

KAREN FRANCO VALENCIA

Aplicação de proteínas toleradas por via subcutânea ou tópica melhora a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2020

KAREN FRANCO VALENCIA

Aplicação de proteínas toleradas por via subcutânea ou tópica melhora a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos

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 Doutora em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho

Co-orientadores:

Dr. Geraldo Magela Azevedo Junior

Prof^a. Dr^a. Raquel Alves Costa

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2020

043

Valencia, Karen Franco.

Aplicação de proteínas toleradas por via subcutânea ou tópica melhora a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos [manuscrito] / Karen Franco Valencia. - 2020.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho. Co-orientadores: Dr. Geraldo Magela Azevedo Junior; Prof^a. Dr^a. Raquel Alves Costa.

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

1. Pele. 2. Inflamação. 3. Matriz Extracelular. 4. Ovalbumina. 5. Zeína. 6. Tolerância Imunológica. I. Carvalho, Cláudia Rocha. II. Azevedo Junior, Geraldo Magela. III. Costa, Raquel Alves. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

222/2020

KAREN FRANCO VALENCIA

2016684520

Às treze horas e trinta minutos do dia 18 de fevereiro de 2020, 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: **"APLICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOLERADAS POR VIA SUBCUTÂNEA OU TÓPICA MELHORA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS"**. 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
Dr ^a . Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	APROVADA
Dr. Geraldo Magela Azevedo Junior	UFMG	APROVADA
Dr ^a . Raquel Alves Costa	São João Del-Rei	APROVADA
Dr ^a . Gisele Viana de Oliveira	Hospital Luxemburgo	APROVADO
Dr ^a . Flávia Carmo Horta Pinto	UFSJ	APROVADO
Dr ^a . Ana Maria Caetano de Faria	UFMG	APROVADA
Ph.D. Gregory Thomas Kitten	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, 18 de fevereiro de 2020.

Dr^a. Cláudia Rocha Carvalho (Orientadora) Cláudia Rocha Carvalho
Dr. Geraldo Magela Azevedo Junior (Coorientador) Geraldo Magela Junior
Dr^a. Raquel Alves Costa (Coorientadora) Raquel Alves Costa
Dr^a. Gisele Viana de Oliveira Gisele Viana
Dr^a. Flávia Carmo Horta Pinto Flávia Carmo Pinto
Dr^a. Ana Maria Caetano de Faria Ana Maria Caetano de Faria
Ph.D. Gregory Thomas Kitten Gregory T. Kitten

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

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

Erika Cristina Jorge

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 a Deus, acredito que tudo o que acontece nesta vida é graças a ele, tendo as respostas a todas nossas perguntas, ainda sendo cientistas.

Agradeço imensamente aos meus pais Rosa Isabel Valencia Mouthon e Eustorgio Franco Mouthon, que me apoiaram incondicionalmente nesta etapa a pesar da distancia, obrigada pelo amor e dedicação, meus companheiros nos momentos de tristeza e saudade, sou muito grata com Deus por ter eles na minha vida.

Meu Pai Eustorgio quem com muita paciência me ajudou um pouco nas analise estatísticas dos experimentos realizados neste trabalho.

Meu irmão Victor Franco Valencia pelos desenhos realizados neste trabalho.

A minha família que esteve torcendo por mim na distancia.

A Organização Dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra do Brasil pela oportunidade em fazer Doutorado como Bolsista do programa de pós-graduação em Biologia Celular da UFMG.

A direção de relações internacionais da UFMG pelo acolhimento e ajuda no inicio do processo de adaptação.

À minha querida amiga Berty com quem coincidi aqui no Brasil pra fazer o doutorado, obrigada pelo apoio sempre na distancia mesmo estando em outro estado do Brasil, pelas inúmeras conversas, ligações, brincadeiras, alegrias, sorrisos, tristezas, visitas e muitas coisas bonitas de uma amizade incondicional. Te quero mi ñatica.

A família Brasileira que me acolheu, Dona Nilce Soares, Sebastião e Sueli.

À Prof^a. Cláudia Rocha Carvalho por ter me recebido no grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos que tive durante este processo do doutorado, pelas brincadeiras, palavras de conforto e ajuda incondicional.

Ao Dr Geraldo Magela de Azevedo-Júnior pela disposição e ajuda sempre nas análises histológicas que permitiram o aprendizado e a compreensão dos resultados obtidos. Também pelas brincadeiras.

Ao Dr. Thiago Cantaruti pela imensa ajuda e paciência nos experimentos, à disposição para ensinar, amizade, brincadeiras, lanches, sorrisos, brigas e conselhos desde que comecei até o final.

À Prof^a. Raquel Alves Costa quem esteve me orientando na padronização de protocolos e na análise de resultados de histologia.

À Isabela Nóbrega pela ajuda e disposição nos experimentos, pela amizade, pelas palavras de conforto em momentos difíceis, sorrisos e brincadeiras.

À Monique Macedo pela amizade e companhia no final deste processo, pelas palavras de conforto, brincadeiras, lanches, momentos de lazer e brigas que fazem parte da convivência do dia a dia.

Aos alunos de iniciação científica, professores e colegas do grupo de pesquisa que conheci e me ajudaram durante este processo de aprendizagem: Profa. Valéria, Daniel, Evany, Sávio, Hennan, Gustavo e Thomson.

Chico pela imensa ajuda nos momentos quando precisei.

À Prof^a. Fernanda Radichi pelos ensinamentos durante estágio didático, pelo carinho e carisma.

Aos meus colegas da pós-graduação pelo companheirismo e ajuda quando precisei: Camila, Puebla, Walyson, Juliane, Ana Paula, Ivys, Ariane.

A todos os amigos que ganhei nesta inesquecível experiência: Angel, Raquel, Liliana, Viviana, Marcio, Júlia, Erick, Laura, Boris, Yuppiel, Karla, Luz Adriana, Jimena, Lucas, Jasmine, Rachel, Lana, Icéu, Martin, Liz, Daniel, Daniela, Abdul, Ana, Miguel, Diana, Drika. Vocês fizeram uma enorme diferença durante meu tempo aqui em Belo Horizonte, MG. Gratidão pela companhia, amizade, sorrisos, alegrias, tristezas, desabafos, passeios e pelas trocas culturais.

A meus padrinhos da UFMG: Rilberte, Gustavo e Juliane.

A meus amigos na distancia que sempre estiveram presentes: Lilibeth Quintero, Guillermo Bravo, Jarol Salgado, Caterine, Yaneth e Liliana Carranza.

A Universidade Simon Bolivar e ao grupo de pesquisa em Genética: Dr. Milton, Grethel, Jaime, Marcos, Martica, Nebis, Dayan, Moises, Antonio.

À UFMG e os Professores da Pós-graduação pelas aulas e ensinamentos tão importantes ao aprendizado e formação.

Lista de Abreviações

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

i.p. – Via intraperitoneal

s.c. Via subcutânea

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

H&E - Hematoxilina e Eosina

MEC – matriz extracelular

α -SMA – Actina Alfa de Músculo Liso

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

TNF – Fator de necrose tumoral

TGF β 1 – Fator de crescimento transformante beta 1

TGF β 3 – Fator de crescimento transformante beta 3

MMP – metaloproteinases

μ g- Microgramas

mg- Miligramas

ml – Mililitros

μ l – Microlitros

mm- Milímetros

OVA – Ovalbumina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

Lista de Figuras

Figura 1. Indução de tolerância oral em camundongos machos C57BL/6.	30
Figura 2. Aplicação subcutânea dorsal próxima na base caudal.....	31
Figura 3. Aplicação tópica utilizando um aplicador com spray.	32
Figura 4. Esquema do protocolo experimental da ferida excisional no dorso de camundongos.....	33
Figura 5. Coleta e processamento histológico para microscopia de Luz de lesões fixadas em formalina de Carson. Lesões fixadas em Metanol+DMSO foram utilizadas para análise de imunohistoquímica em microscopia confocal.	36
Figura 6. Procedimento utilizado para análises morfométricas com grade de inserção de 100 µm ² acoplado à ocular do microscópio para posicionar os campos para análise na área da lesão excisional no dorso.....	37
Figura 7. Injeção subcutânea de Zeína não altera a porcentagem de fechamento da lesão na pele.	43
Figura 8. Injeção subcutânea de Zeína reduz o infiltrado inflamatório na área da lesão.....	44
Figura 9. Injeção s.c. de zeína reduziu o número de leucócitos e miofibroblastos mas aumentou o número de linfócitos T e de macrófagos na área da lesão	46
Figura 10. Fotografias macroscópicas representativas da cicatriz aos 40 dias após a lesão na pele dos grupos controle Salina e Adjuvante e do grupo que recebeu Zeína.	47
Figura 11. Injeção subcutânea de Zeína minutos antes da lesão melhorou a deposição de colágenos na neoderme.....	48
Figura 12. A injeção s.c. de Zeína melhorou a deposição das fibras elásticas após a lesão.....	50
Figura 13. A aplicação tópica de Zeína ou OVA não interferiu com o fechamento da lesão na pele.	52
Figura 14. A aplicação tópica de Zeína ou OVA que ingeriram estas proteínas reduziu o infiltrado inflamatório nas lesões.	53

Figura 15. A aplicação tópica de OVA e Zeina em camundongos que ingeriram estas proteínas reduziu o número de mastócitos.....	54
Figura 16. A aplicação tópica de OVA e Zeina em camundongos que ingeriram estas proteínas reduziu o número de leucócitos e miofibroblastos e não alterou a expressão de Vimentina.....	56
Figura 17. A aplicação tópica de Zeina e OVA nas lesões de camundongos tolerantes melhorou a organização da matriz extracelular	58
Figura 18. A área de transição entre o tecido de granulação e a derme adjacente se mostrou mais suave nos animais que receberam a aplicação tópica de Zeina.	59
Figura 19. A aplicação tópica de Zeina na lesão atenuou a cicatriz.	60
Figura 20. A aplicação tópica de Zeina na lesão melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme.	61
Figura 21. A aplicação tópica de Zeina na lesão melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme.	63
Figura 22. As aplicações de Zeina ou OVA nas lesões da pele do dorso de animais que ingeriram previamente estas proteínas reduziu o número de mastócitos mas não alterou o número total de leucócitos nem de fibroblastos em lesões concomitantes nas orelhas.	65

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Delineamento experimental da imunização com a proteína tolerada através da injeção subcutânea minutos antes de realizar a lesão. 31
- Tabela 2.** Delineamento experimental da imunização com as proteínas toleradas através da aplicação tópica durante 7 dias consecutivos após de realizar a lesão. 32
- Tabela 3.** Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta..... 40
- Tabela 4.** Delineamento experimental da aplicação tópica de proteínas toleradas em lesões simultâneas para verificar se tem efeitos sistêmicos. 41

Resumo

O reparo de lesões na pele depende de interações entre vários tipos de células que resultam em inflamação local e ativação, migração e proliferação de queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. Através da tolerância oral, fenômeno imunológico que ocorre após a ingestão de proteínas, é possível inibir a produção de anticorpos e a reduzir a inflamação. Trabalhos anteriores mostraram que uma injeção intraperitoneal de proteínas previamente ingeridas em adjuvante, minutos antes de uma lesão na pele de camundongos, reduz a inflamação e melhora a cicatrização. O objetivo deste trabalho foi avaliar se outras duas vias de aplicação - a injeção por via subcutânea (s.c.) e a aplicação tópica - de proteínas previamente ingeridas também melhoram a cicatrização de feridas. Utilizamos duas proteínas: Zeína, que está presente na ração dos camundongos; Ovalbumina, que foi adicionada à água dos camundongos e oferecida por 3 dias consecutivos, antes das lesões na pele. Duas lesões excisionais foram realizadas na pele do dorso de camundongos C57BL/6 machos, com 8 semanas de idade, utilizando um punch dermatológico de 6 mm, sob anestesia. A aplicação s.c. foi feita uma única vez na base da cauda, minutos antes das lesões na pele. O tratamento tópico foi aplicado nas feridas durante sete dias consecutivos. Grupos controle não tolerantes receberam aplicações parenterais de Ovalbumina ou veículo. A cicatrização das feridas foi analisada macroscopicamente e microscopicamente após coloração com H&E, Azul de toluidina ou Alcian Blue-Safranina, Tricrômico de Masson, Picrosirus Red e Resorcina-Fucsina de Weigert. A quantidade e distribuição de leucócitos (CD45), macrófagos (F4/80), linfócitos T (CD3), miofibroblastos (α -SMA) e Vimentina foi investigada no leito da lesão, por imunofluorescência. Análises macroscópicas mostraram menos inflamação e cicatriz mais suave nos animais que receberam aplicação de proteínas toleradas. Análises microscópicas no dia 7 após a lesão mostraram menor infiltrado inflamatório nos grupos que receberam aplicação de proteínas toleradas. Aos 40 e 60 dias após a lesão, a

organização da matriz extracelular na neoderme dos grupos que receberam aplicação de proteínas toleradas estava mais semelhante à da pele intacta. Concluímos que a aplicação de proteínas toleradas diminui a inflamação e melhora a cicatrização de lesões cutâneas independentemente da via de aplicação.

Palavras chave: reparo de lesão, tolerância imunológica, pele, inflamação, matriz extracelular, Ovalbumina, Zeina.

Abstract

Skin wound healing depends on interactions between many types of cells that result in local inflammation and activation, migration and proliferation of keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells and leukocytes. Through oral tolerance, an immunological phenomenon that occurs after protein intake, it is possible to inhibit the production of antibodies and reduce inflammation. Previous works have shown that an intraperitoneal injection of orally-tolerated proteins plus adjuvant, minutes before skin injuries in mice, reduces inflammation and improves wound healing. Herein we evaluated whether two other routes of application - subcutaneous injection (s.c.) and topical application - of previously ingested proteins also improve wound healing. We used two different proteins: Zein that is a regular component of mice chow; and Ovalbumin that was added in the water offered to the mice for 3 consecutive days, before skin lesions. Two excisional lesions on the dorsal skin were performed in 8-week-old male C57Bl/6 mice with a 6 mm dermatological punch, under anesthesia. One s.c. application of the previously ingested proteins, in adjuvant, was made at the base of the tail, minutes before the lesions. Topical treatment with the previously ingested proteins, without adjuvant, was applied to the wounds for seven consecutive days. Non-tolerant control groups received treatment with the previously ingested proteins or vehicle. Wound healing was analyzed macroscopically and microscopically after staining with H&E, toluidine blue, Alcian Blue-Safranin, Masson's Trichrome, Picrosirius Red and Weigert's Resorcin-Fuchsin. The amount and distribution of leukocytes (CD45), macrophages (F4 / 80), T lymphocytes (CD3), myofibroblasts (α -SMA) and Vimentin was investigated in the wound bed by immunofluorescence. Macroscopic analyzes showed less inflammation and scarless healing in animals that received application of the tolerated proteins. Microscopic analyzes on day 7 after the injuries showed reduced inflammatory infiltrate in the groups that received application of tolerated proteins. At 40 and 60 days after the injuries, the organization of the extracellular matrix in neoderms of the groups

that received application of tolerated proteins was more similar to that of intact skin. We conclude that the application of tolerated proteins decreases inflammation and improves the healing of skin lesions regardless of the route of application.

Keywords: wound healing, immunological tolerance, skin, inflammation, extracellular matrix, ovalbumin, zein.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Reparo de lesões	17
1.2. Reparo de lesões cutâneas.....	18
1.3. Matriz extracelular e reparo de lesões cutâneas.....	22
1.4. Terapias com anti-inflamatórios e cicatrização	23
1.5. Tolerância oral	24
1.6. Efeitos indiretos da tolerância oral	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais	29
4.2. Indução de tolerância oral.....	29
4.3. Imunização parenteral com as proteínas toleradas:.....	30
4.4. Lesões excisionais na pele e período pós-operatório	33
4.5. Análises macroscópicas e medidas da área da lesão.....	34
4.6. Coleta e fixação da pele com as lesões.....	34
4.7. Histologia e morfometria	35
4.8. Imunofluorescência em microscopia confocal.....	38
4.9. Lesões simultâneas feitas na pele do dorso e na orelha para verificar se a aplicação tópica de proteínas toleradas tem efeitos sistêmicos.....	40
4.10. Análises estatísticas.....	41

5. RESULTADOS	42
5.1. Injeção subcutânea de Zeina reduziu a inflamação e alterou a deposição de colágenos durante o reparo de feridas na pele do dorso.	42
5.2. Efeito da injeção subcutânea de Zeina no remodelamento da cicatriz, 40 dias após a lesão.	47
5.3. Efeito da injeção subcutânea de Zeina na deposição das fibras elásticas aos 40 dias após a lesão	49
5.4. Efeitos da aplicação tópica de proteínas toleradas.	51
5.6. Efeito da aplicação tópica de Zeina 60 dias após a lesão.....	60
5.7. Efeitos da aplicação tópica de proteínas toleradas na organização das fibras elásticas 60 dias após a lesão	62
5.8. Lesões simultâneas feitas na pele do dorso e na orelha para verificar se a aplicação tópica de proteínas toleradas na pele do dorso tem efeitos sistêmicos	64
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Reparo de lesões

A manutenção da vida dos metazoários depende muito da capacidade que eles têm de reparar lesões que podem ocorrer nos diferentes tecidos e órgãos. Estes animais multicelulares apresentam diversas estratégias para o reparo de lesões, sendo que algumas espécies apresentam capacidade de regenerar órgãos inteiros e outros animais não têm esta capacidade regenerativa, mas conseguem reparar as lesões com formação de cicatrizes. A maioria dos mamíferos adultos não tem grande capacidade regenerativa, mas a regeneração de alguns tecidos como a pele, pode acontecer durante a fase inicial do período fetal do seu desenvolvimento (Larson et al., 2010). Quando adultos, na maioria dos mamíferos o reparo de lesões ocorre com a formação de cicatrizes, onde as células são substituídas por tecido conjuntivo constituído pela arquitetura anormal do colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Profyris et al., 2012; Martin & Nunan, 2015; Marshall et al., 2018).

A perda da capacidade regenerativa durante a ontogênese de camundongos correlaciona-se com a formação de diferentes linhagens de fibroblastos que podem ser caracterizados pela expressão do fator de transcrição engrailed (En1), como demonstrado por Jiang e colaboradores (2018). As linhagens de fibroblastos negativos para En1 existem na derme durante a fase fetal onde ocorre regeneração e as linhagens de fibroblastos positivos para En1 aparecem depois, quando ocorre formação de cicatriz (Jiang et al., 2018).

A perda da capacidade regenerativa durante a ontogênese correlaciona-se também com o desenvolvimento do sistema imunológico. No momento do desenvolvimento onde o fechamento de feridas na pele ocorre com regeneração,

às células inflamatórias, como macrófagos e mastócitos, são reduzidas em número e ativadas diferencialmente quando comparadas com estas células nos indivíduos mais velhos em que a regeneração não mais acontece (Cowin AJ, 1998; Rolfe & Grobbelaar, 2012; Julier et al., 2017).

A inflamação influencia o fechamento de feridas desde um momento muito inicial do reparo devido ao estresse oxidativo, à proteólise e ao acúmulo de substâncias tóxicas que ocorrem logo após a lesão (Raposio et al., 2015). Logo após a lesão também ocorre produção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento celular que irão repercutir nas fases posteriores do processo da cicatrização. A inflamação pode afetar a mobilização de queratinócitos, a angiogênese e a ativação, migração e proliferação de fibroblastos (Broughton et al., 2006; Raposio et al., 2015).

1.2. Reparo de lesões cutâneas

Uma vez que se encontra na superfície corporal, a pele é um órgão altamente suscetível a lesões traumáticas cujo reparo é essencial para a manutenção da integridade do organismo evitando a perda de líquidos e infecções (Pereira et al., 2013).

A pele consiste na epiderme, na derme e seus anexos. A epiderme é a camada mais externa constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Durante o desenvolvimento as múltiplas camadas da epiderme resultam das interações com a derme formando projeções denominadas papilas dérmicas. Assim, a derme passa a ter duas camadas distintas, a derme papilar que é a camada mais superficial composta por tecido conjuntivo contendo fibras elásticas, mais próxima da epiderme, e a derme reticular, subjacente à derme papilar é mais

profunda e consiste de tecido conjuntivo denso contendo colágeno e fibras elásticas.

