína tolerada (zeína), uma proteína presente na ração dos camundongos, quando aplicada até 5 dias antes da realização de lesões no dorso de camundongos foi capaz de:

- Reduzir o número de células inflamatórias no leito da ferida nas fases iniciais do reparo;
- Aumentar o número de Linfócitos T no leito da ferida;
- Melhorar a organização da deposição das fibras de colágeno na neoderme.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, G. M. et al. Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

BESREDKA, A. De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. **Ann Inst Pasteur** 1909.

CANTARUTI, T. A. et al. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. **Immunology**, 2017.

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.

CARVALHO, C. R.; VERDOLIN, B. A.; VAZ, N. M. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1997.

CHEN, L. et al. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. **PLoS ONE**, 2014.

COMMINS, S. P. **Carbohydrates as Allergens** *Current Allergy and Asthma Reports*, 2015.

COSTA, R. A. et al. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. **Wound Repair and Regeneration**, 2011.

COSTA, R. A. et al. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology**, 2016.

DALEY, J. M. et al. The phenotype of murine wound macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, 2010.

DESMOULIÈRE, A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **The American journal of pathology**, 1995.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, 2007.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, 2014.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, 2017.

FARIA, A. M. C. et al. Oral tolerance induced by continuous feeding: Enhanced up-regulation of transforming growth factor- $\beta$ /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunity**, 2003.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral Tolerance: Mechanisms and Therapeutic Applications. Em: [s.l.: s.n.].

GALLI, S. J. Rethinking the potential roles of mast cells in skin wound healing and bleomycin-induced skin fibrosis. **Journal of Investigative Dermatology**, 2014.

GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: Negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, 2008.

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

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2016.

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

HESKETH, M. et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

HINZ, B. The role of myofibroblasts in wound healing. **Current Research in Translational Medicine**, 2016.

KANJI, S.; DAS, H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. **Mediators of Inflammation**, 2017.

KOMI, D. E. A.; KHOMTCHOUK, K.; SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2019.

LAHMANN WM, MENEZES JS, VERDOLIN BA, VAZ NM. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. **Braz J Med Biol Res**, 1992.

LEWKOWICZ, N. et al. Neutrophil - CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cell interactions: A possible new mechanism of infectious tolerance. **Immunobiology**, 2013.

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

MARTIN, P. et al. Wound healing in the PU.1 null mouse - Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. **Current Biology**, 2003.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, 2015.

MAYER, L.; SHAO, L. Therapeutic potential of oral tolerance. **Nature Reviews Immunology**, 2004.

MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Veterinary Pathology**, 2013.

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

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, 2012.

PASTWIŃSKA, J. et al. Mast cells as the strength of the inflammatory process. **Polish Journal of Pathology**, 2017.

PESSATO, T. B. et al. Complexation of whey protein with caffeic acid or (-)-epigallocatechin-3-gallate as a strategy to induce oral tolerance to whey allergenic proteins. **International Immunopharmacology**, 2019.

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

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. **Seminars in Immunology**, 2017.

RICHMAN, L.K., CHILLER, J.M., BROWN, W.R., HANSON, D.G., AND VAZ, N.M. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. **Journal of immunology**, 1978.

RICHMOND, J. M.; HARRIS, J. E. Immunology and skin in health and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2014.

RODRIGUES, C.M., MARTINS-FILHO, O.A., VAZ, N.M., AND CARVALHO, C.R. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. **Immunology**, 2006.

ROLFE, K. J.; GROBBELAAR, A. O. A Review of Fetal Scarless Healing. **ISRN Dermatology**, 2012.

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**, 2001.

WAMBRE, E.; JEONG, D. Oral Tolerance Development and Maintenance. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, 2018.

WELLS, H. G. Studies on the chemistry of anaphylaxis (iii). experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. **Journal of Infectious Diseases**, 1911.

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

WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, 2016.

WONG, V. W.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. **Wound healing: A paradigm for regeneration**. Mayo Clinic Proceedings. **Anais...**2013

WORBS, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, 2006.

ZHAO, R. et al. Inflammation in chronic wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.