Na derme, o ambiente celular é composto por vasos capilares, que fornecem oxigênio e nutrientes às células da epiderme. A derme é rica em matriz extracelular (MEC) que é constituída por fibras elásticas, colágeno, ácido hialurônico, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, e tenascina. As fibras elásticas apresentam um papel importante na fisiologia do tecido conectivo e estão constituídas por elastina e microfibrilas. Estas fibras formam um componente funcional importante para dar a elasticidade da pele e em animais adultos elas dificilmente regeneram após lesões (Wen et al., 2019). O sistema elástico é composto por três tipos de fibras: oxitalânicas, eulanínicas e elásticas ou maduras. As fibras oxitalânicas, consistem em feixes de microfibrilas, as fibras elaunínicas ou elásticas são fibras mais espessas devido à junção de elastina com as microfibrilas (Carneiro, 2006).

Em condições fisiológicas normais, após lesões na pele a restauração de uma epiderme funcional é altamente eficiente, enquanto o reparo da derme é caracterizado pela formação de uma cicatriz, sem a regeneração dos componentes celulares (Marshall et al., 2018).

O reparo de lesões cutâneas depende de interações entre vários tipos de células que resultam em ativação, migração e proliferação de queratinócitos, células endoteliais, leucócitos e fibroblastos (Eming et al., 2014; Martin & Nunan, 2015; Julier et al., 2017).

Didaticamente, o reparo de lesões na pele pode ser dividido em três etapas: inflamação, proliferação celular e remodelação da matriz extracelular (Abercrombie et al., 1960; Singer & Clark, 1999; Barrientos et al., 2008; Wang et al., 2017). Na etapa inflamatória, que ocorre nos primeiros dias após as lesões, as primeiras células inflamatórias envolvidas no reparo são os neutrófilos que através

de suas ações de fagocitose e secreção de proteases matam as bactérias e ajudam a degradar o tecido morto. Em seguida os macrófagos também entram na zona de lesão e, além de seu processo de fagocitose de células mortas, secretam uma variedade de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que ativam outras células e estimulam a proliferação celular (Martin & Leibovich, 2005; Eming et al., 2007; Profyris et al., 2012). Os Macrófagos são um dos mais abundantes tipos de células inflamatórias durante todas as fases do reparo, sendo responsável pela eliminação de debris celulares e tecido necrótico através da produção de proteases altamente ativas e mediadores pro-inflamatórios (Willenborg & Eming, 2014). Além disso, devido à sua plasticidade participam na regulação e coordenação de outros processos como a expressão de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante beta 1 (TGF β 1) ativando fibroblastos que proliferam e produzem uma matriz extracelular provisória, constituída inicialmente por fibronectina e colágeno (Chia et al., 2018). Esta matriz favorece as células endoteliais a proliferar e estabelecer novos vasos pelo processo de angiogênese.

Outras células importantes do sistema imune que participam do reparo de lesões são os linfócitos. Existem subtipos de linfócitos T que interagem durante as respostas imunes, eles são os T CD4+, células auxiliares que promovem a ativação de linfócitos B e os T CD8+ reconhecidas por sua toxicidade (Wang et al., 2019). Os linfócitos T auxiliares podem ainda ser divididos em subpopulações de linfócitos T de acordo com a expressão de diferentes fatores de transcrição. Por exemplo, os linfócitos que expressão o fator de transcrição Foxp3 são conhecidos como células T reguladoras (Células Treg). Estudos prévios sobre a participação dos linfócitos no reparo de lesões de pele mostraram que uma população de linfócitos T $\gamma\delta$ que residem na epiderme, designadas células T epidérmicas dendríticas (DETC), ajudam no reparo tecidual (Jamenson et al., 2002; Eming et al., 2007).

Os mastócitos, que são considerados células especializadas do sistema imune, além de seu papel clássico na alergia, também participam do reparo de lesões na pele (Komi et al., 2019). A pele saudável apresenta mastócitos como células residentes e sua ativação após uma lesão resulta na liberação do conteúdo dos seus grânulos para o espaço extracelular, liberando uma variedade de mediadores pro-inflamatórios e vasoativos tais como serotonina, histamina, heparina, triptase e quimase que podem ampliar a resposta inflamatória mediando o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (Larouche et al., 2018; Komi et al., 2019). Outros mediadores de mastócitos tais como IL-8, IL-4, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, TGF- β e VEGF participam nos processos de angiogênese e reepitelização, necessários para finalizar o reparo de lesões (Artuc et al., 1999; Rao & Brown, 2008). Além disso, a ativação dos mastócitos pode influenciar no remodelamento da cicatriz após uma lesão, participando indiretamente na síntese de colágeno pela liberação de mediadores que estimulam os fibroblastos e permitem a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, células importantes na contração das fibras de colágeno (Chen et al., 2014). Por sua vez, os queratinócitos adjacentes à borda da ferida proliferam e migram até a reepitelização se completar, levando ao fechamento da ferida, que é essencial para o restabelecimento da integridade da pele (Profyris et al., 2012; Jimi et al., 2017).

Na terceira etapa do reparo, a etapa de remodelamento da matriz extracelular, a formação do tecido de granulação cessa através do processo de apoptose e a composição da matriz extracelular sofre alterações passando a ter predomínio de colágeno do tipo I que forma pequenos feixes cuja orientação difere drasticamente da orientação do colágeno presente na derme normal. A deposição do colágeno na formação da cicatriz é caracterizado pela orientação das fibras paralelas à epiderme.

1.3. Matriz extracelular e reparo de lesões cutâneas

O processo de reparo de lesões cutâneas é influenciado pela MEC que pode interferir na comunicação entre os diferentes componentes celulares que compõem a pele (Larson et al., 2010). Após as lesões, a MEC ajuda na interação entre diferentes populações celulares para facilitar a migração e diferenciação durante as etapas do reparo (Urciuolo et al., 2019). A lesão leva à ativação do processo de coagulação que catalisa a transformação do fibrinogênio em fibrina e como resultado à formação de um coágulo sanguíneo (Brass et al., 2003; Hoffman et al., 2006). Uma matriz provisória é formada no leito da ferida constituída principalmente de fibronectina durante as primeiras 24 horas. A fibronectina é importante na interação de várias células através de receptores de integrina estimulando a migração, proliferação e adesão de queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (importantes na manutenção da homeostase da MEC, biossíntese de colágeno). Nesta fase vários fatores de crescimento tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), TGF- β e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são secretados influenciando a resposta inflamatória. Essa matriz temporária é depois substituída por matriz de colágeno (principalmente tipo I e tipo III), fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteínas não colágenas sintetizadas principalmente por fibroblastos cuja atividade é regulada por PDGF e TGF- β (Koźma et al., 1998; Tomasek et al., 2002).

Durante a reepitelização os queratinócitos da camada germinativa da epiderme têm um papel significativo para finalizar o processo do fechamento da lesão. Primeiramente ocorrem perdas da adesão celular com a MEC, através da redução da expressão de receptores de integrinas nas células epidérmicas que fazem a ligação com a membrana basal (Martin & Nunan, 2015). A participação de proteases, especificamente as metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 degradam o colágeno tipo IV da membrana basal e o colágeno tipo VII responsáveis na

formação de fibrilas de ancoragem com a epiderme (Gill & Parks, 2008). MMP 1 também auxilia a migração dos queratinócitos pela MEC finalizando o processo de reparo da epiderme (Olczyk et al., 2014).

1.4. Terapias com anti-inflamatórios e cicatrização

Existe uma variedade de terapias clínicas utilizadas para promover e melhorar o reparo de lesões cutâneas, no entanto a maioria destas terapias não têm resultados satisfatórios. Como exemplo, as radioterapias afetam a pele, destruindo o epitélio e deixando menor resistência, anti-inflamatórios não esteroides (AINE) como o ibuprofeno têm efeitos negativos no reparo, afetando a proliferação de vasos sanguíneos e retardando a taxa de cicatrização (Anderson et al., 2014). Sabe-se que a inflamação é necessária para o começo do reparo mas, no entanto, a resolução da inflamação é necessária para o fechamento da lesão (Julier et al., 2017). A inflamação crônica pode resultar em feridas que não se fecham ou em cicatrizes patológicas (Larouche et al., 2018).

Uma vez que a fase inflamatória do reparo influencia as outras fases do reparo, alterar o microambiente inflamatório com moléculas anti-inflamatórias e biomateriais está se tornando um enfoque atrativo na medicina regenerativa (Julier et al., 2017). Com o uso terapêutico de biomateriais, que de acordo com suas propriedades físico-químicas podem ser aplicados em diversas apresentações: sólida, hidrogel, ou micro/nanopartículas objetiva-se influenciar a atividade de populações celulares chave no reparo e melhorar o processo de cicatrização. Vários estudos foram feitos usando a aplicação de citocinas anti-inflamatórias, como, por exemplo, o TGF β 3 que é importante na regeneração de feridas sem cicatrizes em fetos de mamíferos e na redução de cicatrizes (Lichtman et al., 2016; Larouche et al., 2018). No entanto, a transposição destes estudos para a

aplicação clínica ainda não atingiu bons resultados, de maneira que não existem formas efetivas de promover a regeneração da pele após lesões (Leavitt et al., 2016).

Por outro lado, a aplicação de corticóides, considerados agentes anti-inflamatórios esteroides e imunossupressores, podem prejudicar as fases inflamatórias e proliferativas do reparo de feridas através da redução de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, entre outros, reduzindo a proliferação de fibroblastos, a produção de colágeno e outras proteínas envolvidas na cicatrização (Jalali, 2007; Tziotziou et al., 2012; Anderson et al., 2014). No entanto, e apesar de sua eficácia terapêutica, o uso em longo prazo é bastante limitado devido aos efeitos adversos cutâneos, incluindo atrofia, atraso na cicatrização de feridas e aumento da suscetibilidade a infecções (Sevilla et al., 2018).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostrou-se que a injeção intraperitoneal de proteínas previamente ingeridas têm efeitos sistêmicos que reduzem a migração de leucócitos para locais inflamados e melhoram o reparo de feridas cutâneas (Costa et al., 2011; Costa et al., 2016; Cantaruti et al., 2017; Cantaruti et al., 2019). Estes efeitos sistêmicos são resultado de um fenômeno imunológico conhecido como tolerância oral.

1.5. Tolerância oral

A tolerância oral é conhecida há mais de um século e geralmente é definida como uma inibição da resposta imune específica frente a imunizações parenterais com proteínas previamente ingeridas (Vaz et al., 2006; Faria & Weiner, 2005; Costa et al., 2011; Costa et al., 2016; Cantaruti et al., 2017). A tolerância oral é capaz de inibir doenças autoimunes, processos inflamatórios e alérgicos, e foi demonstrada

em estudos experimentais onde a administração oral de proteínas preveniu a indução das doenças (Gütgemann et al., 1998; Strid J et al., 2004). Acredita-se que a tolerância oral tem um papel fisiológico durante a ingestão de antígenos da dieta de maneira que não resulte em reações imunes adversas (Faria & Weiner, 2005).

A tolerância imunológica pode ser induzida pela administração por via oral de diferentes proteínas, seja presentes na dieta natural dos animais ou introduzidas por um curto período de tempo (Vaz, 1997). A tolerância imunológica induzida por via oral pode ser transferida de animais que ingeriram a proteína para animais naïve através de transferência de linfócitos, mostrando que este é um fenômeno imunológico ativo mediado por linfócitos (Richman et al., 1978; Cunha et al., 2009). A tolerância oral tem efeitos sistêmicos que inibem a produção de anticorpos específicos, mas aumenta a formação de células produtoras de anticorpos inespecíficos (Castro-Junior et al., 2012).

Um componente importante do sistema imune para o estabelecimento da tolerância oral é o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), rico em linfócitos T, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos que processam e apresentam peptídeos para linfócitos T, placas de peyer, lâmina própria, células epiteliais intestinais (IECs), linfócitos intra-epiteliais (IELs) e linfonodos mesentéricos (MLNs) (Wershil & Furuta, 2008).

1.6. Efeitos indiretos da tolerância oral

Estudos anteriores demonstraram que a administração parenteral de proteínas previamente ingeridas como, por exemplo, a ovalbumina (OVA) inibem respostas imunológicas para antígenos não relacionados quando são injetados simultaneamente ou até três dias depois, fenômeno conhecido como efeitos

indiretos da tolerância oral (Vaz et al., 1981; Carvalho et al., 1994; Carvalho & Vaz, 1996).

A injeção intraperitoneal (i.p.) de proteínas imunologicamente toleradas, junto com adjuvante, produz efeitos indiretos e sistêmicos que bloqueiam significativamente a indução da inflamação como, por exemplo, a inflamação induzida pela injeção de carragenina na pata de camundongos (Ramos et al., 2009); a formação de granulomas pulmonares induzidos por ovos de *Schistosoma mansoni* injetados na cauda em camundongos (Azevedo et al., 2012). Além destes efeitos na inflamação, sabe-se que a injeção i.p. de pequenas doses de proteínas toleradas minutos antes de uma lesão na pele produz efeitos sistêmicos que diminuem a infiltração de leucócitos no leito da ferida cutânea, alteram a cinética de produção de citocinas, interferem na deposição de matriz extracelular e produzem o fechamento da lesão com cicatrizes menores (Costa et al., 2011; Costa et al., 2016; Cantaruti et al., 2017, Cantaruti et al., 2019). Estes estudos mostram que é possível interferir no processo de fechamento de lesões na pele através de um fenômeno imunológico mediado por linfócitos T, confirmando que os linfócitos são importantes nos processos de reparo de lesões cutâneas.

A interferência no processo de cicatrização através dos efeitos sistêmicos da tolerância oral foi mostrada pela injeção i.p. de diferentes proteínas, tais como a OVA e Zeína, e em diferentes modelos de lesão na pele, tanto lesões incisionais quanto lesões excisionais (Costa et al., 2011; Costa et al., 2016; Cantaruti et al., 2017, Cantaruti et al., 2019). A OVA não é uma proteína presente na dieta usual de camundongos, devendo ser administrada numa solução de OVA em água para a indução da tolerância oral, mas a Zeína, sendo a principal proteína do milho, faz parte da dieta usualmente dada aos camundongos.

2. JUSTIFICATIVA

Embora a imunização por via i.p. seja comumente usada em estudos sobre a tolerância imunológica, esta via de imunização não seria recomendada para aplicação clínica visando melhorar o processo de cicatrização de lesões na pele. Assim, neste trabalho avaliamos se duas outras vias de exposição parenteral a proteínas imunologicamente toleradas, a injeção subcutânea (s.c.) e a aplicação tópica, também têm efeitos anti-inflamatórios que melhorem o reparo de feridas cutâneas em camundongos. Os resultados deste estudo poderão contribuir para o desenvolvimento de produtos para uso em situações onde se deseja amenizar a formação de cicatrizes ou facilitar o fechamento das lesões de pele.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar se a administração de proteínas imunologicamente toleradas por via subcutânea ou tópica produzem efeitos anti-inflamatórios e melhoram a cicatrização de feridas cutâneas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar macroscopicamente o fechamento das lesões em animais tratados ou não tratados com proteínas toleradas.
- Analisar histologicamente e por imunohistoquímica o infiltrado inflamatório e os fibroblastos no dia 7 após as lesões.
- Analisar a deposição e organização da matriz extracelular nos dias 7, 40 e 60 após as lesões.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade (20g) foram utilizados neste estudo e obtidos do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Brasil. Durante o período de experimentação eles foram acomodados no biotério do Departamento de Morfologia, com temperatura de 23-25° C e ciclo de luz de 12 horas dia/noite, em condições experimentais de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG. Animais receberam água e ração peletizada própria para camundongos, *ad libitum*. Os grupos experimentais foram constituídos de 6 animais (protocolos aprovados pelo CETEA 127/2016 e 137/2017).

4.2. Indução de tolerância oral

Animais foram submetidos a tratamento oral com as seguintes proteínas: **Ovalbumina (OVA)**: Um grupo de camundongos recebeu por três dias consecutivos, *ad libitum*, uma solução de clara de ovo de galinha em água, na proporção de 1:5 (preparada no laboratório). Depois destes três dias a solução de clara de ovo foi substituída por água. Os bebedouros contendo a solução com clara de ovo foram trocados diariamente para prevenir contaminação. Os grupos controles, não tolerantes, receberam apenas água.

Zeína: todos os camundongos foram alimentados com ração para roedores de laboratório Nuvital/Nuvilab CR-3. O milho, cuja proteína mais abundante é a Zeína, se encontra na composição desta ração (Figura 1).

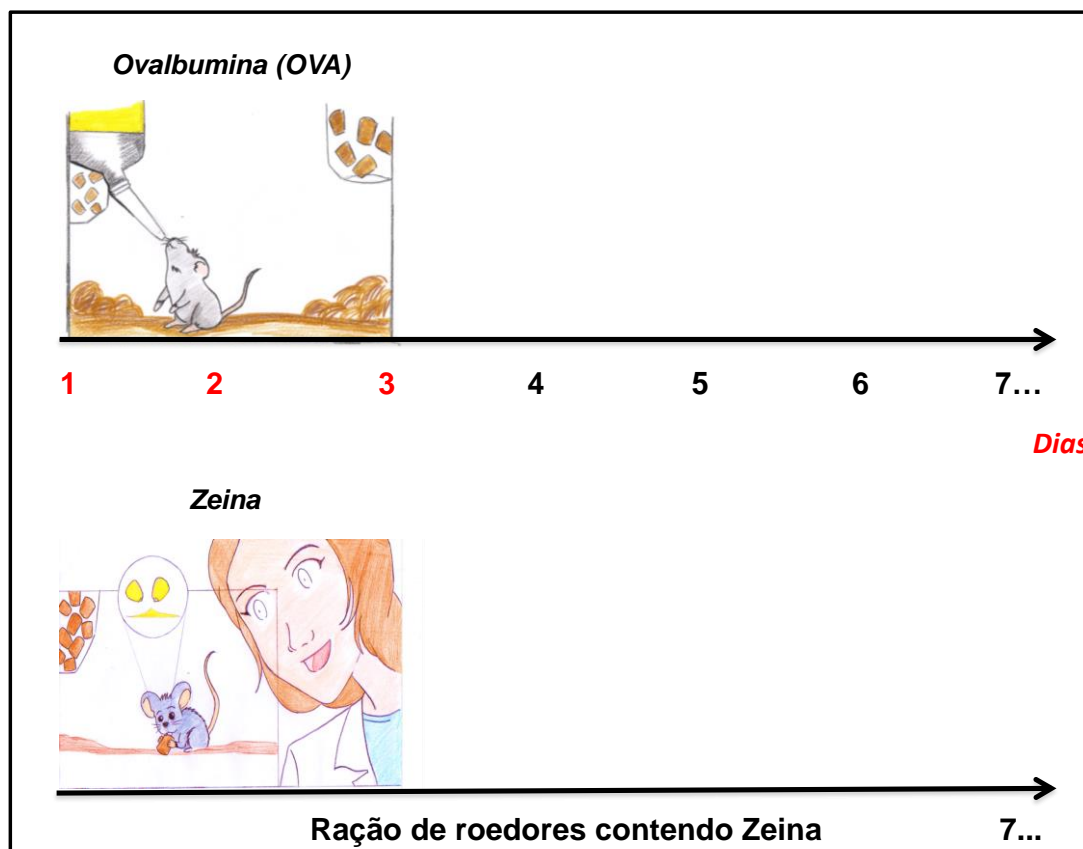


Figura 1. Indução de tolerância oral em camundongos machos C57BL/6. a) Ovalbumina (proteína que não está presente na dieta usual de camundongos). b) Zeína (principal proteína do milho que faz parte da dieta usualmente dada aos camundongos).

4.3. Imunização parenteral com as proteínas toleradas:

Animais receberam as seguintes imunizações:

- a. **Aplicação subcutânea:** 10 μg de Zeína purificada (Sigma Aldrich St. Louis, MO) foi misturada numa solução de 100 μL de salina contendo 1,6 mg de adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ e foi administrada por via subcutânea (s.c.) na região dorsal próxima da base caudal, cinco minutos antes da lesão na pele. Um

grupo controle recebeu injeção s.c. de 100 μL salina e outro grupo recebeu 100 μL de salina com 1,6 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ conforme a tabela 1.

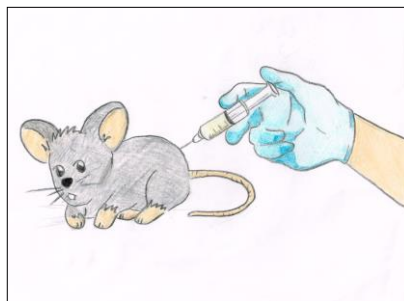


Figura 2. Aplicação subcutânea dorsal próxima da base caudal.

Tabela 1. Delineamento experimental da imunização com a proteína tolerada através da injeção subcutânea minutos antes de realizar a lesão.

Grupos	C57BL/6	Lesão/imunização s.c.	Coleta
Salina		Salina s.c + lesão excisional	Dia 7 e 40 pós lesão
Adjuvante		Salina + $\text{Al}(\text{OH})_3$ s.c + lesão excisional	Dia 7 e 40 pós lesão
Zeína		Zeína + $\text{Al}(\text{OH})_3$ + Salina s.c + lesão excisional	Dia 7 e 40 pós lesão





b. Aplicação tópica: OVA (grade V, Sigma Aldrich, St.Louis, MO) e Zeína (Sigma Aldrich, St.Louis, MO), foram aplicadas sobre a lesão, minutos depois de ser realizada a lesão e uma vez por dia, durante 7 dias consecutivos, utilizando um aplicador com spray conforme a tabela 2. Foram aplicados 120 μL de solução contendo 10 μg da proteína diluída em

salina. Um grupo controle recebeu 120 μ l de Salina e um outro grupo controle que não foi previamente exposto a OVA por via oral recebeu 120 μ l de OVA. Nos dias da aplicação tópica subsequentes ao dia da lesão os animais não foram anestesiados (Figura 3).



Figura 3. Aplicação tópica utilizando um aplicador com spray.

Tabela 2. Delineamento experimental da imunização com as proteínas toleradas através da aplicação tópica durante 7 dias consecutivos após de realizar a lesão.

Grupos	C57BL/6	Lesão/imunização Tópica	Coleta
Salina		lesão excisional + Spray Salina	Dia 7 e 60 pós lesão
Zeína Tolerante		lesão excisional +Spray Zeína	Dia 7 e 60 pós lesão
OVA Tolerante		lesão excisional + Spray OVA	Dia 7 pós lesão
Ova não Tolerante		lesão excisional +Spray OVA	Dia 7 pós lesão

4.4. Lesões excisionais na pele e período pós-operatório

Os camundongos foram anestesiados por administração i.p. de Xilasina (15 mg/kg) e Cetamina (80 mg/kg) e a pele da região dorsal do tórax foi depilada e limpada com álcool 70%. Utilizando um punch dermatológico de 6 mm de diâmetro, foram feitas duas feridas através da pele, na região imediatamente posterior à escápula (Figura 4). A partir disto o animal foi posicionado em decúbito lateral, ainda com a pele alinhada ao plano mediano do corpo para fazer a lesões, retirando as camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme, resultando na formação de duas feridas no dorso dos animais. O Pós-operatório e a temperatura corporal dos animais foram controlados através do acondicionamento numa estufa a 37°C, hidratando constantemente os olhos com algodão embebido em salina fisiológica 0,85%. Após anestesia os animais foram mantidos em gaiolas individuais para evitar lesões traumáticas por outros animais.

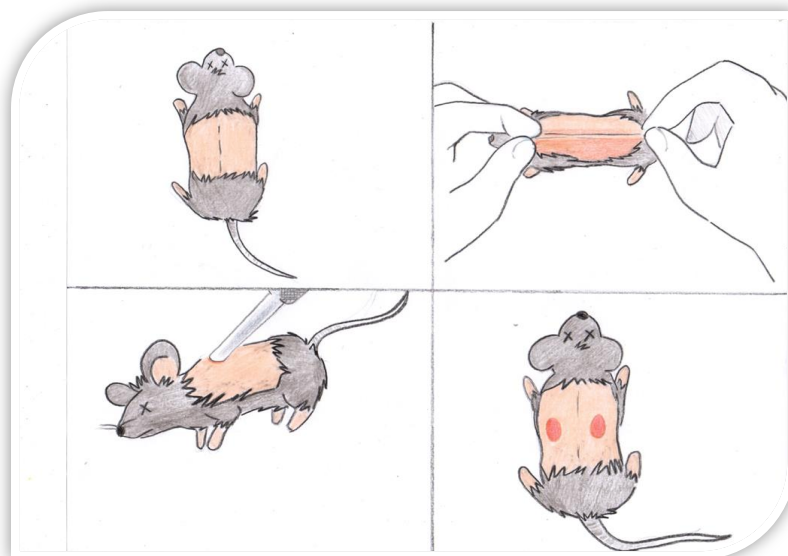


Figura 4. Esquema do protocolo experimental da ferida excisional no dorso de camundongos. Duas lesões na região dorsal do animal são realizadas utilizando um punch dermatológico de 6 mm.

4.5. Análises macroscópicas e medidas da área da lesão

Para avaliação macroscópica do fechamento das feridas e da cicatriz na região da escápula, as lesões foram fotografadas ao lado de uma régua milimetrada utilizando uma câmera digital (Nikon COOLPIX S3100), logo após a lesão (dia 0) e nos dias 1, 3, 5, 7, 40 e 60 dias. Todas as imagens foram tiradas nas mesmas configurações de distância por intermédio de um tripé. As imagens com as lesões foram analisadas utilizando o software Image Tool Versão 3.0. (UTHSCSA, San Antonio, Texas USA <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.htm>). A medida da área da lesão foi realizada no mínimo por dois observadores independentes, considerando a média dos dados obtidos de cada um. Fechamento da lesão foi expresso em porcentagem com relação à diferença entre a área total da lesão e a medida da área da lesão/área da lesão total x 100.

4.6. Coleta e fixação da pele com as lesões

A avaliação microscópica da cicatrização foi realizada nos dias 7 e 40 ou dias 7 e 60 conforme descrito nos resultados. Para isto os camundongos foram anestesiados com Xilasina (15mg/Kg) e Cetamina (80 mg/Kg) e em seguida foram eutanasiados por deslocamento cervical. A pele foi depilada quando necessário e limpada com álcool 70%. A lesão do lado direito foi fixada em formalina de Carson pH 7,4 durante 24 horas em temperatura ambiente e a lesão esquerda foi fixada em uma solução contendo 80% de metanol e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) em ultrafreezer a -80°C após a fixação. Após a fixação cada amostra de pele foi cortada ao meio antes da inclusão em parafina ou paraplást.

4.7. 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 semi-automático (Microm – HM 335 E) foram feitos cortes de 5 μm à partir do meio da lesão e estes cortes foram colocados em lâminas que foram submetidas a protocolos padrão de coloração com hematoxilina e eosina (H&E), Azul de Toluidina ou Alcian blue-safranina (coloração que diferencia mastócitos imaturos-azuis e maduros-vermelhos), Tricrômico de Masson, Picrosírius red e Resorcina-Fucsina pelo método de Weigert (Figura 5). Protocolos padrão foram seguidos através da **desidratação**, imersão em uma série gradual de álcoois (de 80% a 100%), em temperatura ambiente, por 30 minutos cada; **Diafanização**, imersão em uma sequência de três recipientes contendo xilol em temperatura ambiente, por 20 minutos cada; **Infiltração**, imersão em uma sequência de três recipientes contendo parafina a uma temperatura de 56°C, por 20 minutos cada e por último a **inclusão**, em parafina a uma temperatura de 56°C.

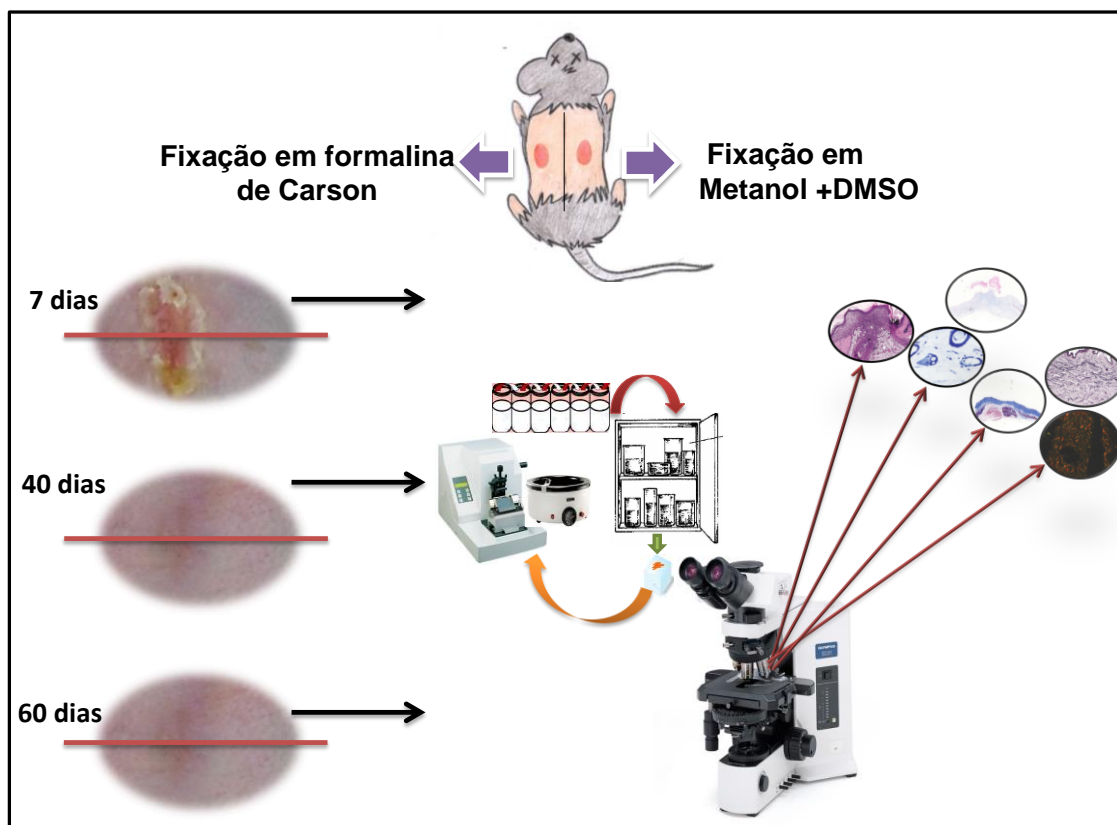


Figura 5. Coleta e processamento histológico para microscopia de Luz de lesões fixadas em formalina de Carson. Lesões fixadas em Metanol+DMSO foram utilizadas para análise de imunohistoquímica em microscopia confocal.

Grupos experimentais foram constituídos por 6 animais em cada dia de análise após as lesões. Análises histológicas qualitativas foram realizadas em duplo cego com ajuda de um patologista. Analisou-se um corte por animal, para cada coloração, portanto foram analisados seis cortes por grupo. Para a análise dos cortes histológicos corados com H&E observou-se os seguintes critérios: extensão da lesão, presença de tecido de granulação, intensidade do infiltrado inflamatório e tipos de células predominantes no infiltrado inflamatório, reepitelização, presença de crostas, presença de edema intersticial e presença ou não de hemorragia. 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). Esta avaliação das células foi realizada em maior aumento (1000x), sob imersão. Os mastócitos foram identificados através da coloração com azul de toluidina ou Alcian-blue safranina. Leucócitos, fibroblastos e mastócitos foram contados em 10 campos de $10000 \mu\text{m}^2$ na área da lesão, em imersão (1000x), utilizando uma grade de inserção colocada na lente ocular (Figura 6), de uma secção por cada animal e os resultados de seis secções por grupo foram expressos como a média \pm erro padrão por grupo.

Imagens digitais dos tecidos foram obtidas utilizando um scanner digital automático de lâminas (Pannoramic MIDI, 3DHISTECH Ltd., Budapeste, Hungria).

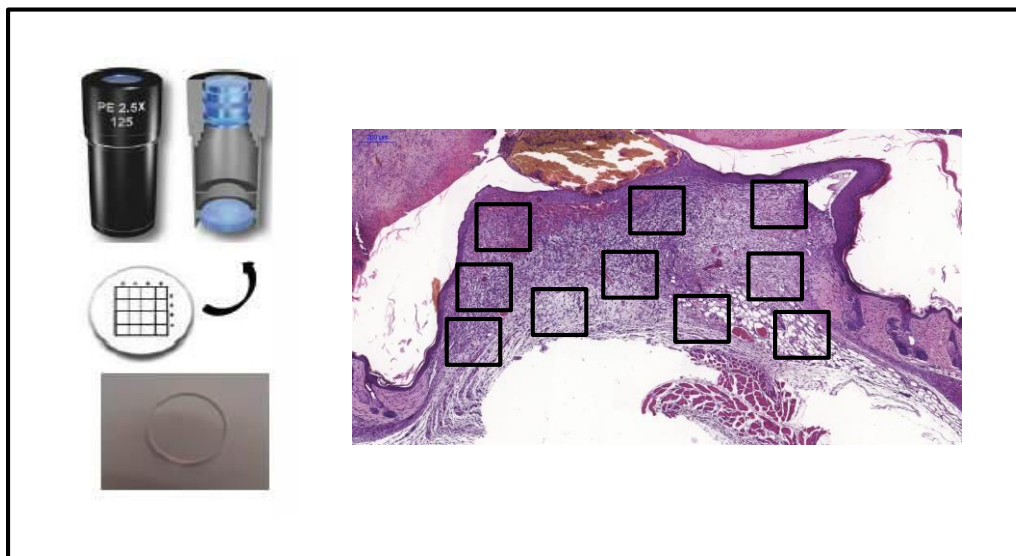


Figura 6. Procedimento utilizado para análises morfológicas com grade de inserção de $100 \mu\text{m}^2$ acoplado à ocular do microscópio para posicionar os campos para análise na área da lesão excisional no dorso.

Para análise da espessura e organização das fibras de colágeno foi utilizada a coloração com Picrosirius Red, com luz polarizada. Foram obtidas imagens da área da lesão de uma secção de cada animal em objetiva de 20x (aumento de 200x). O método de Picrosirius Red com luz polarizada permite distinguir fibras finas e frouxamente organizadas que apresentam fraca birrefringência (de cor amarelo-esverdeada) de fibras espessas e mais densamente organizadas que apresentam forte birrefringência (de cor vermelho-laranja e brilhante) (Montes, 1996). Durante o processo de reparo a birrefringência do colágeno pode ser associada com a sua maturidade: verde-amarelas consideradas como fibras menos maduras e vermelho-laranja como fibras mais maduras.

4.8. Imunofluorescência em microscopia confocal

Com a finalidade de analisar a distribuição e quantidade de leucócitos (CD45+), macrófagos (F4/80), linfócitos T (CD3+) miofibroblastos (α -SMA) e Proteína do citoesqueleto (Vimentina), as lesões fixadas em DMSO/Metanol foram seccionados perpendicularmente em sua metade e processada até a inclusão em paraplast. O processamento foi iniciado com a transferência das feridas a -20°C durante 24 horas, logo foram levadas a temperatura ambiente e passadas por três lavagens em etanol absoluto, duas vezes em xilol e imediatamente incluídas em paraplast.

Três secções de cortes transversais de $5\ \mu\text{m}$, à partir do meio da ferida foram montados em lâminas e submetidos a etapas de desparafinização em xilol, hidratação em serie gradual de álcoois (100%-25%). Passados por incubação em solução de bloqueio com 1,25% de Albumina de Soro Bovino (BSA) em PBS + Tween 20 (0,1%) à temperatura ambiente durante 1 hora. As secções foram

incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: rato anti-CD45 (Biolegend), rato anti-F4/80 (eBioscience), camundongo monoclonal Anti-actina de musculo liso α -SMA, anticorpo purificado anti-CD3 produzido em rato e Anticorpo Monoclonal anti-Vimentina. Depois de três lavagens em PBS, as secções foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente no escuro com os seguintes anticorpos secundários Anti-Rat Alexa Fluor 488, Anti-mouse Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA) Anti-rabbit Alexa Fluor 488 Invitrogen by Termo Fisher Scientific) (Tabela 3). Após três lavagens em PBS, cortes foram montados em uma solução de 10% de Tris (1M pH 9) + 90% de glicerina e observados em microscópio confocal (Zeiss LSM 880 Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Configurações confocais ótimas (abertura, ganho e potência do laser) foram determinados no início da análise e mantidas constantes durante a análise de todas as amostras. Núcleos foram marcados com dicloridrato de 4'6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Imagens foram capturados em 16 bits e analisados em escala de cinza faixa de 0-255 com o software IMAGE TOOL 3.0 (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). A intensidade de fluorescência foi registrada como a soma dos valores de cinza de todos os pixels dividida pela área (em μm^2). Fluorescência de fundo foi medida em cada amostra e subtraída dos valores obtidos para a intensidade de fluorescência. Cinco imagens foram capturadas por secção em diferentes áreas no leito da ferida.

Tabela 3. Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência indireta.





ANTICORPOS	ESPECIFICAÇÕES	DILUIÇÃO	FONTE
PRIMÁRIOS	Anticorpo purificado anti-CD45 produzido em rato	1:50	Biolegend (103-102)
	Anticorpo monoclonal anti-F4/80 produzido em rato.	1:50	eBioscience (14-4801)
	Anticorpo purificado anti-CD3 produzido em rato.	1:30	BD Pharmingen (555273)
	Anticorpo Monoclonal Anti-actina α -SMA produzido em camundongo.	1:100	Sigma-Aldrich (A2547)
	Anticorpo Monoclonal Anti-Vimentina (EPR3776)-citoesqueleto .	1:75	abcam (ab92547)
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- IgG de camundongo.	1:200	Molecular Probes (A21131)
	Anticorpo Alexa Fluor 488 produzido em cabra, anti-coelho.	1:175	Invitrogen by termo Fisher Scientific (A1108)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride.	1:300	Molecular Probes (D1306)

4.9. Lesões simultâneas feitas na pele do dorso e na orelha para verificar se a aplicação tópica de proteínas toleradas tem efeitos sistêmicos

Duas lesões excisionais foram feitas na pele do dorso como já descrito, utilizando um punch de biópsia (6 mm de diâmetro). Simultaneamente, foram realizadas uma lesão em cada orelha, utilizando um punch de 4 mm de diâmetro. Camundongos tolerantes a Zeina e OVA receberam, conforme já descrito, aplicações da proteína tolerada nas lesões da pele da região dorsal, com um aplicador de spray contendo 10 μ g de Zeina ou 10 μ g de OVA por 7 dias consecutivos. Os grupos controle não tolerantes receberam aplicação tópica de OVA ou solução salina por 7 dias

consecutivos. No dia 7 após as lesões, sob anestesia, os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical e a região da lesão da pele do dorso e da orelha foi coletada para análises histológicas. Os fragmentos de pele foram corados com azul de toluidina e hematoxilina e eosina (H&E).

Tabela 4. Delineamento experimental da aplicação tópica de proteínas toleradas em lesões simultâneas para verificar se tem efeitos sistêmicos.

Grupos	C57BL/6	Lesão/imunização Tópica	Coleta
Salina		Lesão excisional + lesão orelha/Spray Salina no dorso	Dia 7 pós lesão
Zeína Tolerante		Lesão excisional + lesão orelha/Spray Zeína no dorso	Dia 7 pós lesão
OVA Tolerante	 OVA	Lesão excisional + lesão orelha/Spray OVA no dorso	Dia 7 pós lesão
Ova não Tolerante	 Água	Lesão excisional + lesão orelha/Spray OVA no dorso	Dia Pós lesão

4.10. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão (SEM). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad PRISMA 5 (GraphPad Software, CA, USA) e para comparação entre dois grupos foi utilizado Teste T de Student, sendo que quando a diferença foi $p < 0,05$ ela foi considerada significativa.

5. RESULTADOS

5.1. Injeção subcutânea de Zeina reduziu a inflamação e alterou a deposição de colágenos durante o reparo de feridas na pele do dorso.

Os efeitos da injeção subcutânea de Zeina em adjuvante Al(OH)_3 foram estudados macroscópica e microscopicamente. Análises qualitativas macroscópicas mostraram menor edema e menor vermelhidão, indicando menor inflamação (Figura 7a). Análise quantitativa do fechamento da lesão em relação à lesão inicial mostraram que o grupo que recebeu Zeina s.c alcançou 60% de fechamento aos 7 dias após a lesão (Figura 7b). Com relação ao fechamento da lesão, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos indicando que a injeção subcutânea da proteína tolerada não retardou o fechamento.

Aos sete dias pós-lesão, análises microscópicas qualitativas da área da lesão corada em H&E (Figura 8) mostraram que o grupo que recebeu a injeção subcutânea de Zeina tinha menor extensão da área do tecido de granulação e menor infiltrado inflamatório. Houve também redução do edema e menor congestão vascular. É notável que o grupo que recebeu a injeção de Zeina apresentava um processo inflamatório mais circunscrito, onde as células que compõe o tecido de granulação se localizavam mais próximos ao local da lesão e não espalhadas para o tecido adjacente como observado nos grupos controles. No dia 7 após a lesão, a reepitelização já estava completa em todos os grupos. No grupo Zeina a deposição da matriz extracelular apresentava uma organização mais semelhante a derme normal adjacente (Figura 8 D-F).

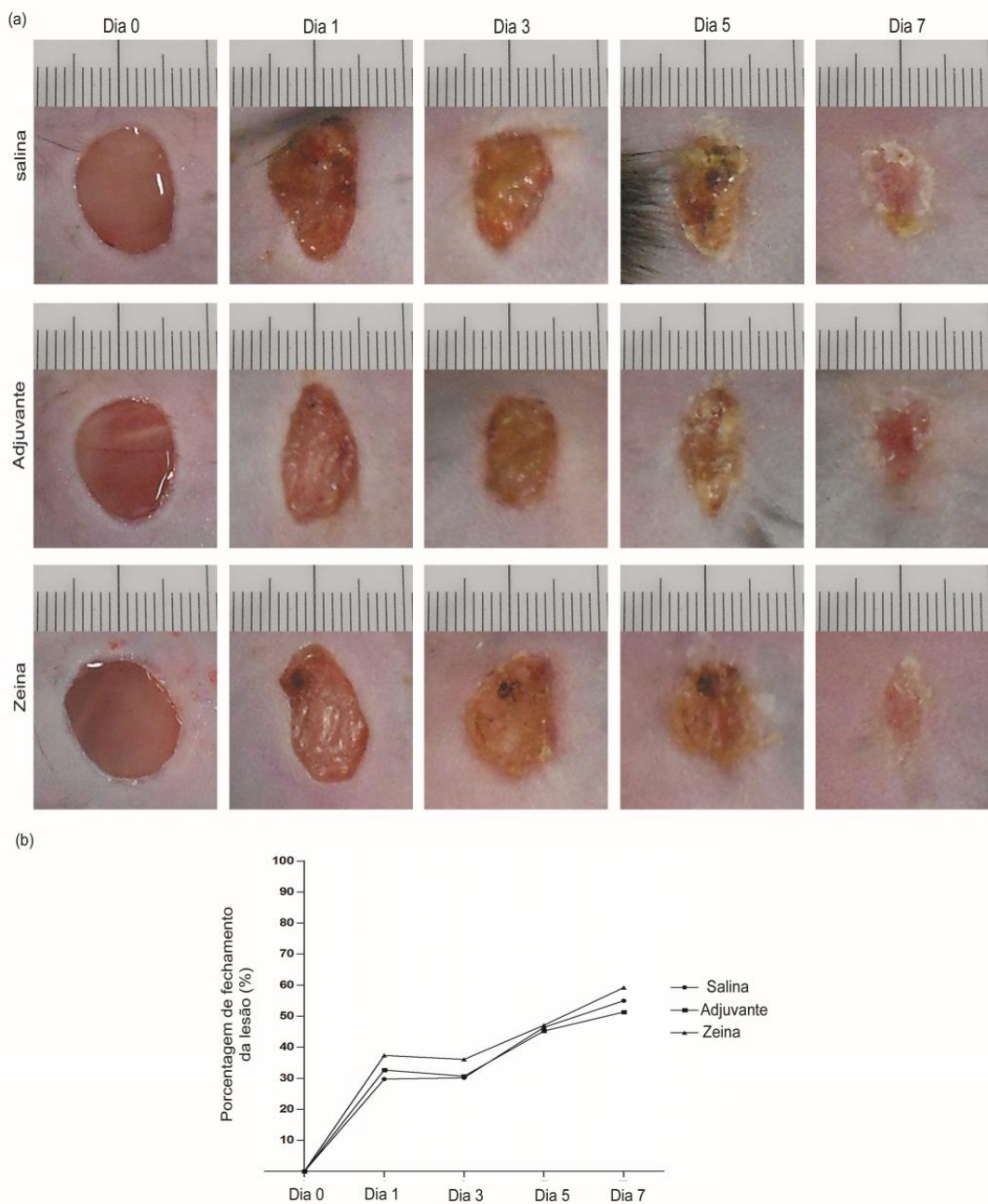


Figura 7. Injeção subcutânea de Zeina não altera a porcentagem de fechamento da lesão na pele. a) Fotografias macroscópicas das lesões na pele nos dias 0, 1, 3, 5, 7 pós-lesão em camundongos que receberam uma injeção s.c. de Salina, Adjuvante ou Zeina+Adjuvante. b) Porcentagem de fechamento das lesões nos dias 0, 1, 3, 5, 7 pós-lesão. Dados representam a média \pm SEM. N= 6 animais, 12 lesões.

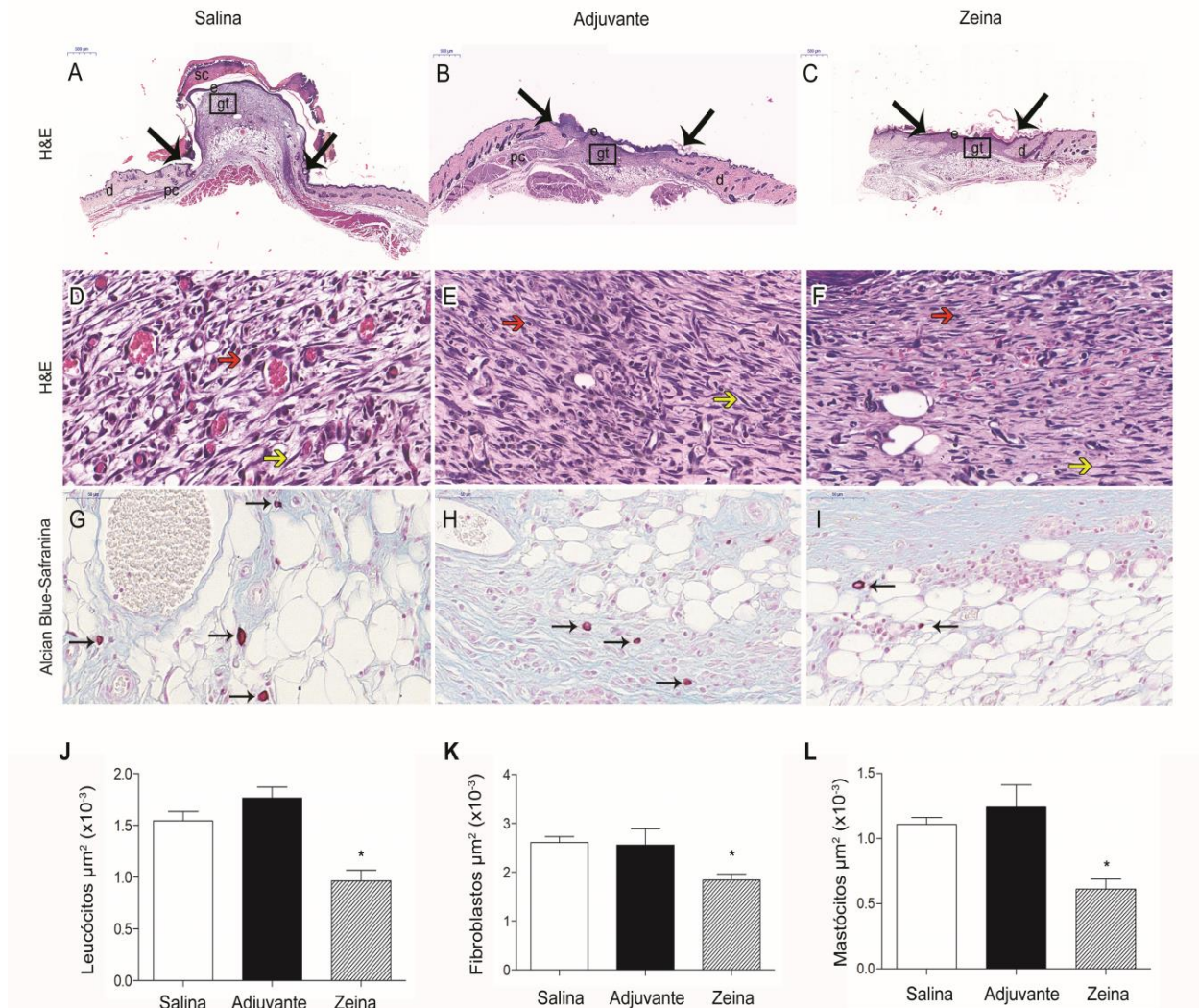


Figura 8. Injeção subcutânea de Zeina reduziu o infiltrado inflamatório na área da lesão.

fotomicrografias representativas de fragmentos de pele no dia 7 após a lesão corados com H&E (A-E) ou Alcian Blue-Safranina (G-I) em animais que receberam Salina, Adjuvante ou Zeina+Adjuvante. Quadros em (A-C) indicam a região que foi ampliada (D-F). Setas em A-C indicam a região da lesão, setas em D-F indicam leucócitos (setas vermelhas) e fibroblastos (setas amarelas) e setas nas imagens G-I indicam mastócitos. Letras pequenas representam: sc, crosta; e, epiderme; gt, tecido de granulação; pc, panículo carnoso; d, derme. Escala de barras: 500 μm (A-C), 20 μm (D-I). Gráficos mostram as análises morfométricas (média \pm SEM) de leucócitos (J), fibroblastos (K) e mastócitos (L). * $P \leq 0,05$ comparados com o grupo salina. N= 6 animais.

O grupo controle salina por sua vez, apresentava uma inflamação intensa, com grande exsudado de células polimorfonucleares, grande número de vasos, congestão vascular e edema. Além disso, havia deposição de uma matriz extracelular provisória pouco organizada e frouxa (Figura 8 D). O grupo controle adjuvante apresentou um padrão inflamatório diferente do grupo Salina com um maior número de células polimorfonucleares (Figura 8 E).

Análises morfométricas na área da lesão mostraram menor número de leucócitos (Figura 8 J), fibroblastos (Figura K) e mastócitos (Figura 8 L) no grupo que recebeu Zeina comparado com os grupos controle.

Os resultados apresentados das análises qualitativas e morfométricas do infiltrado inflamatório indicaram que a injeção de Zeina teve efeito anti-inflamatório. Para confirmar este efeito foi utilizada a técnica de imunofluorescência para quantificar a intensidade de fluorescência para CD45, que marca os leucócitos. A figura 9 A-D mostra que o grupo que recebeu Zeina, teve redução da expressão de CD45 mostrando que a via subcutânea apresentou efeitos anti-inflamatórios tais como os desencadeados pela via intraperitoneal (Cantaruti et al., 2019; Cantaruti et al., 2017; Costa et al., 2016; Costa et al., 2011).

A análise da presença de linfócitos (CD3+) e de macrófagos (F4/80+) mostrou que o grupo que recebeu Zeina teve aumento do número destas células no leito da lesão (Figura 9 E-L). Além disso, os miofibroblastos (α -SMA+) estavam reduzidos no grupo Zeina (Figura 9 M-P) em comparação com os grupos controle salina e Adjuvante.

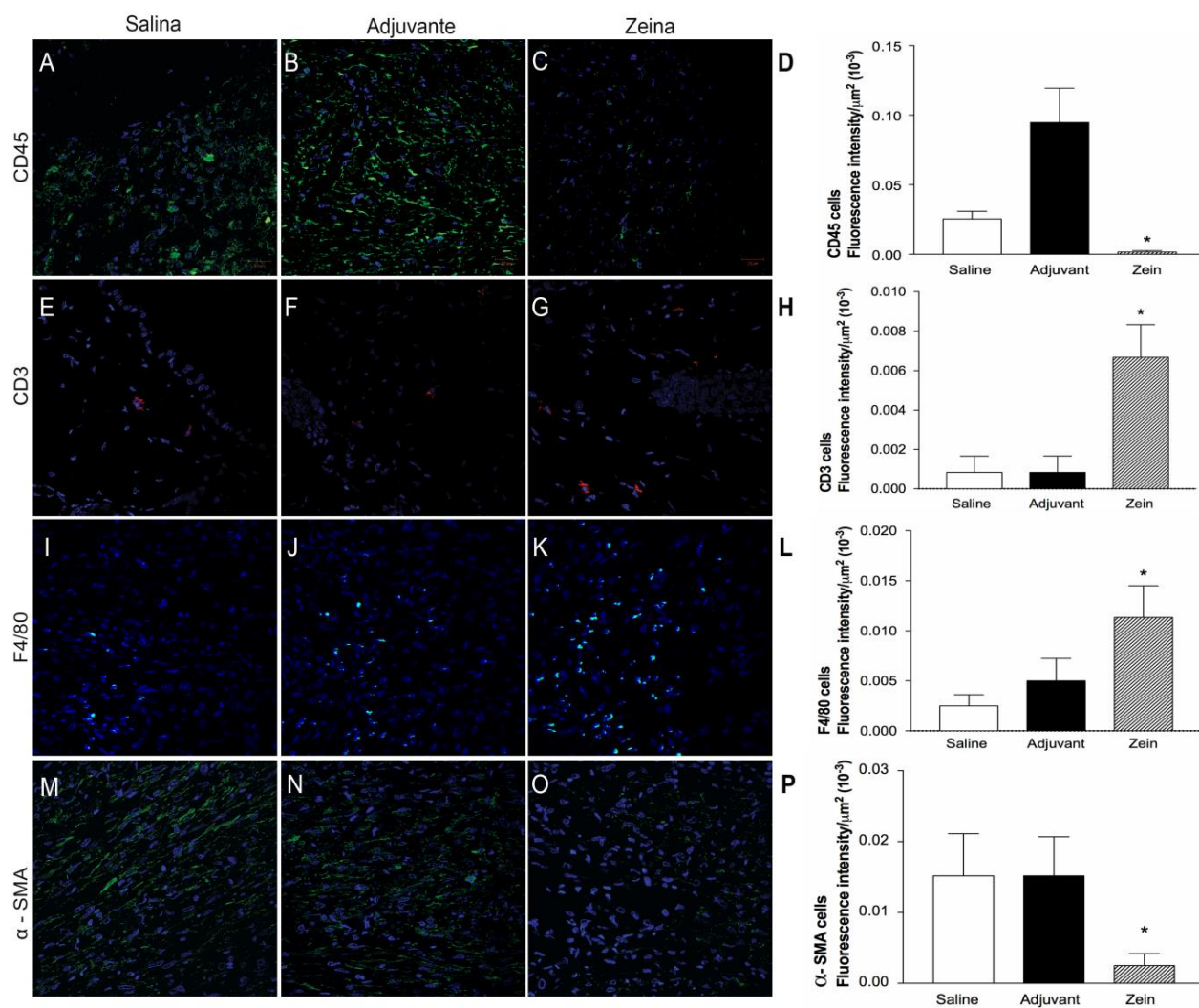


Figura 9. Injeção s.c. de zeína reduziu o número de leucócitos e miofibroblastos mas aumentou o número de linfócitos T e de macrófagos na área da lesão. Análise aos 7 dias após as lesões. Fotomicrografias representativas após imunofluorescência com anti-CD45 (leucócitos), anti-CD3 (linfócitos), anti-F4/80 (macrófagos) e anti- α -SMA (miofibroblastos) e contracoloração nuclear com 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, azul) em animais que receberam Salina, Adjuvante ou Zeina+adjuvante. Gráficos representam a intensidade de fluorescência ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$) para leucócitos (D), linfócitos (H), macrófagos (L) e miofibroblastos (P) nos diferentes grupos. * $P \leq 0,05$ estatisticamente diferente dos demais grupos. Objetivas de 63X, escala de barra 20 μm . N=6 animais.

5.2. Efeito da injeção subcutânea de Zeina no remodelamento da cicatriz, 40 dias após a lesão.

Análises macroscópicas da cicatriz aos 40 dias após a lesão mostraram que animais injetados com Zeina apresentaram uma cicatriz com contornos mais regulares e esteticamente melhor quando comparados com os grupos controle Salina e Adjuvante (Figura 10).

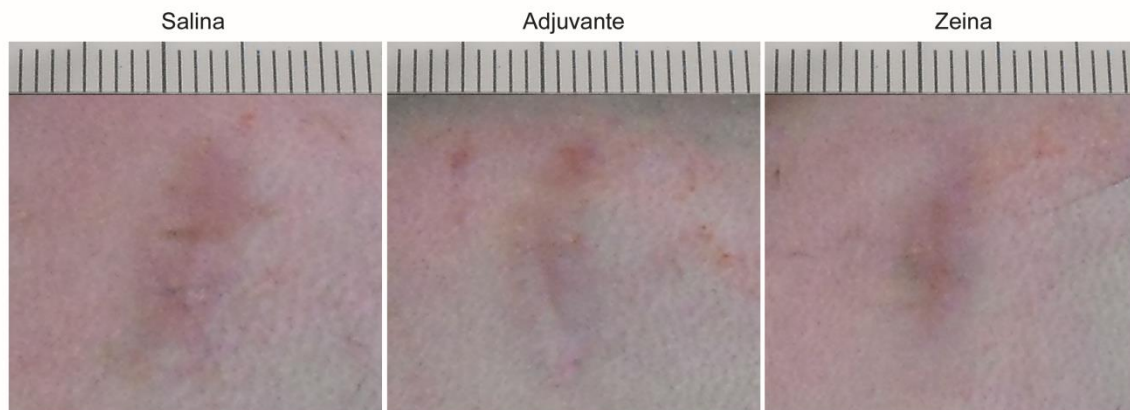


Figura 10. Fotografias macroscópicas representativas da cicatriz aos 40 dias após a lesão na pele dos grupos controle Salina e Adjuvante e do grupo que recebeu Zeina.

Em estudos microscópicos as cicatrizes dos grupos que receberam Salina, Adjuvante e Zeina foram comparadas entre si e com a pele intacta usando duas colorações que permitem avaliar a distribuição, deposição, organização e espessura das fibras colágenas. Os fragmentos de tecidos foram corados com Tricrômico de Masson e Picrosirius red. Na figura 11 é possível observar o epitélio reconstituído, podendo distinguir o local da cicatriz pela ausência dos anexos da pele (fóliculo piloso, glândulas sebáceas). Nos animais dos grupos Salina e Adjuvante observa-se nas cicatrizes fibras de colágeno paralelas à epiderme e

com uma menor birrefringência, de cor verde-amarela, que indicam uma organização das fibras com espessura mais delgada quando comparada com as fibras da cicatriz do grupo Zeina que se parecem mais com as fibras da pele intacta, onde a orientação das fibras colágenas apresenta a arquitetura de um arranjo em forma de rede (Figura 11 A). Nos animais que receberam Adjuvante as fibras colágenas estavam organizadas com arranjo menos denso, com uma orientação paralela entre as fibras e ausência de organização da derme papilar. No grupo que recebeu Zeina a região da cicatriz estava com a derme papilar reorganizada e as fibras de colágeno com maior birrefringência vermelha-laranja e orientação mais em formato de rede, semelhante à pele intacta (Figura 11 A).

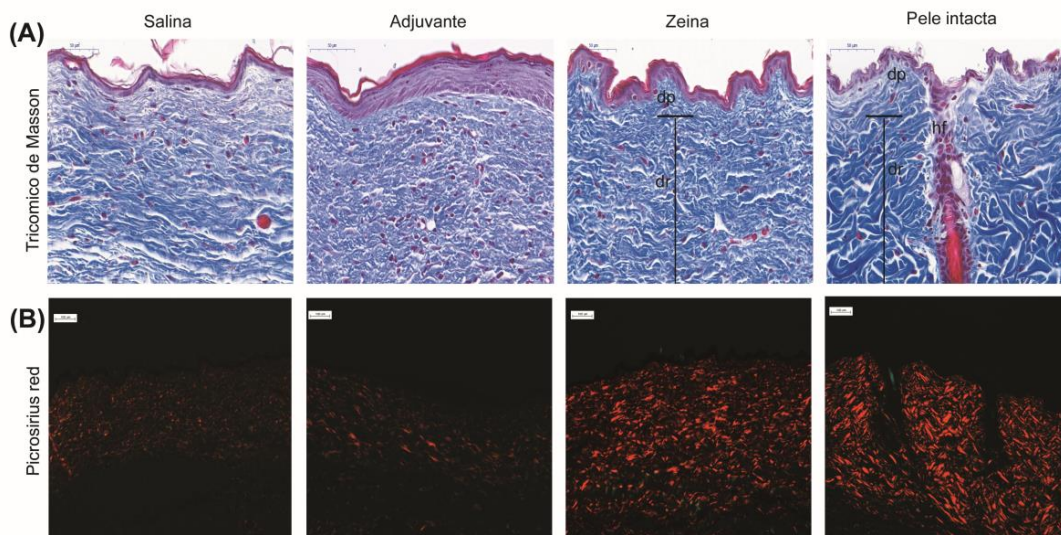


Figura 11. Injeção subcutânea de Zeina minutos antes da lesão melhorou a deposição de colágenos na neoderme. Fotomicrografias representativas de fragmentos de pele com a cicatriz coletados 40 dias pós-lesão. Letra A ilustra a deposição das fibras de colágeno após a coloração com Tricromático de Masson (fibras em azul). Letra B ilustra a birrefringência das fibras de colágeno coradas com Picrosirius red e visualizadas com polarizador. Todos os grupos foram comparados com fragmentos de pele intacta corados com Tricromático de Masson (A), Picrosirius red (B). Escala de barras: 50 μ m.

5.3. Efeito da injeção subcutânea de Zeina na deposição das fibras elásticas aos 40 dias após a lesão

A análise de fibras elásticas foi realizada pelo método de coloração resorcina-fucsina de Weigert. As fibras elásticas são coradas em preto e podem ser diferenciadas em três tipos de acordo com a quantidade crescente de elastina associada às microfibrilas elásticas: oxitalânicas, elaunínicas e maduras. A figura 12 apresenta imagens representativas da cicatriz 40 dias após a lesão. Pode-se observar que animais que receberam injeção s.c de Zeina mostraram uma melhor reorganização das fibras elásticas, que se apresentam mais esparsas em toda a neoderme e com maior presença de fibras elaunínicas, um padrão mais semelhante às fibras elásticas que se encontram na pele intacta (Figura 12 D, F). As fibras eulanínicas são mais espessas e são consideradas importantes no processo de elastogênese da pele. Animais que receberam injeção s.c de Salina apresentavam maior concentração de fibras elásticas mais finas, indicando maior presença de fibras oxitalânicas, consideradas fibras mais jovens (Figura 12 A, B). O grupo de animais que recebeu injeção s.c de Adjuvante mostrava uma organização das fibras elásticas semelhantes ao grupo Salina contendo mais fibras oxitalânicas, porém mais concentradas na região subepitelial.

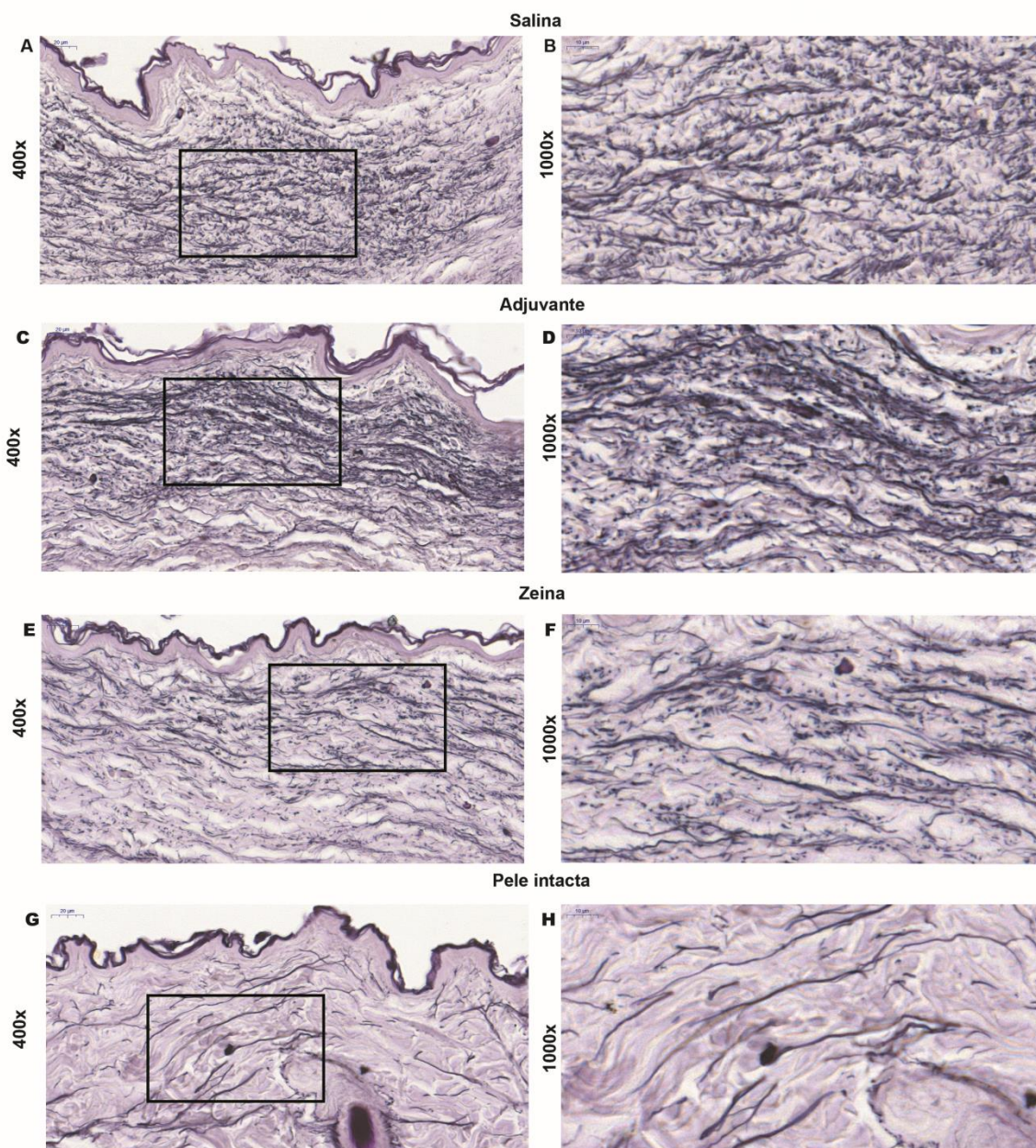


Figura 12. A injeção s.c. de Zeina melhorou a deposição das fibras elásticas após a lesão. Fragmentos de pele com a cicatriz coletados 40 dias pós-lesão corados pelo método resorsina-fucsina de Weigert para identificar as fibras elásticas. Letras A, B, animais que receberam Salina. Letras C, D animais que receberam Adjuvante. Letras E, F animais que receberam Zeina+adjuvante. Letras G, H, pele intacta. Escala de barras: 20µm (aumento de 400x) e 10µm (aumento de 1000x).

5.4. Efeitos da aplicação tópica de proteínas toleradas.

Foram utilizadas duas proteínas para comparação dos efeitos da aplicação tópica de proteínas toleradas no reparo de lesões cutâneas. Como a OVA não está presente na ração dos camundongos, esta proteína foi dada aos animais, diluída em água, por 5 dias consecutivos, antes das lesões.

Análises macroscópicas do fechamento das lesões mostraram que a aplicação tópica de proteínas durante sete dias consecutivos, seja nos grupos que ingeriram as proteínas (Zeina tolerante e OVA tolerante) ou não ingeriram (OVA não tolerante) não alterou o processo (Figura 13). A porcentagem de fechamento da lesão nos dias 0, 1, 3, 5, 7 não foi significativamente diferente entre os grupos (Figura 13B). Aos 7 dias após a lesão, a reepitelização estava completa em todos os grupos (Figura 14).

Análises qualitativas de pele aos 7 dias após a lesão mostraram que os grupos controle (Salina e OVA não tolerante) apresentavam inflamação intensa com exsudação de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, crostas sobre a área da lesão, maior área de tecido de granulação e alta celularidade na derme adjacente à lesão (Figura 14). Nos animais que sofreram aplicação tópica de proteínas previamente ingeridas, seja Zeina ou OVA, havia inflamação menor com redução leve a moderada de leucócitos no leito da lesão e redução da área do tecido de granulação (Figura 14). As análises morfométricas mostraram menor número de mastócitos (Figura 15), leucócitos e fibroblastos (Figura 14) nos grupos tolerantes (Zeina e OVA) comparados com os grupos controle (Salina e OVA não tolerante).

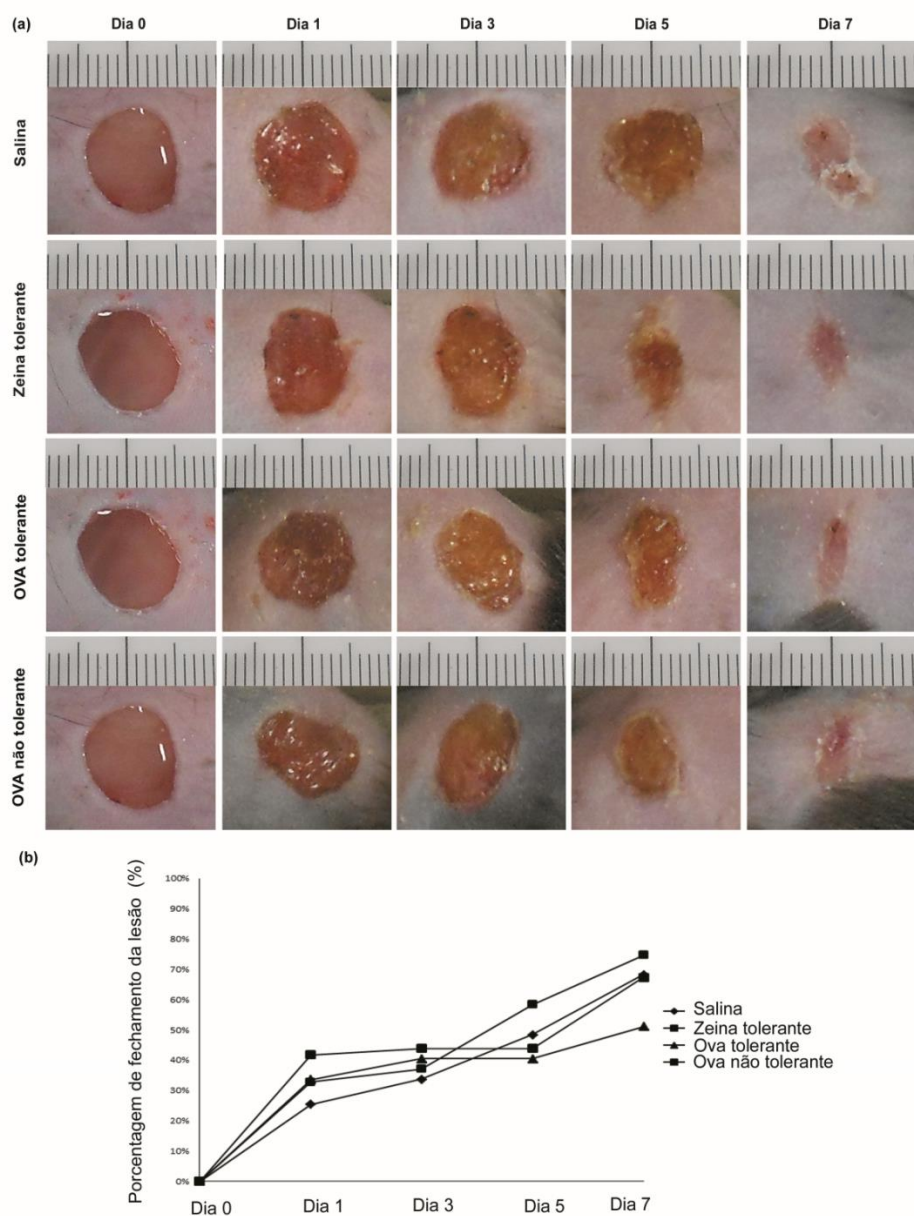


Figura 13. A aplicação tópica de Zeina ou OVA não interferiu com o fechamento da lesão na pele. a) Fotos macroscópicas de lesões nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 em camundongos que receberam aplicação de Salina, Zeina tolerante, OVA tolerante e OVA não tolerante, nas lesões. b) Porcentagem de fechamento da lesão nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 pós-lesão. Dados representam a média \pm SEM. N= 6 animais, 12 lesões.

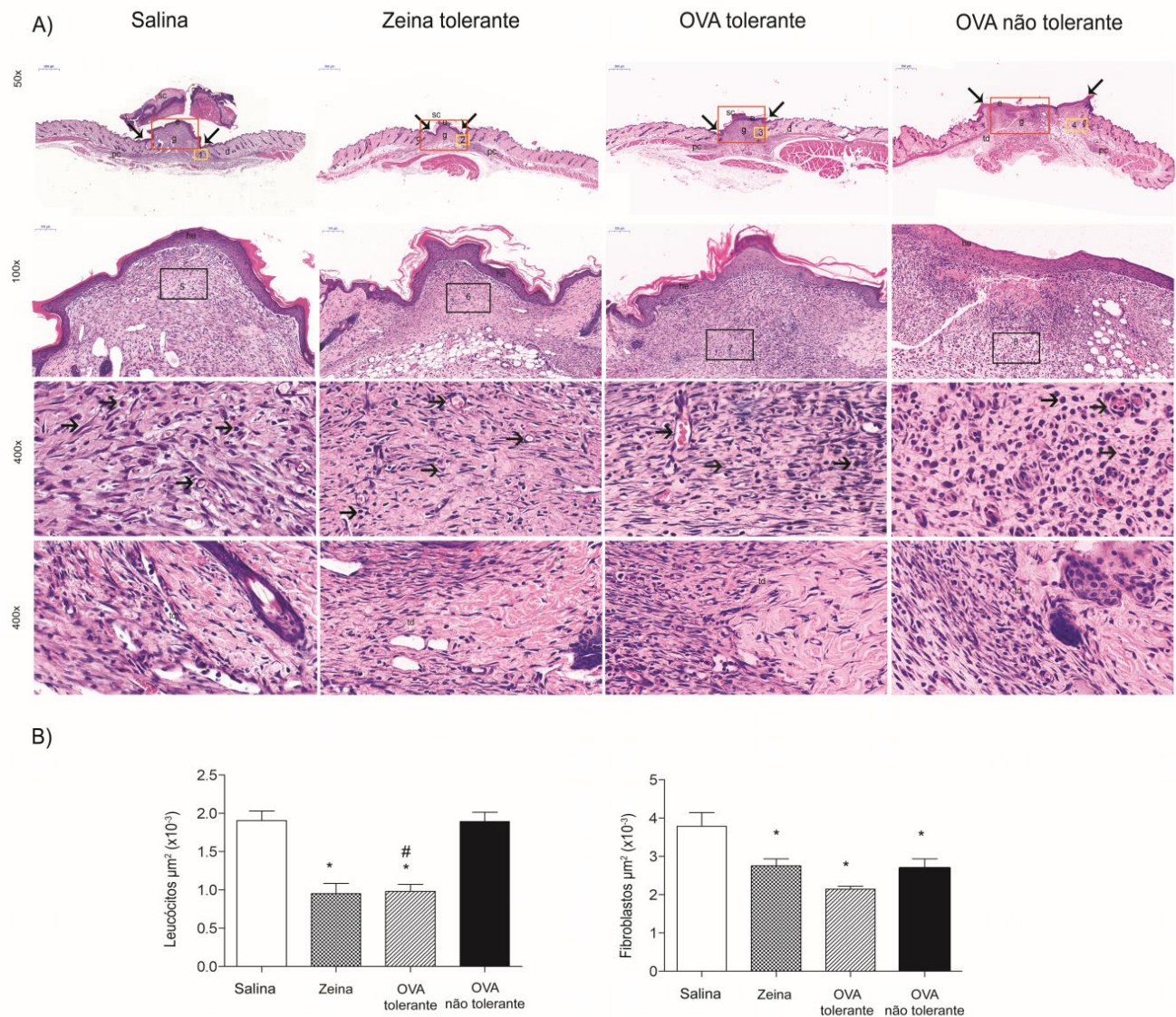


Figura 14. A aplicação tópica de Zeina ou OVA em animais que ingeriram estas proteínas reduziu o infiltrado inflamatório nas lesões. A) Coloração H&E em fragmentos de pele com a lesão no dia 7, em camundongos que receberam Salina, Zeina tolerante, OVA tolerante e OVA não tolerante. As setas indicam o local onde foi realizada a lesão, e as letras pequenas representam: sc, crosta; e, epiderme; g, tecido de granulação; pc, panículo carnososo; d, derme; he, epiderme hipertrófica; td, transição derme. Caixas em vermelho nas imagens da primeira linha representam o local da lesão em maior aumento da segunda linha. Caixas amarelas de 1 a 4 nas imagens da primeira linha indicam a área de transição entre o tecido de granulação e o tecido adjacente mostrado em maior aumento nas imagens da última linha. Observa-se que a transição entre o

tecido de granulação e o tecido adjacente tem um limite muito mais sutil no grupo Zeina tolerante. Caixas de 5 a 8 nas imagens da segunda linha indicam a região do tecido de granulação que foi ampliada para ilustrar leucócitos, fibroblastos e vasos capilares (setas pretas) nas imagens da terceira linha. B) Análises morfométricas de leucócitos e fibroblastos em camundongos do grupo controle que receberam uma aplicação de Salina (barra branca) e OVA não tolerante (animais sem contato prévio por via oral com a proteína, barra preta) e os grupos tolerantes (animais com contato prévio por via oral com a proteína) que receberam uma aplicação de Zeina (barra quadriculada) e OVA (barra de linhas). Dados representam a média \pm SEM. * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo salina e # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo OVA não tolerante. Escala de barras: 500 μ m, 100 μ m, 20 μ m. N= 6 animais.

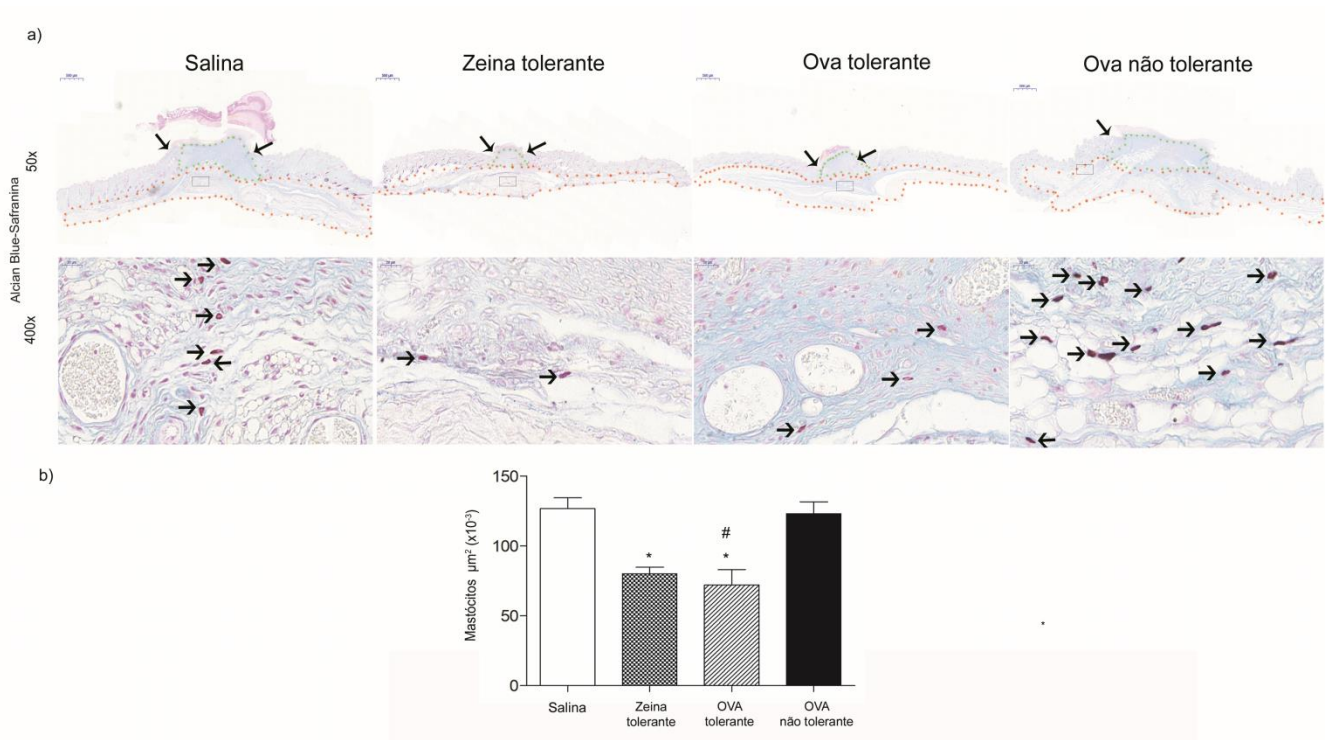


Figura 15. A aplicação tópica de OVA e Zeina em camundongos que ingeriram estas proteínas reduziu o número de mastócitos. a) Fotomicrografias da coloração Alcian-Blue safranina de fragmentos de pele com a lesão no dia 7, setas indicam o local da lesão e a região pontilhada de cor verde o tecido de granulação. A região pontilhada de vermelho indica o local que foi considerado para contar o número de mastócitos. b) Análises morfométricas de mastócitos em camundongos do grupo controle que receberam uma aplicação de Salina (barra branca) e OVA

não tolerante (animais sem contato prévio por via oral com a proteína, barra preta) e os grupos tolerantes (animais com contato prévio por via oral com a proteína) que receberam uma aplicação de Zeina (barra de quadros) e OVA (barra de linhas). Dados representam a média \pm SEM. * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo salina e # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo OVA não tolerante. N= 6 animais.

A aplicação tópica de OVA ou Zeina em animais que ingeriram estas proteínas reduziu a expressão de CD45 e de α -SMA na área da lesão, comparada com os grupos controle (Figura 16). Assim, a re-exposição, através da aplicação tópica, a proteínas previamente ingeridas apresentou efeitos anti-inflamatórios e de redução do número de miofibroblastos tais como os desencadeados pela re-exposição através da via intraperitoneal (Cantaruti et al., 2019; Cantaruti et al., 2017; Costa et al., 2016; Costa et al., 2011) e via subcutânea.

Vimentina é uma proteína que compõe filamentos intermediários em células mesenquimais, tais como fibroblastos. Usamos anticorpo anti-vimentina para avaliar a presença destas células na área da lesão. A figura 16 mostra que os animais que não ingeriram OVA e que receberam a aplicação de OVA tiveram menor expressão de Vimentina que os animais controle que receberam salina.

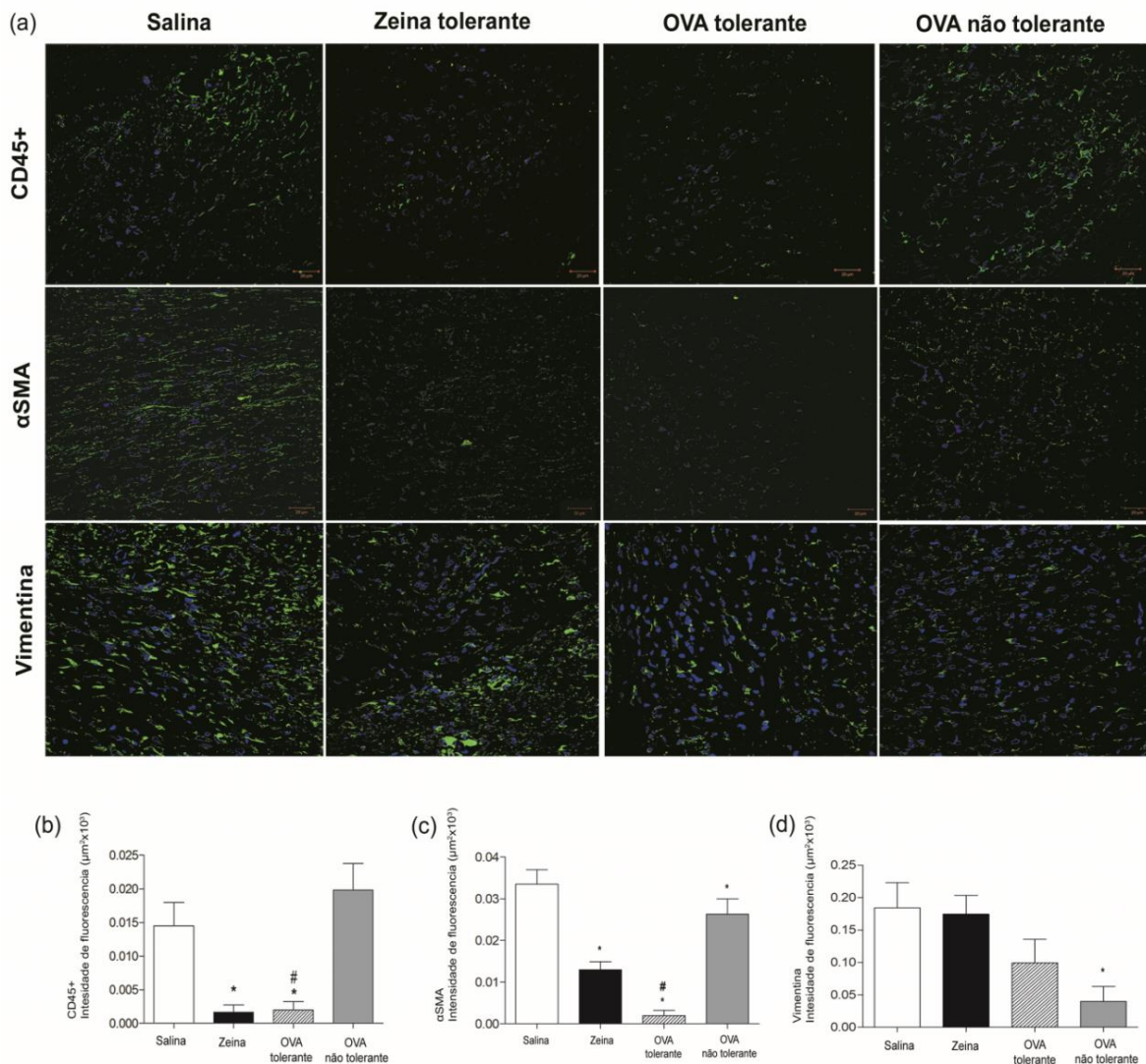


Figura 16. A aplicação tópica de OVA e Zeina em camundongos que ingeriram estas proteínas reduziu o número de leucócitos e miofibroblastos e não alterou a expressão de Vimentina. a) Imagens representativas da expressão de CD45 (leucócitos), α -SMA (miofibroblastos) e Vimentina no tecido de granulação de animais que receberam aplicação tópica de Salina (grupo controle), Zeina, OVA tolerante e OVA não tolerante (grupo controle) 7 dias após a lesão. Contracoloração nuclear com 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, azul). Gráficos representam a média \pm SEM da intensidade de fluorescência ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$) com anti-CD45 (b), anti- α -SMA (c) e anti-vimentina (d). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo controle salina. N= 6 animais.

5.5. Análise qualitativa da organização da matriz provisória com Tricrômico de Masson.

Análises histológicas foram realizadas para investigar a deposição das fibras de colágeno na região da cicatriz aos sete dias após a lesão. Na figura 17 nota-se que o padrão de deposição de colágeno na região do reparo apresentava-se diferente nos grupos tolerantes OVA e Zeina quando comparados com os grupos controle. Nos grupos tolerantes nota-se menor tamanho da área da cicatriz e mais fibras de colágeno refletindo em uma coloração mais azul no tecido cicatricial, comparados com grupos controle Salina e OVA não tolerante (Figura 17). Em especial no grupo Zeina, no sétimo dia após a lesão nota-se uma transição mais suave e delicada entre a área do tecido de granulação e a área adjacente à lesão, com um arranjo de fibras de colágeno mais organizado e com menor celularidade. Estas características da área da lesão dos animais que receberam Zeina torna mais difícil distinguir o limite entre a região da lesão e a pele intacta (Figura 17). No caso do grupo OVA tolerante também é possível ver que na região de transição entre o tecido cicatricial e a derme adjacente ocorre um arranjo de fibras diferentes dos grupos controle Salina e OVA não tolerante, porém menos suave que o grupo Zeina (Figura 17).

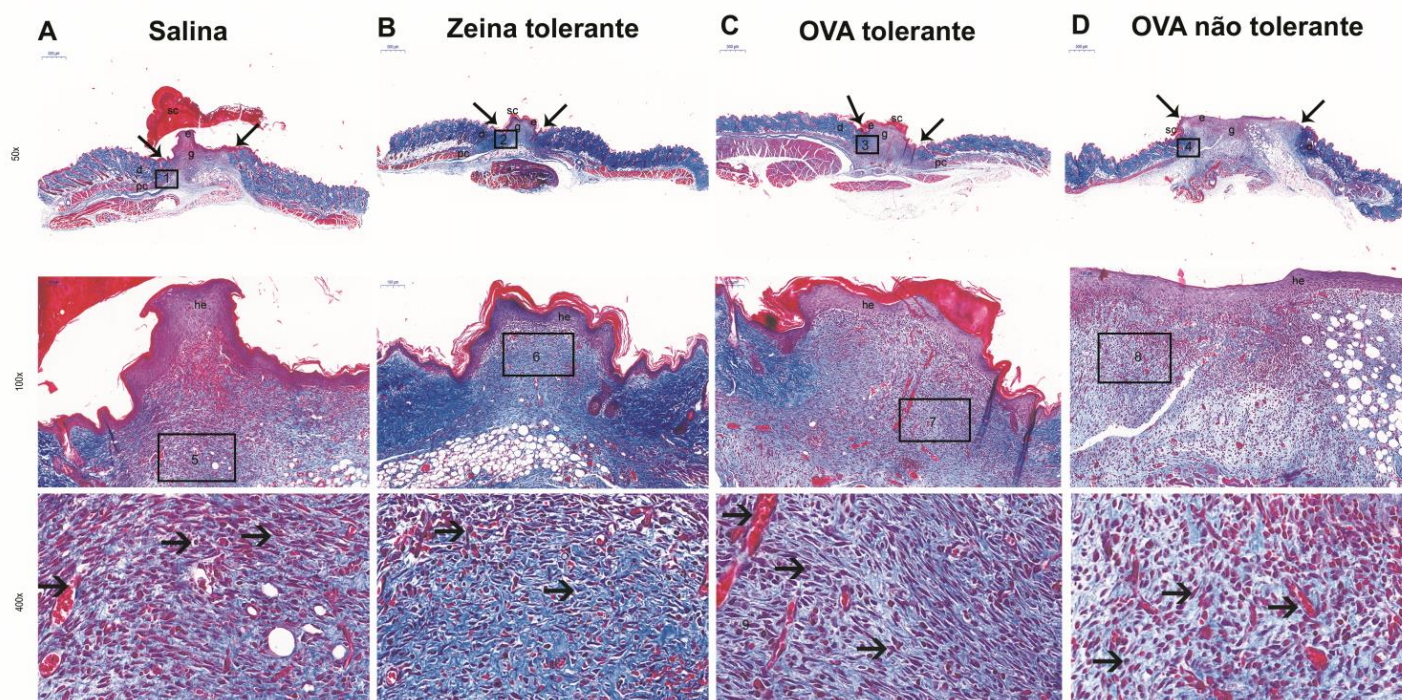


Figura 17. A aplicação tópica de Zeina e OVA nas lesões de camundongos tolerantes melhorou a organização da matriz extracelular. Coloração histológica com Tricômico de Masson de fragmentos de pele no dia 7 pós-lesão, em camundongos controle não tolerantes que receberam Salina (A) e OVA (D) e em camundongos tolerantes que receberam Zeina (B) e OVA (C). As setas nas imagens da primeira linha indicam o local onde foi realizada a lesão e que está ampliada na segunda linha e as letras pequenas representam: sc, crosta; e, epiderme; g, tecido de granulação; pc, panículo carnoso; d, derme; he, epiderme hipertrófica. Caixas 1 a 4 nas imagens da primeira linha indicam a área de transição entre o tecido de granulação e a derme adjacente mostrada em maior aumento nas imagens da próxima figura (Figura 18). Caixas 5 a 8 nas imagens da segunda linha, situadas no tecido de granulação, estão em maior aumento nas imagens da terceira linha ilustrando leucócitos, fibroblastos e vasos (setas pretas). Escala de barras: 500 μ m, 100 μ m, 20 μ m.

Nos grupos controle Salina e OVA não tolerante nota-se uma maior nitidez no limite da transição entre a lesão e a derme adjacente, uma maior celularidade na área da lesão e menor quantidade de fibras colágenas, células com núcleo denso

e com presença de fibroblastos com morfologia quiescente (mais alongada) em comparação com os grupos tolerantes Zeina e OVA que onde foi possível identificar muitos fibroblastos com morfologia estrelada característicos de fibroblastos mais ativos pelo núcleo evidente e maior quantidade de prolongamentos citoplasmáticos (Carneiro, 2006) (Figura 18).

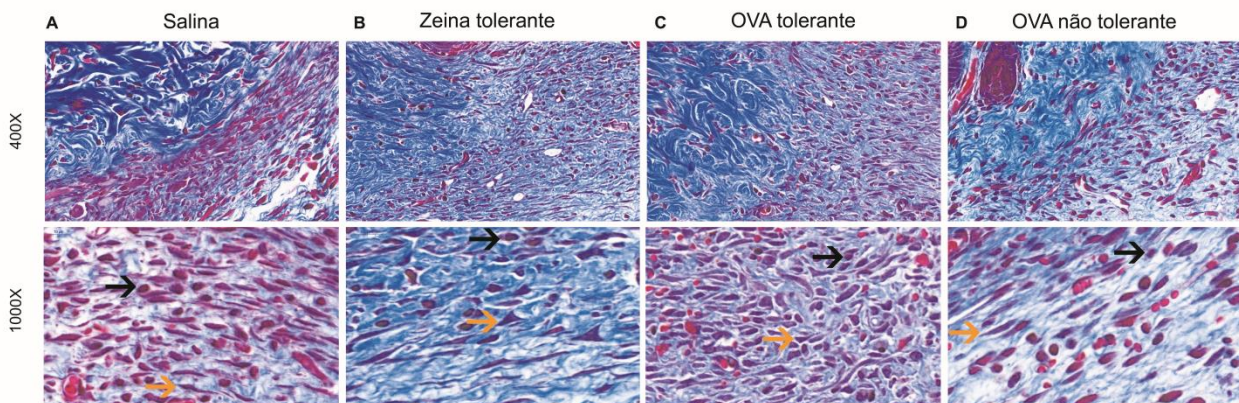


Figura 18. A área de transição entre o tecido de granulação e a derme adjacente se mostrou mais suave nos animais que receberam a aplicação tópica de Zeina. Na linha superior (aumento de 400x) estão às imagens representativas da região de transição entre a derme adjacente à área da lesão (voltada para a esquerda) e o tecido de granulação (voltada para a direita) em fragmentos de pele, no sétimo dia após a lesão, corados com Tricômico de Masson. Na linha inferior (aumento de 1000x), ampliação de uma região do tecido de granulação em camundongos tolerantes que receberam aplicação tópica de Zeina (B) e OVA (C) e em camundongos controle não tolerantes que receberam Salina (A) e OVA (D). Nas imagens ampliadas, estão ilustrados os fibroblastos (seta laranja) que nos grupos Zeina e OVA tolerante apresentam frequentemente a morfologia estrelada em vez da morfologia de fibroblastos quiescentes (alongados) mais frequente nos grupos Salina e OVA não tolerante. Setas pretas indicam a presença de leucócitos. Escala de barras: 50 μ m (linha superior), 10 μ m (linha inferior).

5.6. Efeito da aplicação tópica de Zeina 60 dias após a lesão

Uma vez que a aplicação tópica de Zeina alterou significativamente a deposição de colágeno aos 7 dias após a lesão, investigamos os efeitos deste tratamento na cicatriz após o remodelamento do colágeno, aos 60 dias após a lesão. Análises macroscópicas mostraram que os animais que receberam a aplicação tópica de Zeina apresentaram uma cicatriz mais delicada se comparados com os animais do grupo controle Salina (Figura 19) sem, no entanto, reduzir significativamente o tamanho da área da cicatriz (Figura 19).

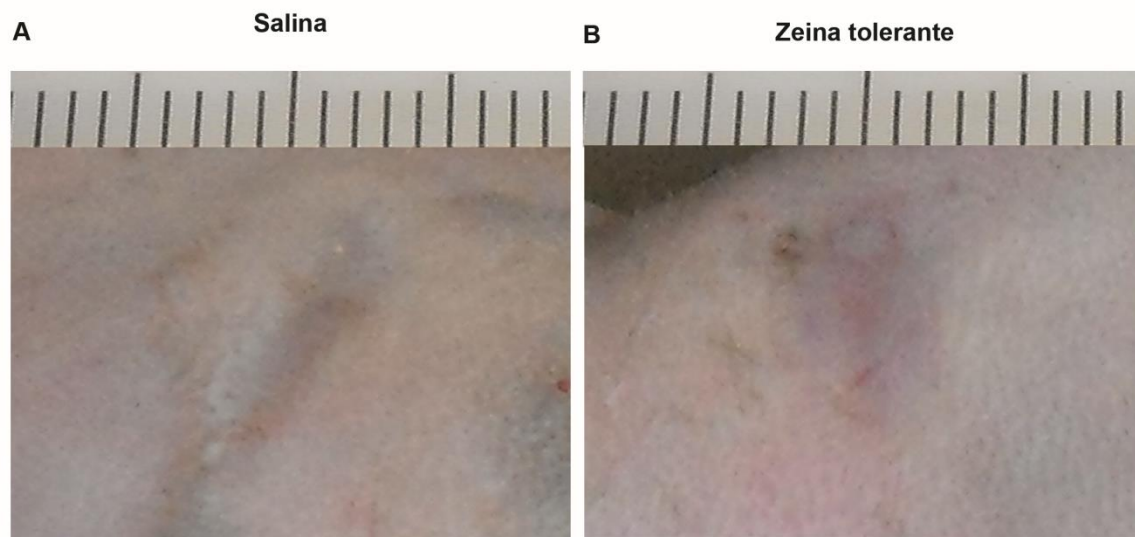


Figura 19. A aplicação tópica de Zeina na lesão atenuou a cicatriz. Letras A, B representam a aparência macroscópica da cicatriz 60 dias após a lesão na pele da região dorsal no grupo controle Salina e no grupo que recebeu Zeina.

Em seguida, a distribuição das fibras colágenas e sua espessura foram analisadas após coloração com Tricrômico de Masson e Picosirius red. Na região

da cicatriz não foram encontrados anexos da pele (foliculo piloso, glândulas sebáceas) (Figura 20) que podem ser vistos na pele intacta (Figura 20C, F). A cicatriz do grupo controle Salina apresenta reepitelização completa, fibras colágenas mais paralelas à epiderme e mais compactadas (Figura 20A) e com uma birrefringência verde-amarela característica de fibras menos espessas (Figura 20D). Por outro lado, as fibras do grupo Zeina têm um arranjo mais parecido com o da pele intacta com arranjo em forma de rede em vez de paralelas à epiderme e com uma birrefringência mais intensa com cor vermelha-laranja brilhante que indica fibras mais espessas e maduras (Figura 20B,E). Além disso, no grupo que recebeu Zeina a região da derme papilar estava re-organizada, o que não ocorreu na cicatriz do grupo controle Salina (Figura 20).

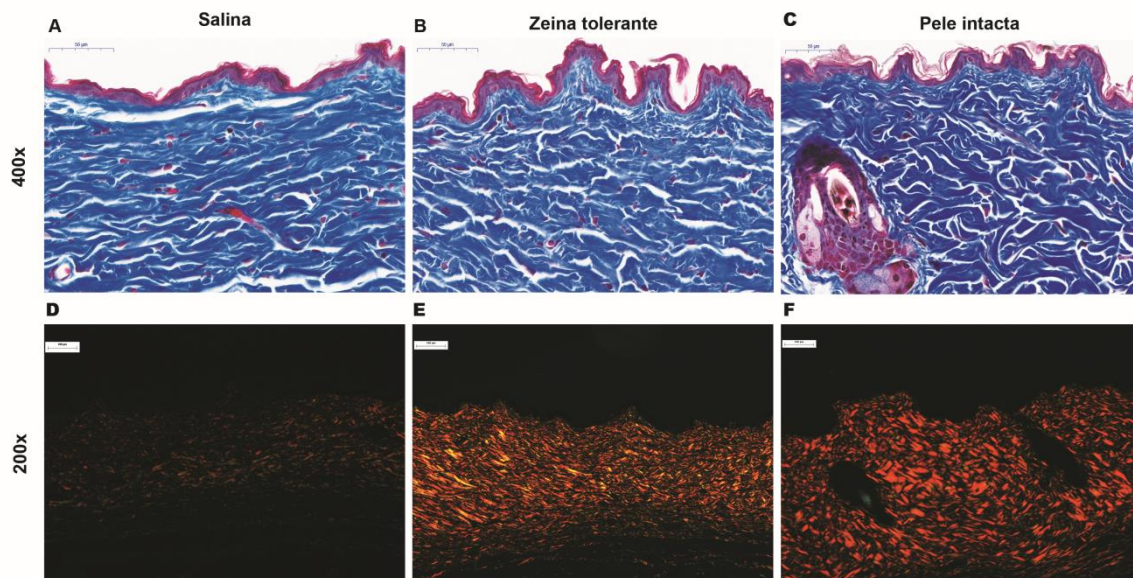


Figura 20. A aplicação tópica de Zeina na lesão melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme. Letras A-C representam fragmentos de pele com a cicatriz coletados 60 dias pós-lesão e corados com Tricromático de Masson (fibras azul). Letras D-F mostram imagens representativas da birrefringência das fibras de colágeno coradas com Picrosirius red e analisados sob luz polarizada. Camundongos receberam aplicação tópica de salina (A, D) ou Zeina (B, E) dos dias 1 a 7 após as lesões em comparação com pele intacta (C, F).

5.7. Efeitos da aplicação tópica de proteínas toleradas na organização das fibras elásticas 60 dias após a lesão

A figura 21 mostra imagens representativas da cicatriz 60 dias pós-lesão comparadas com pele sem lesão (intacta). Pode-se observar que animais que receberam aplicação tópica de Zeina mostraram uma melhor re-organização das fibras elásticas que se mostram mais delicadas com maior presença de fibras eulanínicas semelhante às fibras que se encontram na pele intacta (Figura 21D, F). As fibras eulanínicas são mais espessas e são importantes no processo de elastogênese da pele. Animais que receberam aplicação de Salina apresentaram fibras elásticas mais desorganizadas e com maior presença de fibras oxitalânicas, consideradas fibras mais jovens (Figura 22A, B).

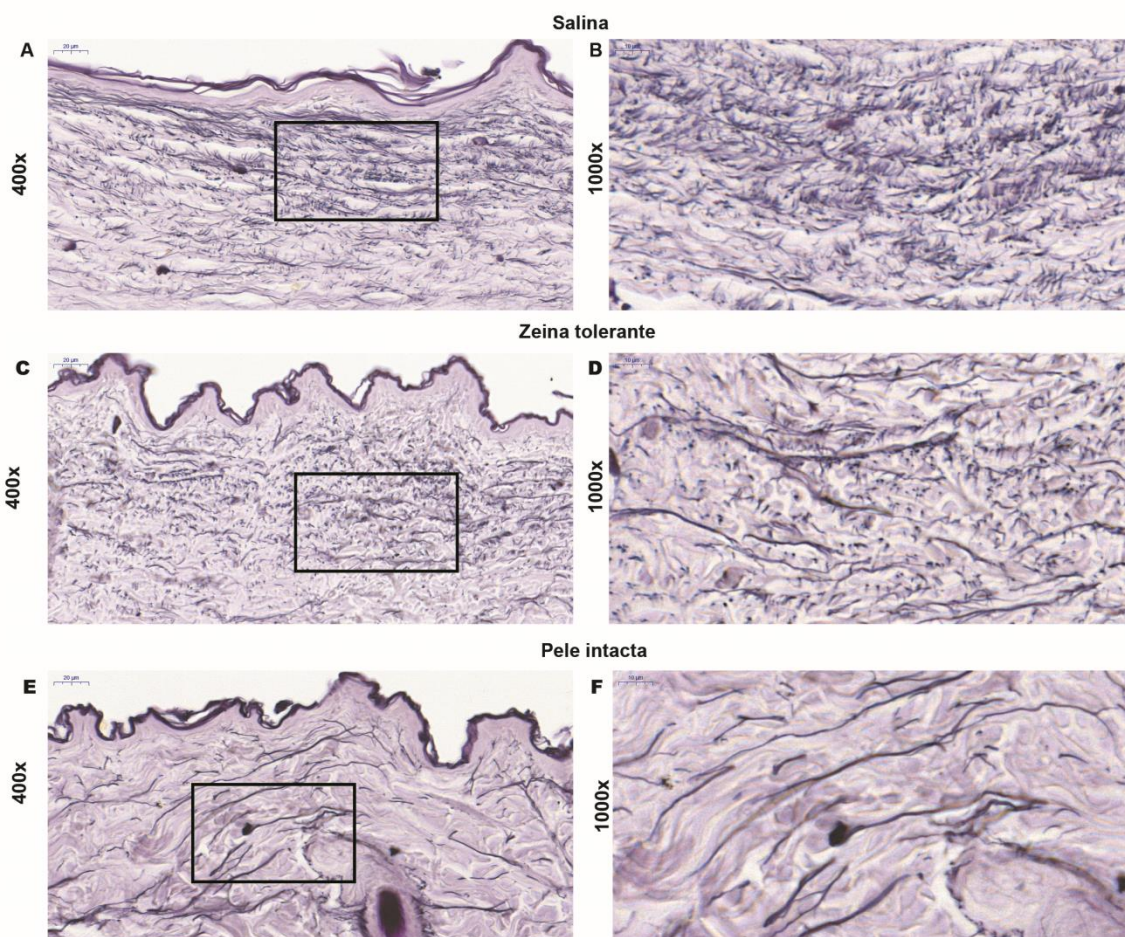


Figura 21. A aplicação tópica de Zeina na lesão melhorou a reorganização das fibras de colágeno na neoderme. Fotomicrografias de fragmentos de pele com a cicatriz coletados 60 dias pós-lesão corados pelo método resorsina-fucsina de Weigert. Letras A, B (animais que receberam aplicação de Salina). Letras C, D (animais que receberam aplicação de Zeina). Letras E, F pele intacta. Escala de barras: 20µm (aumento de 400x) e 10µm (aumento de 1000x).

5.8. Lesões simultâneas feitas na pele do dorso e na orelha para verificar se a aplicação tópica de proteínas toleradas na pele do dorso tem efeitos sistêmicos

Uma vez que a aplicação tópica de proteínas previamente ingeridas foi feita sem adjuvante e teve efeito anti-inflamatório e positivo no reparo das lesões cutâneas perguntamos se este tratamento tinha efeito sistêmico capaz de alterar a inflamação em lesões feitas em outras regiões do corpo.

Análises morfométricas aos 7 dias após as lesões mostraram que as aplicações de Zeina ou OVA nas lesões da pele do dorso de animais que ingeriram previamente estas proteínas reduziram o número de mastócitos mas não alteraram significativamente o número total de leucócitos nem de fibroblastos em lesões concomitantes nas orelhas.

Análises qualitativas da área da lesão nas orelhas mostraram que nos grupos tolerantes há uma tendência à circunscrição do infiltrado inflamatório que se apresentou de intensidade leve a moderado caracterizado por células mononucleares e neutrófilos. O epitélio neoformado apresentava-se hiperplásico e havia presença de tecido fibroso vascularizado. Não se observou neoformação de cartilagem.

Por outro lado, as análises qualitativas das lesões na orelha dos grupos não tolerantes aos sete dias após a lesão indicaram maior inflamação, com edema, congestão vascular e menor circunscrição do infiltrado inflamatório. O epitélio neoformado apresentava-se hiperplásico e havia uma matriz frouxa, provisória de fibrina. Aos 7 dias após a lesão não se observou neoformação de cartilagem.

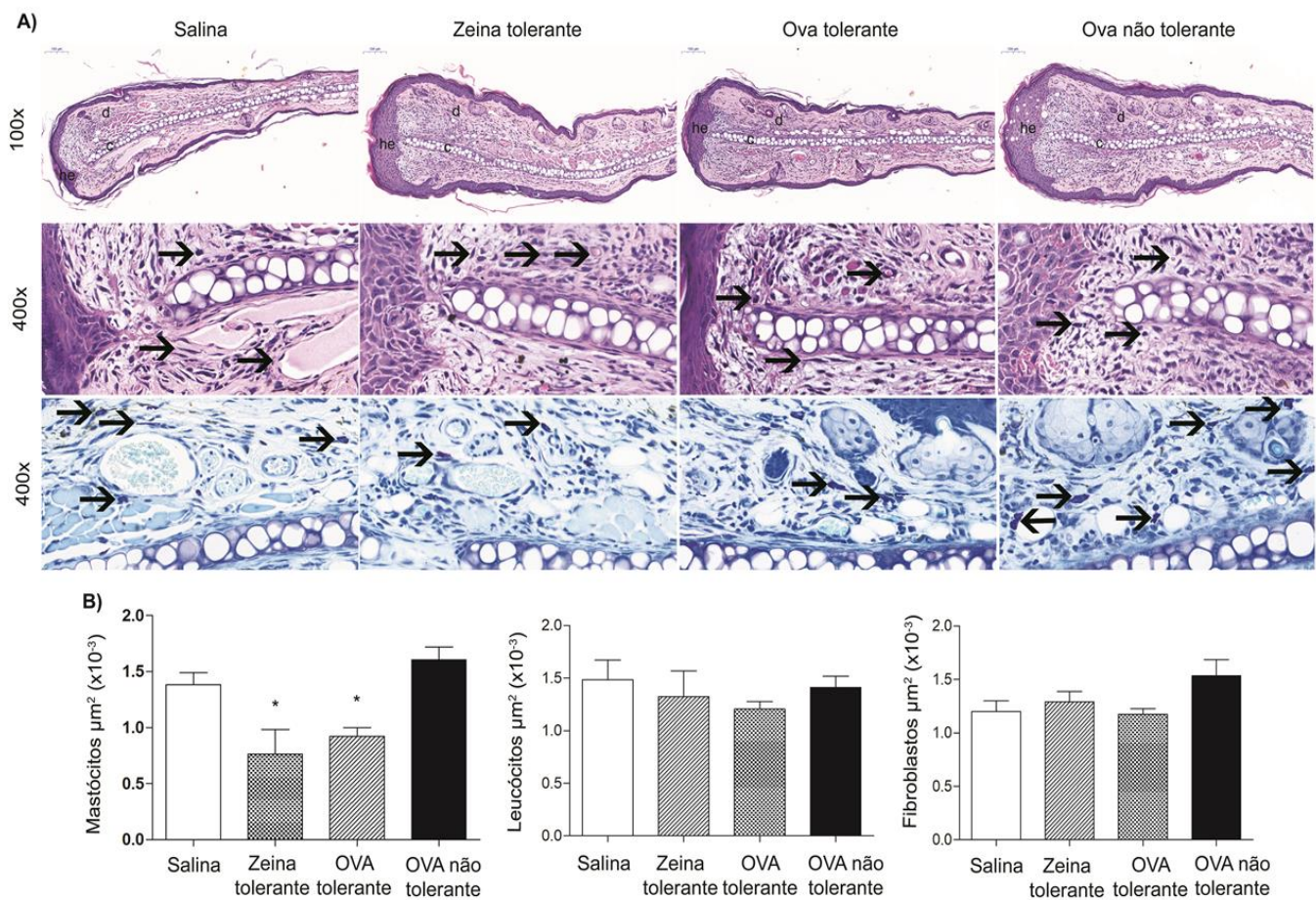


Figura 22. As aplicações de Zeina ou OVA nas lesões da pele do dorso de animais que ingeriram previamente estas proteínas reduziu o número de mastócitos, mas não alterou o número total de leucócitos nem de fibroblastos em lesões concomitantes nas orelhas. Fotomicrografias da análise do infiltrado inflamatório e de fibroblastos em lesões na orelha aos 7 dias pós-lesão, após coloração com H&E (primeira linha aumento de 100x e segunda linha aumento de 400x). As letras pequenas representam: he, epiderme hipertrófica; d, derme; c, cartilagem. Análise de mastócitos após coloração com azul de toluidina (terceira linha, aumento de 400x). Setas indicam leucócitos, fibroblastos e mastócitos. Escala de barras: 500 μm , 20 μm .

6. DISCUSSÃO

O reparo de lesões cutâneas é essencial para a manutenção da integridade dos animais e envolve a participação de vários tipos celulares, tanto residentes na pele quanto recrutadas para o leito da lesão. Células inflamatórias são recrutadas para o leito da ferida logo após a injúria e podem ser provenientes de células circulantes ou mesmo da ativação e migração de células residentes no tecido. Há uma cinética característica do influxo das células inflamatórias no reparo das lesões cutâneas, sendo que a infiltração inicial de neutrófilos é seguida por macrófagos, mastócitos e linfócitos. Estas células influenciam a ativação e proliferação de queratinócitos e fibroblastos que irão fazer o reparo da pele. Os fibroblastos sintetizam a matriz extracelular, como vários tipos de colágenos e fibras do sistema elástico. Como o sistema imunológico está envolvido nas fases iniciais do reparo de lesões, alterações neste sistema podem resultar num microambiente pro-regenerativo e em melhor cicatrização ou em cicatrizes patológicas (Larouche, Sheoran, Maruyama, & Martino, 2018; Leavitt et al., 2016).

Injeções intraperitoneais de proteínas imunologicamente toleradas produzem efeitos sistêmicos que interferem no reparo de lesões na pele, reduzindo a inflamação e melhorando a deposição de colágeno (T. Cantaruti et al., 2019; T. A. Cantaruti, Costa, de Souza, Vaz, & Carvalho, 2017; Costa et al., 2016; Costa et al., 2011). Aqui nós demonstramos que aplicações de proteínas toleradas pela via s.c. e tópica também reduzem a inflamação e melhoram a cicatrização de feridas na pele de camundongos.

Nos estudos de imunização e de tolerância oral, os adjuvantes são usados para ativar células apresentadoras de antígenos e os linfócitos (Vaz et al., 1981). Em todos os estudos anteriores sobre os efeitos indiretos e sistêmicos da tolerância oral foram usados adjuvantes durante as imunizações parenterais (Ramos et al., 2009; Costa et al., 2011; Azevedo et al., 2012; Costa et al., 2016; Cantaruti et al.,

2017, Cantaruti et al., 2019). A via subcutânea é uma via de acesso normalmente utilizada em vacinas que também utilizam adjuvante hidróxido de alumínio em suas composições. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que uma injeção s.c de Zeina até 5 dias antes das lesões têm efeitos positivos na cicatrização (Nóbrega, I. B, 2019. Dissertação de mestrado). Desta maneira, esta forma de intervenção pode vir a ser explorada em estudos clínicos visando melhorar a cicatrização de feridas, principalmente em casos de cirurgias programadas.

Em estudos preliminares de nosso grupo de pesquisa, foi observado que uma única aplicação de Zeina sem adjuvante não reduziu a inflamação no leito da ferida (dados não publicados). Aplicações tópicas de Zeina com adjuvante também não reduziram a inflamação (dados não publicados). No entanto, aqui mostramos que aplicações tópicas de proteínas previamente ingeridas (Zeina ou OVA), durante 7 dias consecutivos, sem adjuvante, reduziram a inflamação no leito das feridas e melhoraram a organização do colágeno na derme neoformada. Sugerimos que o ambiente da lesão na pele pode, por si mesmo, funcionar como efeito adjuvante para a ativação do sistema imune em contato com a solução de proteínas aplicadas diretamente nas lesões.

A Zeina é uma proteína do milho presente na dieta normal de camundongos enquanto a OVA, que é uma proteína que não faz parte da refeição dos camundongos, deve ser administrada por via oral antes da intervenção parenteral. Como os camundongos que não ingerem a OVA não são tolerantes a esta proteína, a administração parenteral de OVA em animais controle não tolerantes confirmam que os efeitos anti-inflamatórios e pró-regenerativos da aplicação de proteínas previamente ingeridas aqui observados são resultantes da tolerância oral imunológica. Nos animais que se tornam tolerantes após o contato com OVA por via oral durante três dias consecutivos a injeção intraperitoneal de OVA inibe reações inflamatórias a antígenos não relacionados, reduz a inflamação no

processo de reparo e reduz o tamanho da cicatriz (Carvalho et al., 1997; Costa et al., 2011). A Zeina, uma proteína que se encontra presente na ração de roedores, promove tolerância oral e esta tolerância é transferida da mãe para o feto, podendo influenciar no sistema imunológico da prole já durante a ontogenia (Clausen, 2002 ;Malandro, Mark J. Beveridge, Michael S. Kilberg, & Novak, 1996). Então não temos camundongos não tolerantes a Zeina para termos um controle não tolerante a esta proteína e garantir que o efeito da injeção de Zeina decorre da tolerância imunológica. Outros estudos estão em andamento no nosso laboratório, usando animais sem linfócitos, para testar os efeitos da injeção de Zeina no reparo de feridas.

É interessante observar que a administração de proteínas toleradas, seja por injeção subcutânea ou aplicação tópica reduziram o número de células inflamatórias no leito da lesão. No entanto, a aplicação tópica produziu um efeito na deposição de matriz provisória, visto aos 7 dias após a lesão, de maneira que a transição entre a neoderme e a derme adjacente ficou mais suave do que com a aplicação s.c. Porém após o remodelamento da matriz tanto a via s.c. quanto tópica tiveram efeito positivo no reparo, melhorando a deposição de matriz extracelular.

Várias células do sistema imune são importantes no processo de cicatrização mas dentre estas células os mastócitos ainda são pouco investigados. Mastócitos podem influenciar na cicatrização como já foi demonstrado em alguns estudos, onde uma inibição destas células pode levar a uma diminuição da inflamação e como consequência a uma melhor cicatrização ou redução da cicatriz (Chen, Schrementi, Ranzer, Wilgus, & DiPietro, 2014). Nós mostramos neste trabalho que a aplicação subcutânea ou tópica de proteínas toleradas, tanto Zeina ou OVA, reduz o número de mastócitos no leito da lesão. A redução de mastócitos pode alterar o recrutamento de outras células inflamatórias uma vez que mastócitos podem secretar vários tipos de quimiocinas e fatores de crescimento (Wulff &

Wilgus, 2013). Além do mais, a ativação diferencial de mastócitos pode alterar também a ativação de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular, levando a melhor remodelamento na área da lesão e uma cicatrização de melhor qualidade.

Os macrófagos são células imunes importantes nas primeiras etapas do reparo, e podem ser recrutados por mediadores liberados por neutrófilos (Chia et al., 2018; Larouche et al., 2018; Willenborg & Eming, 2014). Os macrófagos participam em diferentes etapas do reparo devido à sua diversidade, ou seja, apresentam diferentes fenótipos que podem influenciar na regulação e proliferação de subpopulações de fibroblastos e miofibroblastos durante a reorganização da matriz extracelular (Lucas et al., 2010; Willenborg & Eming, 2018). Nossos resultados mostraram que a expressão do marcador F4/80, característico de macrófagos, estava aumentado no grupo que recebeu injeção subcutânea de Zeina. Aqui não avaliamos os subtipos de macrófagos, mas estudos anteriores já demonstraram que os efeitos sistêmicos da tolerância oral após a injeção intraperitoneal de Zeina leva a um aumento de macrófagos alternativamente ativados (M2) que são considerados mais anti-inflamatórios (Cantaruti et al., 2017; Cantaruti et al., 2019).

Nossos resultados mostraram um aumento da expressão do marcador CD3, característico de linfócitos T, no grupo que recebeu a proteína tolerada. Os Linfócitos T podem participar na resolução da inflamação e promover um melhor reparo. Estudos têm sugerido que os linfócitos T são importantes na biologia dos folículos pilosos e regeneração da pele (Ali et al., 2017). Trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa já mostraram um aumento no número de linfócitos T no leito da ferida cutânea em camundongos tolerantes a Zeina ou OVA que receberam uma injeção i.p dessas proteínas minutos antes da lesão (Costa et al., 2016; Cantaruti et al., 2017). É possível que o aumento do número de linfócitos T no leito da ferida de camundongos que receberam injeção s.c de Zeina contribua

na redução da fibrose por meio de alterações nos fibroblastos, que por sua vez promovem um melhor remodelamento do colágeno.

Mostramos neste trabalho que a expressão do marcador alfa-SMA, associados à miofibroblastos, estava reduzida nos grupos que receberam aplicação subcutânea ou tópica de proteínas toleradas. Os miofibroblastos desempenham um papel importante na contração das feridas e na deposição da matriz extracelular podendo promover um ambiente que leva a formação de cicatrizes hipertróficas, sendo alvo terapêutico para promoção da melhora da cicatriz. Os macrófagos podem influenciar a proliferação e a ativação dos fibroblastos e assim indiretamente influenciar no remodelamento da matriz extracelular, através da proliferação de diferentes subpopulações de fibroblastos e miofibroblastos (Willenborg et al., 2018).

No trabalho que apresentamos aqui, chamou a atenção a melhor organização da matriz extracelular nos grupos tolerantes tanto Zeina ou OVA com aplicação subcutânea e tópica, de forma que o padrão das fibras colágenas na neoderme se tornou mais semelhante ao da pele intacta, com um padrão entrelaçado em forma de rede 40 ou 60 dias após a lesão. As alterações na deposição de colágeno já podem ser observadas aos 7 dias após a lesão, principalmente no grupo que recebeu Zeina tópica que apresenta menor destruição estromal, mantendo a derme adjacente à lesão preservada, caracterizada por uma zona de transição entre a área da lesão e a derme adjacente mais suave.

Por outro lado, outro componente importante do tecido conjuntivo, as fibras elásticas da matriz extracelular, constituídas por elastina e fibrilas, são responsáveis pela elasticidade da pele (Kielty et al., 2002). Estas fibras normalmente têm uma meia vida longa e não regeneram após lesões. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a aplicação subcutânea ou tópica de proteínas toleradas tanto Zeina ou OVA melhoraram a deposição das

fibras elásticas na neoderme, aumentando a densidade de fibras mais maduras conhecidas como as fibras elásticas importantes no processo de elastogênese.

Estes resultados mostram um efeito muito positivo da aplicação de proteínas toleradas no reparo da matriz extracelular. Isto sugere que os efeitos da tolerância oral promovem um ambiente onde a migração e/ou ativação dos fibroblastos se torna diferente possibilitando uma deposição de matriz extracelular de forma a promover um reparo mais próximo do padrão original que havia na pele intacta.

Estudos com lesões em fetos durante os primeiros estágios do desenvolvimento em que ocorre a regeneração da pele mostraram que o reparo nesta fase envolve linhagens de fibroblastos diferentes dos que são envolvidos numa idade em que não ocorre a regeneração (Jiang et al., 2018). Então, marcadores moleculares de fibroblastos poderiam fornecer maiores informações sobre a participação de diferentes linhagens de fibroblastos no reparo de lesões cutâneas sob os efeitos da exposição a proteínas toleradas. Contudo não temos estes marcadores. Então, para mais aprofundar no estudo de fibroblastos nós analisamos a expressão de uma proteína do citoesqueleto, a Vimentina, expressa em células mesenquimais (Cheng et al., 2016; Walker et al., 2018). Embora a Vimentina seja expressa em outras células mesenquimais na pele, como em leucócitos, a comparação da expressão de Vimentina poderia nos fornecer mais informações sobre a presença de fibroblastos no tecido de granulação. Nossos resultados mostraram que os grupos tolerantes que receberam aplicação tópica de Zeina ou OVA apresentaram uma maior intensidade de fluorescência de Vimentina do que o grupo não tolerante que recebeu aplicação de OVA, porém igual à do grupo controle Salina. Como a Vimentina também é expressa em células inflamatórias pode ser que a expressão alta de Vimentina no grupo controle Salina, mas não nos grupos tolerantes, pode ser relacionada com maior número de leucócitos. Por outro lado, o grupo controle Ova não tolerante apresentou maior expressão de alfa-SMA do que os grupos tolerantes. Então, pode ser que a ativação de fibroblastos para

miofibroblastos não tenha ocorrido nos grupos tolerantes e a maior expressão de Vimentina nestes grupos seja reflexo da presença de fibroblastos com ativação diferente ou de linhagens diferentes. Sugerimos que a maior expressão de Vimentina nos grupos tolerantes está relacionada com fibroblastos e não com leucócitos, permitindo a estes grupos a capacidade de reparo diferente. Isto porque a Vimentina é uma proteína que pode participar em diversos processos celulares, incluindo a proliferação de fibroblastos durante o reparo de lesões (Cheng et al., 2016) e é importante para a atividade das células devido à capacidade que pode lhes dar para interagir com a matriz extracelular, (Camelliti et al., 2004).

Por fim, perguntamos se a aplicação tópica de proteínas previamente ingeridas tinha efeito sistêmico, capaz de alterar a inflamação em lesões concomitantes feitas em outras regiões do corpo. Os resultados mostraram que efeitos sistêmicos da aplicação tópica de proteínas toleradas resultam numa redução do número de mastócitos na orelha de camundongos aos 7 dias após a lesão. Porém, não houve alteração do número total de leucócitos na orelha, sugerindo que as aplicações tópicas tenham menor efeito sistêmico do que as injeções intraperitoneais e subcutâneas. Então, acreditamos que a via tópica poderia ser mais explorada em situações de tratamento de lesões para prevenção de cicatrizes patológicas. A aplicação tópica pode ter menos efeitos colaterais do que corticóides.

Tratamentos utilizando administração de corticóides por injeção intralesional com a intenção de reduzir cicatrizes quelóides e hipertróficas têm sido muito utilizados nos últimos tempos pelos profundos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores que promovem e pela redução da proliferação de fibroblastos, Contudo corticóides produzem efeitos adversos na síntese de colágeno e outras proteínas envolvidas na cicatrização (Tziotzios, Profyris, & Sterling, 2012). Assim, os resultados apresentados neste estudo mostram que a aplicação de proteínas toleradas podem vir a ser uma proposta terapêutica menos invasiva e de melhor

aceitação para promover o melhor reparo de feridas cutâneas. A escolha entre as vias de aplicação, seja s.c ou tópica, depende da situação clínica uma vez que as duas vias têm efeitos positivos.

7. CONCLUSÕES

Os efeitos indiretos da tolerância oral através da aplicação subcutânea e tópica de proteínas toleradas interferem positivamente no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Estes efeitos reduzem a inflamação na área da lesão e melhoram a deposição de matriz extracelular na neoderme, tanto das fibras colágenas quanto de fibras elásticas. Este é um campo promissor visando a aplicação na clínica com a finalidade de prevenir a formação de cicatrizes patológicas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abercrombie M, James DW, Newcombe JF. 1960. Wound contraction in rabbit skin, studied by splinting the wound margins. *J Anat* 94:170–182.

Ali N, Zirak B, Rodriguez RS, Pauli ML, Truong HA, Lai K, Ahn R, Corbin K, Lowe MM, Scharschmidt TC, Taravati K, Tan MR, Ricardo-Gonzalez RR, Nosbaum A, Bertolini M, Liao W, Nestle FO, Paus R, Cotsarelis G, Abbas AK, Rosenblum MD. 2017. Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation. *Cell*.169(6):1119-1129.e11. doi: 10.1016/j.

Anderson, K., & Hamm, R. L. 2014. Factors That Impair Wound Healing. *The journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 4: 84–91. doi:10.1016/j.jccw.2014.03.001.

Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grützkau A, Henz BM. 1999. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders?. *Exp Dermatol*.8:1-16. Review.

Azevedo GM Jr, Costa RA, Resende MA, Rodrigues CM, Vaz NM, Carvalho CR.2012. Indirect effects of oral tolerance inhibit pulmonary granulomas to *Schistosoma mansoni* eggs. *Clin Dev Immunol*.2012:293625. doi: 10.1155/2012/293625.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585–601.

Brass LF. Thrombin and platelet activation. 2003. *Chest* 124(3 Suppl):18S-25S.
Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. 2012. *Eur Surg Res.*49:35-43.
doi: 10.1159/000339613.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. 2006. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 117:12S-34S.

Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P: Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 2004;94:828-835.

Cantaruti TA, Costa RA, de Souza KS, Vaz NM, Carvalho CR. 2017. Indirect effects of immunological tolerance to a regular dietary protein reduce cutaneous scar formation. *Immunology.*151:314-323. doi: 10.1111/imm.12732.

Cantaruti, T, Costa, RA, Franco-Valencia, K, Nóbrega, IBC, Galdino, DAA, Vaz, NM, Carvalho, CR. 2019. Parenteral re-exposure to an immunologically tolerated protein up to 6h after skin injuries improves wound healing in diabetic mice. *J Immunol Regen Med.* 6 (100022). Doi: 10.1016/j.regen.2019.100022.

Carneiro, J. (2006). In G. Koogan (Ed.), *Histologia Básica* (12 ed.).

Carvalho CR, Vaz NM. 1996. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol.*43:613-8.

Carvalho CR, Verdolin BA, de Souza AV, Vaz NM. 1994. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol.* 39:533-8.

Carvalho, C. R., Verdolin, B. A., & Vaz, N. M. (1997). Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol*, 45, 276-281.

Castro-Junior AB, Horta BC, Gomes-Santos AC, Cunha AP, Silva Steinberg R, Nascimento DS, Faria AM, Vaz NM. 2012. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cell Immunol*. 280:171-81. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.12.004.

Chen L, Schrementi ME, Ranzer MJ, Wilgus TA, DiPietro LA. 2014. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. *PLoS One*. 9:e85226. doi: 10.1371/journal.pone.0085226.

Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, Eriksson JE. 2016. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:E4320-7. doi: 10.1073/pnas.1519197113.

Chia, C. Y., Medeiros, A. D., Corraes, A. M. S., Manso, J. E. F., Silva, C., Takiya, C. M., & Vanz, R. L. (2018). Healing effect of andiroba-based emulsion in cutaneous wound healing via modulation of inflammation and transforming growth factor beta 31. *Acta Cir Bras*, 33(11), 1000-1015. doi: 10.1590/s0102-865020180110000007.

Clausen, T. H. A. T. 2002. The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstetricia Gynecologica Scandinavica*, 81, 112-114.

Costa RA, Matos LB, Cantaruti TA, de Souza KS, Vaz NM, Carvalho CR. 2016. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. *Immunobiology*. 221:475-85. doi: 10.1016/j.imbio.2015.11.002.

Costa RA, Ruiz-de-Souza V, Azevedo GM Jr, Gava E, Kitten GT, Vaz NM, Carvalho CR. 2011. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound Repair Regen*. 19:487-97. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00700.x.

Cowin AJ, Brosnan MP, Holmes TM, Ferguson MW. 1998. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev Dyn*. 212:385-93.

Cunha AP, Oliveira RP, Júnior AB, Vaz NM, Carvalho CR. 2009. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. *Cell Immunol*. 258:152-60. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.04.004.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 127:514-25. Review. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 127: 514–525.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. 2014. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 6:265sr6.

Faria AM, Weiner HL. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 206:232-59.

Gill SE, Parks WC. 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:1334-47.

Gütgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. 1998. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity*.8:667-73.

Hoffman M, Harger A, Lenkowski A, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. 2006. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood*.108:3053-60.

Jalali M, Bayat A. 2007. Current use of steroids in management of abnormal raised skin scars. *Surgeon*. 5:175-80.

Jiang, D., Correa-Gallegos, D., Christ, S., Stefanska, A., Liu, J., Ramesh, P., Rinkevich, Y. (2018). Two succeeding fibroblastic lineages drive dermal development and the transition from regeneration to scarring. *Nat Cell Biol*, 20(4), 422-431. doi: 10.1038/s41556-018-0073-8.

Jimi S, De Francesco F, Ferraro GA, Riccio M, Hara S. 2017. A Novel Skin Splint for Accurately Mapping Dermal Remodeling and Epithelialization During Wound Healing. *J Cell Physiol*.232:1225-1232.

Julier Z, Park AJ, Briquez PS, Martino MM. 2017. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater*. 53:13-28. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.056.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. 2002. Elastic fibres. *J Cell Sci*.115:2817-28.

Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. 2019. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. doi: 10.1007/s12016-019-08729-w.

Koźma EM, Olczyk K, Głowacki A, Korbut R.1998.[Wound repair].Postepy Hig Med Dosw. 52:173-85.

Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. 2018. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. Adv Wound Care (New Rochelle).7:209-231. doi: 10.1089/wound.2017.0761.

Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. 2010.Cicatrização fetal sem cicatrizes : uma revisão científica básica. Plast Reconstr Surg.126: 1172-80. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181eae781.

Leavitt T, Hu MS, Marshall CD, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT.2016. Scarless wound healing: finding the right cells and signals. Cell Tissue Res.365:483-93. doi: 10.1007/s00441-016-2424-8.

Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. 2016.Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. Wound Repair Regen. 24:215-22. doi: 10.1111/wrr.12398.

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. J Immunol, 184(7), 3964-3977. doi: 10.4049/jimmunol.0903356.

M. Jalali, A. B. (2007). Current use os steroids in management of abnormal raised skin scars Surgeon, 3, 175-180.

Malandro, M. S., Mark J. Beveridge, Michael S. Kilberg, a., & Novak, D. A. (1996). Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth.

Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT. 2018. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. Feb 1;7(2):29-45. doi: 10.1089/wound.2016.0696.

Martin P, Leibovich SJ. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*; 15: 599–607.

Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. 2015. *Br J Dermatol*. 173:370-8. doi: 10.1111/bjd.13954.

Montes GS. 1996. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 20:15-27. Review.

Nóbrega I.B. Estudo da temporalidade dos efeitos da injeção parenteral de proteínas imunologicamente toleradas no reparo de feridas na pele. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. 2014. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int*. 2014:747584. doi: 10.1155/2014/747584.

Pereira RF, Barrias CC, Granja PL, Bartolo PJ. 2013. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine (Lond)*. 8:603-21. doi: 10.2217/nnm.13.50.

Profyris C, Tziotzios C, Do Vale I. 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol.* 66:1-10.

Ramos GC, Rodrigues CM, Azevedo GM Jr, Pinho V, Carvalho CR, Vaz NM. 2009. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology.* 126:354-62. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02901.x.

Rao KN, Brown MA. 2008. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1143:83-104. doi: 10.1196/annals.1443.023. Review.

Raposio E, Libondi G, Bertozzi N, Grignaffini E, Grieco MP. 2016. Effects of Topic Simvastatin for the Treatment of Chronic Vascular Cutaneous Ulcers: A Pilot Study. *J Am Coll Clin Wound Spec.* 7:13-18. doi: 10.1016/j.jccw.2016.06.001.

Richman LK, Chiller JM, Brown WR, Hanson DG, Vaz NM. 1978. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol.* 12:2429-34.

Rolfe KJ, Grobbelaar AO. 2012. A review of fetal scarless healing. *ISRN Dermatol.* 2012:698034. doi: 10.5402/2012/698034.

Sevilla LM, Pérez P. 2018. Roles of the Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in Skin Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 19(7). pii: E1906. doi: 10.3390/ijms19071906.

Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341:738-46.

Strid J, Thomson M, Hourihane J, Kimber I, Strobel S. 2004. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology.* 113:293-303.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:349-63.

Tziotzios C, Profyris C, Sterling J. 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *J Am Acad Dermatol.* 66:13-24; quiz 25-6. doi: 10.1016/j.jaad.2011.08.035.

Urciuolo F, Casale C, Imperato G, Netti PA. 2019. Bioengineered Skin Substitutes: the Role of Extracellular Matrix and Vascularization in the Healing of Deep Wounds. *J Clin Med.* 8(12).

Vaz N, Faria AM, Verdolin BA, Carvalho CR. 1997. Immaturity, ageing and oral tolerance. *Scand J Immunol.* 46:225-9.

Vaz NM, Kane RE, Lynch JM. 1981. On the adjuvant effect of aluminum hydroxide for mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jan-Mar; 76:93-8.

Vaz NM, Maia LC, Hanson DG, Lynch JM. 1981. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 76:83-91.

Vaz NM, Ramos GC, Pordeus V, Carvalho CR. 2006. The conservative physiology of the immune system. A non-metaphoric approach to immunological activity. *Clin Dev Immunol.* 13:133-42.

Walker JL, Bleaken BM, Romisher AR, Alnwibit AA, Menko AS. 2018 In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype. *Mol Biol Cell*. 29:1555-1570. doi: 10.1091/mbc.E17-06-0364.

Wang W, Li P, Li W, Jiang J, Cui Y, Li S, Wang Z. 2017. Osteopontin activates mesenchymal stem cells to repair skin wound. *PLoS One*. 12:e0185346.

Wang X, Balaji S, Steen EH, Li H, Rae MM, Blum AJ, Miao Q, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. 2019. T Lymphocytes Attenuate Dermal Scarring by Regulating Inflammation, Neovascularization, and Extracellular Matrix Remodeling. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 8:527-537. doi: 10.1089/wound.2019.0981.

Wen Q, Mithieux SM, Weiss AS. 2019. Elastin Biomaterials in Dermal Repair. *Trends Biotechnol*. pii: S0167-7799(19)30212-4. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.08.005.

Wershil BK, Furuta GT. 2008. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 121:S380-3; quiz S415. doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.023.

Willenborg S, E. S. (2018). Cellular networks in wound healing Macrophage and fibroblast heterogeneity and plasticity control tissue fibrosis. *Cell Biology International*, 362(6417).

Willenborg, S., & Eming, S. A. (2014). Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *J Dtsch Dermatol Ges*, 12(3), 214-221, 214-223. doi: 10.1111/ddg.12290.

Wulff, B. C., & Wilgus, T. A. (2013). Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol*, 22(8), 507-510. doi: 10.1111/exd.12169.